CRISTIANE MODA MOTA

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR E*scherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA (EPECa) E PESQUISA DE GENES RELACIONADOS

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

São Paulo
2014

Cristiane Moda Mota

Influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa) e pesquisa de genes relacionados

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Marcia Regina Franzolin

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Mota, Cristiane Moda.
Influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa) e pesquisa de genes relacionados / Cristiane Moda Mota. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Marcia Regina Franzolin.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: *Escherichia coli* diarreiogênica e fatores de virulência: caracterização fenotípica e molecular.

Versão do título para o inglês: Influence of different culture conditions on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) and search of related genes.

1. *Escherichia coli* 2. Diarreia 3. EPEC atípica 4. Biofilme 5. Película 6. Fatores de virulência I. Franzolin, Profa. Dra. Marcia Regina II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB09/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Cristiane Moda Mota.

Título da Dissertação: Influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa) e pesquisa de genes relacionados.

Orientador(a): Profa. Dra. Marcia Regina Franzolin.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,

em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 10 de maio de 2013

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* Enteropatogênica atípica e pesquisa de genes relacionados", protocolo nº. I-1081/13, sob a responsabilidade de Marcia Regina Franzolin e Cristiane Moda Mota, não envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica.

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Aos meus pais, Caetano e Margarete pelos ensinamentos, convivência, amor, dedicação e por sempre estarem por perto. Sou grata por terem compartilhado comigo suas vivências.
Amo vocês!!!

À minha tia Maria e tio Bira (in memorian), por terem me mostrado o caminho da Felicidade Absoluta e que mudanças começam dentro de nós mesmos e sempre há tempo para melhorar, almejando sempre nossa Revolução Humana. Muito obrigada!

Á minha prima Juliana pela convivência desde a mais tenra infância , pelos momentos bons, apoio, carinho, amizade e preocupação. Você é a irmã que sempre quis ter. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua vida! Obrigada por existir!

Ao meu namorado Hebert pela imensa ajuda, dedicação, paciência, compreensão e amor. Você iluminou meus dias, nutriu meu espírito, curou minha alma, acalentou meu coração. Você me mostrou que tudo o que se quer é possível. Você é maravilhoso.
TE AMO!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por estarem sempre presente, demonstrando amor incondicional, transmitindo alegria, sendo compreensíveis em todos os momentos da minha vida. Amo vocês;

Aos meus tios e prima, pela convivência harmoniosa, pela presença insubstituível em minha vida e em todos os momentos que precisei. Vocês são muito importantes para mim;

Ao meu namorado Hebert, pela convivência na bancada (e no fluxo!), pelos momentos de discussão de artigos difíceis, explicações e esclarecimento, além de tornar meus dias mais alegres através de muito carinho e apoio incondicional, você é meu par;

Aos meus futuros sogro e sogra, Humberto e Elza, e meus "irmãos" que ganhei de brinde, Cleber, Carina e Eric pelos momentos em família, risadas e compreensão durante os últimos anos;

À minha orientadora Dra. Marcia Regina Franzolin pela oportunidade, dedicação, conhecimentos transmitidos, confiança e incentivo, além do maravilhoso convívio, desde a Iniciação Científica;

Ao pesquisador Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'Anna pelo apoio, companheirismo e assistência sempre que precisei;

À Dra. Cecilia Mari Abe pela dedicação e maravilhosos dados de microscopia eletrônica de varredura;

Ao laboratório de Parasitologia e ao técnico Henrique Krambeck Roffato pela captura das imagens de microscopia confocal, idéias de adaptações aos desafios metodológicos e material cedido;

A Rosana Duarte Prisco do setor de Estatística do ICB/USP pelo grande auxílio com a análise estatística de nossos ensaios;

Aos membros da banca, por terem aceito o convite de participação e pelas sugestões;

Aos amigos da "Biotec" Patt, Erika, Roberta, Juliano, Claudia, Beatriz e Paulo, pelos momentos de descontração, altas risadas, apoio e amizade;

Aos amigos da "Bac" Eliana, Ludy, Demetria, Claudia, Matilde, Larissa, Lídia, Denize, Tati, Afonso, Fran, Kamila, Fernando e Bruna pela convivência tanto no laboratório quanto fora dele;

Aos amigos do laboratório de Genética Renato, Samuel, Juliana, Vanessa e Regina pelos mais variados momentos, acadêmicos e não tão acadêmicos assim;

Aos funcionários e técnicos Juscelino, dona Maria, dona Sebastiana, Reginaldo e Suzana por sempre ter me ajudado e pela ótima convivência;

Aos funcionários da secretaria de Biotecnologia Eliane, Fábia e Marcos por sempre estarem dispostos a esclarecer minhas dúvidas de âmbito burocrático, pela disponibilidade e pela ajuda sempre que precisei;

À funcionária Monica, da Biblioteca do ICB, pela revisão da minha dissertação;

Aos pesquisadores Waldir e Roxane por permitir o desenvolvimento deste trabalho no laboratório de Bacteriologia e aos demais funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia que de alguma forma me auxiliaram;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao CNPq (Projeto Universal 480225/2010-9) pelo apoio financeiro e à CAPES pela bolsa concedida,

Muito obrigada!

RESUMO

MOTA, C. M. **Influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica (EPECa) e pesquisa de genes relacionados.** 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda em crianças de países em desenvolvimento, predominando a EPEC atípica (EPECa). A adesão em células epiteliais formando microcolônias é uma característica marcante de EPEC e é um passo inicial na formação de biofilme. Biofilmes são estruturas bacterianas que se encontram aderidas a superfícies bióticas e abióticas e são envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos. O objetivo deste estudo foi verificar a influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por 23 amostras de EPECa isoladas de crianças com diarreia e pesquisar a presença de genes relacionados com a formação de biofilme. As sequências dos genes *csgA*, *crl*, *fimH* e *bcsA* foram pesquisadas através da PCR e foram verificadas em 6 (26%), 23 (100%), 22 (95,6%) e 23 (100%) das amostras respectivamente. A expressão da fímbria tipo I, fímbria curli, produção de celulose e presença de motilidade foram positivas para 16 (69,6%), 11 (47,8%), 13 (56,5%) e 18 (78,3%) das amostras. A formação de biofilme em placas de MTP pelas amostras de EPECa foi melhor evidenciada em meio LB sem sal a 26 °C e em caldo *E. coli* a 37 °C, tanto em número de amostras quanto em intensidade da formação de biofilme. A formação de anel (película) na interface ar-líquido-vidro a 26 °C foi observada na maioria das cepas estudadas em todos os meios, com exceção no meio M9 em que apenas 9 amostras (39,1%) formaram estrutura semelhantes a anéis. No entanto, as amostras incubadas a 37 °C apresentaram menor positividade nos meios LB (4,3%), LB sem NaCl (13%) e Mínimo M9 (4,3%), enquanto que em caldo *E. coli*, acima de 91,3% das amostras formaram anel em ambas as temperaturas. Esses dados salientam a importância da capacidade de permanência e resistência no meio ambiente, o que nos sugere o seu papel como fonte de contaminação. As microscopias confocal e eletrônica propiciaram uma análise qualitativa de estruturas como microcolônias e pilares, além de material extrapolimérico respectivamente. Apesar de algumas amostras não apresentarem fímbrias *curli* e tipo I, assim como produção de celulose nas condições utilizadas, algumas foram capazes de formar biofilme indicando que além destas, outras fímbrias e/ou adesinas possam influenciar a formação de biofilme em EPECa. A presença de vários genes possivelmente envolvidos na formação de biofilme, assim como a sua expressão, evidenciou esta formação aparentemente num processo multifatorial. A capacidade de formação de biofilme pode ser mais evidenciada empregando meio de cultura enriquecido, principalmente contendo componentes encontrados no trato gastrointestinal de humanos e de animais (sais biliares presentes no caldo *E. coli).* Além disso, os biofilmes podem fornecer alto potencial de resistência no ambiente e no hospedeiro, realçando a sua virulência. Portanto, as condições de cultivo devem ser usadas com precaução para realmente aferir a capacidade de formação de biofilme por amostras de EPECa.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Diarreia. EPEC atípica. Biofilme. Película. Fatores de virulência.

ABSTRACT

MOTA, C. M. **Influence of different culture conditions on biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) and search of related genes.** 2014. 124 p. Masters tesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Escherichia coli (EPEC) has been identified as the main agent of acute diarrhea in children in developing countries, predominantly atypical EPEC (aEPEC). The adhesion in epithelial cells forming microcolonies is a hallmark of EPEC and is an initial step in biofilm formation. Biofilms are bacterial structures which are adhered to biotic and abiotic surfaces and are surrounded by a matrix of exopolysaccharides. The aim of this study was investigate the influence of different culture conditions on biofilm formation by 23 aEPEC strainss isolated from children with diarrhea and search for the presence of genes related to biofilm formation. The sequences of the *csgA*, *crl*, *fimH* and *bcsA* genes were screened by PCR and were found in 6 (26%), 23 (100%), 22 (95.6%) and 23 (100%) of the strains respectively. The expression of type I fimbriae, curli fimbriae, cellulose and presence of motility were positive for 16 (69.6%), 11 (47.8%), 13 (56.5%) and 18 (78.3%) of the strains. MTP plates for aEPEC strains was better evidenced in LB medium without NaCl at 26 °C and in *E. coli* broth at 37 °C, both in number and intensity of biofilm formation. Ring (pellicle) formation in air-liquid-glass interface at 26 °C was observed in most of the analyzed strains in all media, with exception of M9 minimal, which only 9 strains (39.1%) formed ring. However, the strains were incubated at 37 ° C showed lower positivity in LB media (4.3%), LB without NaCl (13%) and M9 (4.3%), while *E. coli* broth, up 91.3% of the strains formed ring at both temperatures. However, when incubated at 37 °C strains showed lower positivity in LB media (4.3%), LB without NaCl (13%) and M9 minimal (4.3%), while broth E. coli, up 91.3% of the strains formed biofilm at both temperatures. These data emphasize the importance of persistence power and resistance to the environment, which suggests its role as a source of contamination. The confocal and electron microscopy provided a qualitative analysis of structures such as microcolonies and pillars, and respectively EPS. Although some strains do not express curli and type I fimbriae, as well as they do not product cellulose under the used conditions, some strains were able to form biofilms indicating that apart from them, other fimbriae and / or adhesins may influence the biofilm formation in aEPEC. The presence of several genes possibly involved in biofilm formation, as well as their expression revealed they are apparently involved in a multifactorial process. The ability of biofilm formation can be demonstrated using culture medium supplemented mainly with components found in the gastrointestinal tract of humans and animals (bile salts present in the *E. coli* broth). Moreover, biofilms can provide high-resistance potential of the environment and the host, enhancing its virulence. Therefore, the growing conditions should be used with caution to measure the real ability of biofilm formation by aEPEC strains.

Keywords: *Escherichia coli*. Diarrhea. Atypical EPEC. Biofilm. Pellicle. Virulence factors.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - Três dimensões.

AD - Adesão difusa.

AA - Adesão agregativa.

A/E - Lesão *attaching and effacing.*

AL - Adesão localizada.

ALL - Adesão localizada-like.

ATP- Adenosina trifosfato.

bfpA - *Bundle forming pilus* subunidade *A.*

CFA - *colonization fator antigen.*

CLSM - Microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser.

CTC - 5 ciano – 2,3 ditolil cloreto de tetrazólio.

DAEC - *Escherichia coli* que adere difusamente.

DMEM - Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbeco.

DO - Densidade óptica.

EAEC - *Escherichia coli* Enteroagregaiva.

eae - *E. coli* attaching and effacing.

ECD - *Escherichia coli* Diarreiogênica.

E. coli - *Escherichia coli.*

EHEC - *Escherichia coli* Enterohemorrágica.

EIEC - *Escherichia coli* Enteroinvasora.

EPEC - *Escherichia coli* Enteropatogênica.

EPECa - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica.

EPECt - *Escherichia coli* enteropatogênica típica.

EPS - Exopolissacarídeos.

Esp - *Escherichia coli secreted Proteins.*

espA - *Escherichia coli secreted proteins* subunidade A.

ETEC - *Escherichia coli* Enterotoxigênica.

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal.

FITC - Isotiocianato de fluoresceína.

HEp-2 - Linhagem celular derivada de adenocarcinoma de laringe.

IND - Adesão indefinida.

IP - Iodeto de propídeo.

Kb - Kilobases.

LT - Toxina termolábil.

LB - caldo Luria-Bertani.

LB sem NaCl – caldo Luria-Bertani sem sal

LEE - Ilha de patogenicidade *lócus of enterocyte effacement.*

mL - Mililitros.

mM – micromolar.

MBEC – *Minimum biofilm eradication concentration*; Dispositivo de Calgary.

MOPS - Ácido 3-(N-Morfolino) Propanosulfônico

MTP – *Microtiter plate*.

M9 – Meio mínimo M9.

NA - Não aderente.

nm - Nanômetros.

µg – Microgramas.

µL – Microlitros.

pb - Pares de bases.

PBS - Tampão fosfato.

PCR - Reação em cadeia da Polimerase.

Pic – *protein intestinal colonization* de EAEC

pEAF - Plasmid *EPEC adherence factor.*

per - *Plasmid encoded regulator.*

pmol - picomolar

Ler - LEE *encoded regulator.*

q. s. p. - Quantidade suficiente para.

rpm - Rotações por minuto.

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga.

SHU - Síndrome hemolítico urêmica.

Stx - Toxina de Shiga.

ST - Toxina termoestável.

Tir - Translocated intimin receptor.

TAE - Tris-acetato EDTA.

TSA - Ágar tripticaseína de soja.

TSB - Caldo tripticaseína de soja.

UFC - Unidade formadora de colônia.

UFC/cm^2 - Unidade formadora de colônia por centímetro quadrado.

XTT - 2,3 – bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) – 5 [(fenil – amino) carbonil] - 2H – tetrazólio hidróxido.

YESCA - *Yeast Extract Casamino Acids*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius.

α- Letra grega “alfa”.

β- Letra grega “beta”.

>- Maior que.

<-Menor que.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presença do gene *csgA* 45

Figura 2. Presença do gene *crl* 45

Figura 3. Presença do gene *fimH* 45

Figura 4. Presença do gene *bcsA* 45

Figura 5. Ensaio de expressão da fímbria curli em ágar Vermelho Congo 57

Figura 6. Ensaio de aglutinação das amostras BA 4157 (positiva) e BA 558 (negativa) na presença da levedura *Sacharomyces cerevisae* 58

Figura 7. Amostras de EPECa BA 320 (esquerda) positiva para expressão de celulose, apresentando colônias fluorescentes sob uma fonte de luz ultravioleta de 366 nm e mostra de EPECa BA 92 negativa (direita), não fluorescente. Placas de ágar contendo LB sem NaCl com Calcofluor 60

Figura 8. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa LB 5.10 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e a 37 °C em MTP após 24 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X 73

Figura 9. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa BA 4157 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e a 37 °C em MTP após 24 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X 74

Figura 10. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa 320 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e a 37 °C em MBEC após 72 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X 81

Figura 11. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa BA 4157 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e a 37 °C em MTP após 24 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X 82

Figura 12. Fotomicrografia eletrônica de varredura em MBEC das amostras de EPECa BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10 em LB a 37 °C, após 72 horas de incubação 83

Figura 13. Fotomicrografias eletrônica de varredura em MBEC das amostras de LB5.10, BA 4157, LB 3.25 e BA 320 em LB a 37 °C, após 72 horas de incubação. A – parte superior do pino; B – parte mediana e C – a extremidade inferior do pino 84

Figura 14. Fotomicrografias de formação de biofilme em MBEC pelas amostras de EPECa BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 5.10 e LB 3.25 em LB a 37 °C após 72

horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X 85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa utilizando o ensaio colorimétrico com cristal violeta. Incubação em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C por 24 horas 64

Gráfico 2. Capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa utilizando o ensaio colorimétrico com cristal violeta. Incubação em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C por 24 horas 65

Gráfico 3. Massa de biofilme das 23 amostras de EPECa em diferentes condições de cultivo 68

Gráfico 4. Diferença da capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa em diferentes meios nas temperaturas de 26 °C e 37 °C 69

Gráfico 5. Cinética de formação de biofilme em MTP das amostras de EPECa em meio LB sem NaCl a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta 75

Gráfico 6. Cinética de formação de biofilme em MTP de amostras de EPECa em caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta 76

Gráfico 7. Capacidade de formação de biofilme em MTP de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação 77

Gráfico 8. Capacidade de formação de biofilme em MTP de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação 78

Gráfico 9. Capacidade de formação de biofilme em MBEC de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação 79

Gráfico 10. Capacidade de formação de biofilme em MBEC de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de EPECa utilizadas neste estudo com seus respectivos sorotipos e padrão de adesão a células HEp-2. A amostragem representativa em destaque foi submetida aos ensaios de 72 horas, microscopia confocal e microscopia de varredura 42

Tabela 2. Sequência dos iniciadores para os genes *csgA*, *crl*, *fimH* e *bcsA* temperatura de anelamento, e tamanho dos fragmentos 44

Tabela 3. Categorias e classificação dos níveis de formação de biofilme por amostras de EPECa de acordo com Stepanović et al. (2000) 49

Tabela 4. Presença dos genes para fímbria curli, fímbria tipo 1 e celulose em 23 amostras de EPECa 56

Tabela 5. Expressão da fímbria curli em ágar Vermelho Congo por 23 amostras de EPECa57

Tabela 6. Expressão da fímbria tipo 1 por 23 amostras de EPECa, através do ensaio de aglutinação 59

Tabela 7. Expressão de celulose em ágar Calcofluor por 23 amostras de EPECa 61

Tabela 8. Presença ou ausência de motilidade nas 23 amostras de EPECa 62

Tabela 9. Perfil das amostras de EPECa para a expressão dos genes *csgA*, *crl*, *fimH* e *bcsA* 63

Tabela 10. Diferenças estatísticas da formação de biofilme por 23 amostras de EPECa, através do ensaio com cristal violeta, nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, após incubação a 26 °C e a 37 °C 66

Tabela 11. Classificação da formação de biofilme por 23 amostras de EPECa, através de ensaio com cristal violeta após 24 horas de incubação 67

Tabela 12. Comparação entre as temperaturas de 26 °C e 37 °C nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, quanto a capacidade de formar biofilme. 70

Tabela 13. Formação de anel na interface ar-líquido-vidro e formação de biofilme por 23 amostras de EPECa a 26 °C e 37 °C 71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA 20

1.1 Diarreia infecciosa 20

1.2 *Escherichia coli* 20

1.3 *Escherichia coli* Diarreiogênicas 21

1.4 *Escherichia coli* Enteropatogênica 22

1.5 Biofilme 25

1.5.1 Biofilme em Escherichia coli 29

1.5.2 Ensaios empregados para verificar a formação de biofilme 35

2 OBJETIVOS 40

2.1 Objetivo geral 40

2.2 Objetivos específicos 40

3 MATERIAL E MÉTODOS 41

3.1 Delineamento experimental 41

3.2 Amostras 42

3.3 Pesquisa dos genes *csgA, crl, fimH,* e *bcsA* 43

3.4 Ensaios fenotípicos 46

3.4.1 Expressão da fímbria tipo 1 46

3.4.2 Expressão da fímbria curli 46

3.4.3 Produção de celulose.....47

3.4.4 Ensaio de motilidade.....47

3.5 Ensaios de formação de biofilme.....48

3.5.1 Ensaio colorimétrico com cristal violeta.....48

3.5.2 Ensaio de formação de anel na interface ar-líquido-vidro.....49

3.5.3 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em microplaca de fundo chato (MTP) em quatro meios de cultivo.....49

3.5.4 Cinética da formação de formação de biofilme em microplaca de fundo chato (MTP), através do ensaio com cristal violeta.....50

3.5.5 Ensaio colorimétrico com cristal violeta em placa de fundo chato (MTP) e em Dispositivo de Calgary (MBEC) após 72 horas de incubação.....51

3.5.6 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em Dispositivo de Calgary (MBEC).....52

3.5.7 Microscopia eletrônica de varredura.....53

3.5.8 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em Dispositivo de Calgary (MBEC) em LB a 37 °C.....53

3.6 Análise estatística.....54

4 RESULTADOS.....55

4.1 Presença dos genes *csgA, crl, fimH* e *bcsA*.....55

4.2 Expressão dos genes *csgA, crl, fimH* e *bcsA*.....56

4.2.1 Expressão da fímbria curli.....56

4.2.2 Expressão da fímbria do tipo 1.....58

4.2.3 Produção de celulose.....59

4.2.4 Presença de motilidade. 61

4.3 Ensaio colorimétrico com cristal violeta das 23 amostras de EPECa no período de 24 horas de incubação em diferentes condições de cultivo em placas de fundo chato (MTP) 63

4.4 Presença de anel na interface ar-líquido-vidro 69

4.5 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em microplaca de fundo chato (MTP) em quatro meios de cultivo 72

4.6 Cinética da formação de biofilme em microplacas de fundo chato (MTP) em LB sem NaCl a 26 °C e em caldo *E. coli* a 37 °C por amostras representativas de EPECa 74

4.7 Ensaio colorimétrico com cristal violeta de amostras representativas de EPECa no período de 72 horas de incubação em microplacas de fundo chato (MTP) e Dispositivo de Calgary (MBEC) em diferentes meios e temperaturas 76

4.8 Microscopia confocal de fluorescência de biofilme formados em MBEC pelas amostras BA 320 e BA 4157 após 72 horas de incubação em diferentes condições de cultivo 80

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura 82

4.10 Microscopia confocal de fluorescência em MBEC em meio LB a 37 °C após 72 horas de incubação 84

5 DISCUSSÃO 86

6 CONCLUSÕES.....105

REFERÊNCIAS 106

APÊNDICE A – Meios de cultivo empregados 121

APÊNDICE B – Placas utilizadas nos ensaios de formação de biofilme (MTP e MBEC) 123

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diarreia infecciosa

A diarreia infecciosa é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, sendo que as doenças bacterianas infecciosas estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade (BRYCE et al., 2005). Dentre as doenças infecciosas que se destacam estão as infecções intestinais, responsáveis pela morte de dois milhões de pessoas ao ano, a qual acomete principalmente crianças abaixo de cinco anos de idade, residentes de países em desenvolvimento (BRYCE et al., 2005).

Inúmeros patógenos, tais como bactérias, vírus e protozoários estão associados à diarreia infecciosa. Dentre os agentes infecciosos bacterianos mais prevalentes estão organismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholarae*. Esses patógenos apresentam em sua maioria o modo de transmissão via fecal-oral, estando a alta incidência de surtos diarreicos diretamente associada a fatores sócio-ambientais, tais como a falta de saneamento básico, precariedade das condições sanitárias, além da contaminação de água e de alimentos (WARDLAW et al., 2009).

Estudos epidemiológicos apresentam a bactéria *Escherichia coli* como o principal agente da diarreia infecciosa no Brasil (HERNANDES et al., 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo, facultativo que pertence à família Enterobacteriaceae e é versátil, pois além de se apresentar em ampla distribuição na natureza, encontra-se presente na microbiota intestinal de vários mamíferos, onde estabelece uma relação benéfica com o hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003), sendo um dos microrganismos mais comuns da microbiota intestinal humana e de alguns animais (FINLAY; FALCOW, 1997; HOLT, 1993; NATARO; KAPER, 1998). No entanto, apesar dessas bactérias serem membros da microbiota humana e animal, devido à aquisição de fatores de virulência por transferência horizontal, algumas cepas de *E. coli* tornam-se patogênicas, capazes de causar diversas doenças aos hospedeiros (NATARO; KAPER 1998). As cepas de *E. coli* patogênicas podem ser diferenciadas das não patogênicas por apresentarem fatores de

virulência relacionados à colonização, adesão, invasão, moléculas de superfície, aparatos de transporte e secreção, moléculas secretadas, entre outros (FINLAY; FALCOW, 1997).

As cepas patogênicas de *Escherichia coli* que causam infecções extra intestinais são conhecidas como ExPEC (RUSSO; JOHNSON, 2000), dentre as quais destacam-se aquelas que causam infecções urinárias, bacteremia, sepses e meningites (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). Já as *E. coli* que causam infecções intestinais, tanto em crianças quanto em adultos, são chamadas de *Escherichia coli* diarreiogênicas (ECD) (NATARO; KAPER, 1998).

1.3 *Escherichia coli* Diarreiogênicas

As ECD são atualmente classificadas em 6 categorias ou patótipos, considerando-se seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas, os aspectos epidemiológicos ou os tipos de interação com linhagens celulares. Esses patótipos são: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtoras das toxinas de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (NATARO; KAPER, 1998). As EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de STEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

ETEC é capaz de aderir às células do epitélio intestinal através de seus vários fatores de colonização, sendo associada à diarreia aguda e em casos de diarreia do viajante. Colonizam o intestino delgado através de estruturas adesivas denominadas Fatores Antigênicos de Colonização (CFA). Possuem também duas enterotoxinas denominadas termolábil (LT) e termoestável (ST), que juntamente com CFA ocasionam diarreia aguda aquosa (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EIEC é a principal causadora da colite inflamatória e como possui capacidade de invasão à célula hospedeira, pode ocasionar disenteria. Sua virulência consiste em transportar proteínas para o meio externo através do sistema de secreção do tipo III. As proteínas secretadas desestabilizam a célula do hospedeiro, possibilitando sua invasão. EIEC tem uma relação bioquímica, genética e patogênica muito semelhante à *Shigella* spp. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

DAEC é assim definida por apresentar um padrão de adesão difuso quando ensaiadas frente à células epiteliais, aderindo-se de forma difusa sobre a superfície celular (ELLIOT;

NATARO, 1995). Este patótipo se adere devido à adesinas presentes em sua membrana, tais como F1845 e AIDA-I (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Porém, a relação entre este patótipo com o quadro diarreico é controverso, podendo estar associada ou não à diarreia, respectivamente em crianças maiores e menores de um ano (SCALETSKY et al., 2002).

EAEC é conhecida amplamente por ocasionar diarreia persistente em pessoas tanto de países desenvolvidos quanto em desenvolvimento e também por ocasionar surtos em diversas regiões do mundo. Este grupo é definido por suas bactérias não secretarem as toxinas LT e ST, além de aderir às células epiteliais em um padrão conhecido como autoagregativo (AA), no qual as bactérias aderem apresentando uma semelhança com tijolos empilhados, formando agregados heterogêneos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO et al., 1987;).

STEC pode ocasionar gastroenterite, diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica, podendo originar uma severa complicação renal conhecida como síndrome hemolítica urêmica (SHU), devido à translocação da toxina de Shiga (Stx) por células do epitélio intestinal (FRANKEL et al., 1998). As STEC possuem ainda uma subcategoria denominada EHEC, sendo que a diferença se dá pela capacidade das EHEC de produzir a lesão *attaching and effacing* (A/E), semelhante às EPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EPEC foi o primeiro patótipo descrito dentre as ECD. Este patótipo tem sido identificado como o principal agente de diarreia aguda em crianças em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998), além de ocasionar casos de diarreia persistente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000). EPEC apresenta a capacidade de causar uma lesão histopatológica em biópsias intestinais, bem como em cultura celular, denominada lesão *attaching and effacing* (A/E), além de não secretar a toxina de Shiga (Stx) (KAPER, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A diarreia causada por EPEC provavelmente seja devido ao aumento da permeabilidade intestinal desencadeada pelo bloqueio do balanço eletrolítico, inflamação e perda de absorção de água (CLARKE et al., 2003; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.4 *Escherichia coli* Enteropatogênica

Em 1955, Neter designou como *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) todas as amostras que estavam epidemiologicamente associadas à casos de diarreia em crianças, para distingui-las de linhagens presentes na microbiota normal (NETER, 1955). Porém, em um evento internacional sobre EPEC, no ano de 1995 na cidade São Paulo, as EPEC típicas

(EPECt) foram definidas como *Escherichia coli* diarreiogênicas que possuem o gene *attaching and effacing* (*eae*) e são, portanto, capazes de causar a lesão A/E , não expressam a toxina de Shiga (stx) e possuem o plasmídeo EPEC *adherence factor* (pEAF). No entanto, as EPEC atípicas (EPECa) formam lesão A/E, mas não possuem o pEAF (KAPER, 1996). Uma definição mais apropriada de EPEC atípica foi proposta por Trabulsi, Keller e Gomes, 2002, na qual as amostras que além do gene *eae*, possuem o gene *bfpA*, mas desde que não expressem a fímbria BFP, seriam consideradas EPECa, visto que foram relatados casos em que algumas amostras possuíam o gene *bfpA*, mas não expressavam a fímbria, ou ainda, algumas amostras que podem ser negativas para a sonda EAF e expressavam a fímbria BFP (GOMES et al., 2004). Essa definição foi corroborada por estudos demonstrando que apenas cepas de EPECt expressam BFP (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2009; NARA et al., 2009).

O plasmídeo *Escherichia coli enteropatogenic adherence factor* (pEAF) de 70 kb contém os genes envolvidos com a biogênese de uma adesina fimbrial do tipo IV denominada *bundle forming pilus* (BFP), que é responsável pela interação interbacteriana e adesão localizada (AL) das EPEC à célula hospedeira, levando à formação de microcolônias, além da sequência genética referente ao fragmento sonda EAF e o gene *plasmid encoded regulator* (*per*) (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As amostras de EPEC atípicas também diferem das EPEC típicas por apresentar os mais variados padrões de adesão a células epiteliais *in vitro*, tais como HeLa ou HEp-2, em ensaios de 6 horas, dentre eles: adesão localizada-*like* (ALL), caracterizada pela presença de microcolônias menos compactas e menos densas aderidas na superfície da célula; não aderentes (NA); adesão agregativa (AA), onde as bactérias aderem à superfície celular e às lamínulas apresentando a forma de tijolos empilhados; adesão difusa (AD), onde a bactéria adere difusamente sobre a superfície celular; adesão localizada (AL), caracterizada pela formação de microcolônias bacterianas compactas; e padrão indefinido (IND), quando a adesão bacteriana não pode ser classificada em nenhum desses padrões definidos; enquanto as EPECt apresentam apenas o padrão AL em ensaios de 3 horas (ABE et al., 2009; HERNANDES et al., 2009).

Com relação aos fatores de virulência, as EPECt apresentam homogeneidade, pois expressam os fatores de virulência codificados pela ilha de patogenicidade conhecida como *locus of enterocyte effacement* (LEE) e pelo plasmídeo pEAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Entretanto, os fatores de virulência de EPECa são muito heterogêneos, pois

apesar de expressarem os fatores de virulência codificados na ilha de patogenicidade LEE, podem expressar fatores de virulência adicionais, não localizados nesta ilha, tais como a expressão de enterohemolisinas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), toxina Pic (ELIAS et al., 2008), adesinas responsáveis por outros padrões de adesão, entre outros.

Como mencionado anteriormente, amostras de EPEC são capazes de causar um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como *attaching and effacing* (lesão A/E) (KAPER, 1996). Essa lesão foi observada pela primeira vez por Moon et al. (1983) e é caracterizada pela perda de microvilosidades das células do epitélio intestinal, aderência íntima da bactéria aos enterócitos, acúmulo de actina polimerizada e rearranjo de outros componentes do citoesqueleto, tais como vinculina, talina, ezerina entre outros (HUANG et al., 2002), resultando na formação de um pedestal. Os genes que caracterizam a lesão A/E são codificados na ilha de patogenicidade LEE (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

A região LEE é considerada uma ilha de patogenicidade (PAI) por conter um conjunto de genes adquiridos por transferência horizontal. As ilhas de patogenicidade tem algumas características marcantes, tais como estar presente em determinadas espécies, mas ausentes em amostras comensais, o conteúdo G+C ser diferente do restante do genoma da bactéria, estar localizada em regiões próximas à tRNA, possuem integrases e sequências de inserção quase sempre no inicio da ilha perto tRNA e principalmente conferem à bactéria fatores de virulência (FRANKEL et al., 1998; VIEIRA, 2010).

A ilha de patogenicidade LEE é dividida em 5 operons. LEE 1, 2, 3 contém os genes que codificam as proteínas que compõe o sistema de secreção do tipo 3 (SST3). O primeiro gene de LEE 1 é denominado de *LEE encoded regulator* (*ler*), o qual codifica uma proteína reguladora que ativa todos os operons de LEE (MELLIES et al., 2007). LEE 2 codifica os genes *sepD* e *Z*, *escC* e *J*, *cesD*, entre outros, enquanto LEE 3 codifica os genes *escV*, *sepQ* e *espH* (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). LEE 4 contém os genes que codificam as proteínas secretadas pelo SST3, denominadas *EPEC secreted protein* tais como EspA, EspD, EspB, EspF, entre outras (CLEARY et al., 2004; KNUTTON et al., 1998). LEE 5 codifica a proteína intimina (produto do gene *eae*) e o receptor Tir (*Translocated intimin receptor*) (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). A proteína Tir é translocada para o interior da célula hospedeira através do SST3, sendo posteriormente inserida na membrana citoplasmática da mesma, atuando como receptor da proteína intimina, localizada na membrana bacteriana (KENNY, 1997).

Os sorogrupos de EPEC podem ser detectados através de teste sorológico, com base na detecção do antígeno O correspondente à porção polissacarídica do LPS, e compreendem 12 diferentes sorogrupos O clássicos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1987). Os sorotipos de EPECa podem pertencer ou não aos chamados sorogrupos (O) clássicos de EPEC. Quando estes pertencem ao mesmo sorogrupo distinguem basicamente pela diferença dos antígenos H (correspondente às proteínas flagelares), por exemplo, o sorotipo O55:H6 é considerado de EPECt enquanto o sorotipo O55:H7, EPECa (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

As amostras de EPECa compreendem uma vasta série de amostras que aparentemente emergiu recentemente e já estão entre os principais agentes de diarreia em nosso meio e em outros países, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade, além de adultos e indivíduos imunocomprometidos (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; NGUYEN et al., 2006; OCHOA et al., 2008; ROBINS-BROWNE et al., 2004). Casos de diarreia persistente causados por EPECa tem sido descritos (NGUYEN et al., 2006; YATSUYANAGI et al., 2003).

Concomitantemente à emergência destas amostras houve o desaparecimento quase total das EPEC típicas que antes eram a principal causa de diarreia em crianças no nosso meio (GOMES et al., 1991). EPEC atípica é um patógeno descrito recentemente e pouco se conhece sobre a patogênese do mesmo, talvez devido à grande heterogeneidade e características das amostras (ABE et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES., 2002). EPECa tem sido isolada de diversos animais, representando assim um importante reservatório e fonte de transmissão para os humanos (HERNANDES et al., 2009; MOURA et al., 2009), podendo inclusive algumas amostras apresentar a capacidade de formação de biofilme (WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

1.5 Biofilme

Estima-se que mais que 90% dos microrganismos vivem sob a forma de biofilmes (COSTERTON et al., 1987) e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser colonizada por bactérias (CHARACKLIS; MARSHALL, 1990).

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades de microrganismos tipicamente envoltos por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem bacteriana (NIKOLAEV; PLAUKUNOV, 2007) e representam a forma de vida microbiana

predominante no planeta (DONLAN; COSTERTON, 2002). Agregados microbianos presentes em interface ar-líquido, líquido-líquido ou até mesmo em flocos ou grânulos flutuantes enquadram-se também na definição de biofilmes (COSTERTON et al., 1995). Podem ser compostos raramente por uma população desenvolvida a partir de uma única espécie (monoespécie) ou mais comumente derivada de múltiplas espécies microbianas (multiespécie) (DAVEY; O'TOOLE, 2000). De forma geral, a formação de biofilmes é uma estratégia importante usada por um grande número de microrganismos em um ambiente natural para a sua sobrevivência (COSTERTON et al., 1987).

Biofilmes podem ser formados em superfícies bióticas como células e tecidos, assim como em superfícies abióticas como vidro, poliestireno (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2001; HANCOCK; WITSØ; KLEMM., 2011), aço inoxidável, borracha e em superfícies de contato de alimento (BISCOLA; ABE; GUTH, 2009; KUMAR; ANAND, 1998; RYU; BECHAUT, 2004). Deste modo, causam problemas nas áreas alimentícia, farmacêutica, médica, entre outras (DONLAN; COSTERTON, 2002; WALKER et al., 1995), ocasionando corrosão e contaminação microbiana (HOUDT; MICHIELS, 2005).

As propriedades físico-químicas da superfície podem ser modificadas pela adsorção de moléculas orgânicas formando um filme condicionante (OFEK; DOYLE, 1994; WATNICK; KOLTER, 1999), ou seja, a superfície é modificada pela adsorção de sais, proteínas, entre outros, dependendo da composição do meio em que se encontra, alterando a interação hidrodinâmica entre bactéria e o substrato devido à alterações das características deste e a adsorção destas moléculas na superfície do substrato pode afetar a taxa de metabolismo microbiano (OFEK; DOYLE, 1994; WATNICK; KOLTER, 1999).

O desenvolvimento do biofilme é um processo multifatorial, onde vários fatores ambientais interferem no seu desenvolvimento, tais como: temperatura, variação de pH (KUMAR; ANAND, 1998), composição do meio, pressão, oxigênio, presença de agentes antimicrobianos, osmolaridade (PRINGENT-COMBARET et al., 2001), disponibilidade de nutrientes, quantidade de inóculo, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos (BELOIN, ROUX; GHIGO, 2008; DAVEY; O'TOOLE, 2000; HANCOCK; WITSØ; KLEMM; 2011; NAVES et al., 2008).

Portanto, a formação do biofilme ocorre devido a estímulos que podem ocasionar a transição da bactéria de uma forma de vida livre (planctônica) para uma forma séssil (PRATT; KOLTER, 1998; STOODLEY et al., 1999), dependente de cada espécie de microrganismo, sendo que a formação de biofilme pode ainda ser modulada através de

Quorum Sensing (QS), um mecanismo de sinalização célula-célula mediado pelo acúmulo de moléculas sinalizadoras produzidas pela célula (MOREIRA et al., 2006).

O processo de formação de biofilme pode ser classicamente dividido em cinco estágios, descritos a seguir:

1) As bactérias planctônicas dispersas no meio se aproximam de superfícies sólidas de forma aleatória, seja através de quimiotaxia ou motilidade, e ao se aproximar em determinada distância crítica, o início da interação bactéria-substrato começa. Neste momento as forças de atração de Van der Walls, forças repulsivas eletrostáticas, interações hidrofóbicas, entre outras, estão atuando (DUNNE JUNIOR, 2002; KUMAR; ANAND, 1998);
2) As bactérias iniciam o processo de ancoragem à superfície, mediado por estruturas que conferem adesividade, tais como polímeros extracelulares, fímbrias (tipo 1 e 4) ou proteínas de membrana externa, tornando-se imobilizada na superfície. Ao final deste estágio, a bactéria encontra-se aderida irreversivelmente e inicia sua multiplicação na superfície, formando uma monocamada bacteriana (DUNNE JUNIOR, 2002; KUMAR; ANAND, 1998)
3) Após a formação da monocamada, as bactérias envolvidas iniciam a excreção de polímeros extracelulares, formando uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), envolvendo as células no interior do biofilme, fornecendo adesão e suporte estrutural (STOODLEY et al., 2002);
4) Inicia-se a formação de microcolônias (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004), onde uma matriz de estrutura tridimensional é formada, com a participação de estruturas poliméricas extracelulares. Esta estrutura é composta por pilares rodeados por canais de água que permitem os nutrientes alcançarem o interior do biofilme e permite metabólitos excretados difundirem-se para fora do mesmo (COSTERTON et al., 1995; WATNICK; KOLTER, 1999).
5) Nesta fase, pode ocorrer a dispersão bacteriana em células individuais ou em pedaços (*sloughing*) (RICHARDS; MELANDER, 2009).

A estrutura do biofilme ainda depende dos tipos de microrganismos presentes, da concentração de nutrientes, das propriedades hidrodinâmicas e presença de alguma força de

pressão. Portanto, pode variar desde uma arquitetura achatada até uma organização complexa envolvendo colunas de bactérias e EPS separadas por canais de água (forma de cogumelo). Esta última arquitetura forma-se em ambientes com ausência de forças mecânicas, abrasivas e compressivas, baixa concentração de nutrientes e alto estresse hidrodinâmico (WILSON, 2001).

Quanto a matriz do biofilme, esta ainda permite certo grau de homeostase dentro do mesmo (DAVEY; O'TOOLE, 2000) e representa uma barreira seletiva entre as células e o meio externo, sendo capaz de captar nutrientes, elevar e regular a retenção de água, conferir proteção contra a ação de biocidas e produtos tóxicos, proteger contra estresses ambientais, como variação de pH, UV, dessecação e choque osmótico, além de permitir associação com outros microrganismos (COSTERTON et al., 1994; FLEMMING, 1993). A composição do EPS varia em função da espécie, das condições de crescimento, das concentrações de oxigênio, carbono e outros fatores (STEINENBERGER; HOLDEN, 2004).

Dentro da matriz, as bactérias se desenvolvem com diferenças fenotípicas, bioquímicas e morfológicas, comparadas às planctônicas. Ito et al. (2009) demonstraram que bactérias em estágios mais avançados do biofilme (maduro) eram muito mais resistentes a antimicrobianos comparadas às bactérias em outros estágios. Verificou que essa resistência não seria devido apenas à presença de EPS que formaria uma barreira física, mas também ao surgimento de bactérias com fenótipos específicos ao longo do desenvolvimento do biofilme. Em *Pseudomonas aeruginosa*, já foi demonstrado que algumas células conhecidas como células dormentes, localizadas na região central do biofilme, são responsáveis por alguns casos de resistência aos antimicrobianos devido a este fenótipo diferenciado (HØIBY et al., 2010).

Outro benefício para as bactérias, além dos mencionados anteriormente, é que o biofilme confere proteção contra a fagocitose celular e as células que tentam fagocitar microrganismos pertencentes ao biofilme podem ocasionar mais danos ao tecido ao invés de eliminá-los (JEFFERSON, 2004).

Devido a todas estas caracteristicas, diversos gêneros são capazes de formar biofilmes e dentre eles podemos destacar *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* (BOARI et al., 2009; MATTILA-SANDHOIM; WIRTANEN, 1992; NOSTRO et al., 2007) e *Escherichia* (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; HERNANDES et al., 2013; WEISS-MUSZKAT et l., 2010).

1.5.1 Biofilme em Escherichia coli

A formação destas estruturas tem sido de importância crescente para muitas bactérias patogênicas. Já foi demonstrado que isolados de *E. coli* que apresentam o padrão de adesão agregativa (EAEC) produzem biofilme regularmente (SHEIKH et al., 2001). Outros patótipos de ECD já foram descritos produzindo essa estrutura, tais como ETEC (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005), DAEC (SHERLOCK et al., 2004), EHEC (RYU; BEUCHAT, 2004) e STEC (BISCOLA; ABE; GUTH, 2009; KUMAR; ANAND, 1998). A capacidade de formação de biofilme também foi evidenciada em *Escherichia coli* comensal (*E. coli* K-12), onde as fimbrias tipo 1 e o flagelo, são responsáveis respectivamente pela adesão inicial e a motilidade, importantes para o estabelecimento do biofilme em superfícies abióticas (PRATT; KOLTER, 1998). No entanto, Pringent-Combaret et al. (2000) verificaram que algumas amostras de *E. coli* K-12 não móveis (deletadas em *fliC*) são capazes de aderir e formar biofilmes, porém amostras incapazes de sintetizar curli (mutantes em *csgA*) tiveram sua adesão e formação de estruturas tridimensionais de biofilme completamente comprometidas.

Sheikh et al. (2001), estudando amostras de EAEC deletadas em *fliC* (mutantes em flagelina) e amostras de EAEC tratadas com manose e anticorpo contra fímbria tipo 1, verificaram que estas também não tiveram sua formação de biofilme alterada, indicando que estas duas estruturas não são tão importantes para a formação do mesmo nestas amostras.

Saldaña et al. (2009) investigaram a contribuição de fímbria curli e celulose para a aderência da amostra protótipo de EPECt (E2348/69) e de EHEC (EDL933), através de amostras mutantes. Os autores fizeram mutantes simples em celulose (gene *bcsA*) e fímbria curli (gene *csgA*), assim como mutantes duplos (*bcsA/csgA*) e verificaram que ambas estruturas são importantes para adesão das amostras, principalmente quando ambas estão presentes, indicando um sinergismo entre celulose e fímbria curli. Os mesmos autores ainda verificaram que a superexpressão de curli e celulose favorece a formação de biofilme em EHEC.

Ainda em amostras de EPECt, Moreira et al. (2006) demonstraram que EPEC forma biofilme em superfícies abióticas e em superfícies celulares pré-fixadas por períodos de até 14 dias. Seus mutantes isogênicos em *bfpA* e em *espA* formaram melhores biofilmes em relação à amostra selvagem, demonstrando serem um obstáculo para a formação de biofilme. Outros fatores de virulência que apresentaram um papel relevante foram a fímbria tipo 1 e o antígeno 43, além do sistema de *quorum sensing*.

Como amostras de EPECa não expressam a fímbria BFP, Culler (2010) investigou se estas seriam capazes de formar biofilmes mais robustos que amostras de EPECt. Em seu estudo verificou a capacidade de formação de biofilme em diversas amostras de EPECa em meio DMEM suplementado com glicose e encontrou que EPECa são capazes de formar biofilme em superfície abiótica (poliestireno e vidro) e em superfície celular (células HEp-2 pré-fixadas) a 37 ºC, havendo grande heterogeneidade quantitativa e qualitativa da formação de biofilme, principalmente após períodos de até 18 dias de incubação, independente de sorotipo, padrões de adesão à células HEp-2 e perfil de resistência a antimicrobianos das bactérias planctônicas. Weiss-Muszkat et al. (2010) também reportaram pela primeira vez a formação de biofilme em uma amostra de EPEC atípica do sorotipo O55:H7 a 26 °C, a qual apresentou elevada capacidade de formação de biofilme, além de produzir celulose e fímbria curli, podendo essas características representarem uma estratégia de sobrevivência fora do hospedeiro.

Alguns trabalhos descreveram a função de celulose (SALDAÑA et al., 2009; ZOGAJ et al., 2001), fímbria tipo curli (PRINGENT-COMBARET et al., 2001; ZOGAJ et al., 2003), fímbria tipo 1 (HERNANDES et al., 2013) e motilidade (PRATT; KOLTER, 1998, PRINGENT-COMBARET et al., 2000) como importantes estruturas na formação de biofilme por *Escherichia coli*. Esses fatores têm sido observados em linhagens de *E. coli* comensal e patogênicas, podendo estar implicados na adesão e/ou formação de biofilme, talvez por um processo multifatorial, além de apresentarem diferenças de expressão, dependendo das condições de cultivo e meios de culturas a que são expostas (HERNANDES et al., 2011; MOREIRA et al., 2006; PRATT; KOLTER, 1998; SALDAÑA et al., 2009; WEISS-MUSZKAT et al., 2010).

A fímbria tipo 1 constitui-se em um filamento protéico, sendo codificado pelo operon *fim*, o qual é composto pelos genes *fim*A, *fim*B, *fim*C, *fim*D, *fim*E, *fim*F, *fim*G, *fim*H, *fim*I (MOL; OUDEGA, 1996) os quais são responsáveis pela sua expressão e montagem. As funções de FimH como adesina manose-específica, permitem que a *E. coli* interaja especificamente com resíduos de manose em células eucarióticas, facilitando infecções como a cistite, sendo que amostras de *E. coli* que não expressavam a adesina apresentaram má formação de biofilme (PRATT; KOLTER, 1998).

Fímbria curli foi identificada primeiramente em *E. coli*, sendo produzida por outras Enterobacteriaceae , tais como *Shigella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* spp., é o principal componente protéico da matriz extracelular produzido por essas bactérias (BARNHART;

CHAPMAN, 2006). Esta fímbria é altamente conservada entre as espécies de *Salmonella* e *E. coli*, com relação à sequência de aminoácidos, organização genética e regulação de seu operon (PRINGENT-COMBARET et al., 2001).

A fímbria curli é uma proteína filamentosa, de estrutura amiloide e possui alto número de folha beta-pregueada em sua conformação terciária, (HAMMAR et al., 1995; OLSÉN et al., 2002; SALDAÑA et al., 2009). A estrutura amiloide das subunidades proteicas CsgA e CsgB da fimbria curli visualizadas *in silico* parece demonstrar uma estrutura similar à estrutura amiloide de eucariotos (CHAPMAN et al., 2002), a qual é rica em folhas-β e formam uma estrutura de cadeia β-transversal conservada, empilhadas paralelamente às fibras enquanto as folhas-β individuais são perpendiculares (SUNDE; BLAKE, 1997).

A produção de fímbria curli por *Escherichia coli* está envolvida na adesão em superfícies sólidas e abiótica, com a autoagregação celular e formação de biofilme, contribuindo para o início de sua formação, presente na fase de adesão irreversível do biofilme (BARNHART; CHAPMAN, 2006), sendo também considerado um fator de virulência (CASTONGUAY et al., 2006; PRINGENT-COMBARET et al., 2001). Em *Esherichia coli* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, fímbria curli também medeia adesão e invasão da célula hospedeira, sendo potente indutor da resposta imunológica inflamatória, além de promover persistência no meio ambiente (BOKRANZ et al., 2005; JONAS et al., 2007). A fímbria curli possui afinidade com as proteínas do soro tais como TNF-α, interleucinas e antígenos de MHC de classe I, laminina, plasminogênio e à matriz extracelular eucariótica (BIAN et al., 2000; HAMMAR et al., 1995; OLSÉN et al., 2002).

A fímbria curli é principalmente expressa quando em baixa pressão osmótica, à temperatura ambiente (abaixo de 30 °C) e durante a fase estacionária de crescimento (CASTONGUAY et al., 2006; HOUDT; MICHIELS, 2005; JONAS et al., 2007; PRINGENT-COMBARET et al., 2001; SALDAÑA et al., 2009). É composta pela subunidade principal codificada pelo gene *csgA* (curlina), influenciando cepas em sua capacidade de adesão (BARNHART; CHAPMAN, 2006; CASTONGUAY et al., 2006; PRINGENT-COMBARET et al., 2001), e é regulada pelo gene *crl*, sendo codificada pelo grupamento do gene *csg*, o qual transcreve dois operons: um transcreve os genes *csgA*, *csgB* e *csgC* e o outro transcreve os genes *csgD*, *csgE*, *csgF* e *csgG* (GOPHNA, 2001). *CsgD* é um ativador transcricional que estimula a produção de curli, além de ativar a produção de celulose (LEHNER et al., 2005; SALDAÑA et al., 2009).

A produção da fímbria curli pode ser visualizada através de cultivo das amostras em ágar contendo o corante Vermelho Congo, apresentando-se avermelhadas, secas e rugosas, característico do morfotipo rdar (*red, dry and rough)* (JONAS et al., 2007; RÖMLING et al., 2003; ZOGAJ et al., 2001).

A celulose também desempenha uma função na adesão a células epiteliais, juntamente com a fímbria curli (SALDAÑA et al., 2009). Ao se unir com a fímbria curli, este complexo pode formar uma camada hidrofóbica muito resistente às intempéries do meio externo, o qual é comparado à esporulação das bactérias Gram positivas. A presença de celulose torna a matriz mais rígida e resistente. A vantagem de se unir a fimbria curli e formar um complexo rígido na mucosa intestinal do hospedeiro, permite que as bactérias consigam manter-se por um período de tempo maior, sem sofrer segregação, dispersão e ser eliminado do hospedeiro (BARNHART; CHAPMAN, 2006; ZOGAJ et al., 2001).

A celulose é um homopolissacarídeo composto por unidades de D-glicopiranose, unidas umas às outras através de ligações glicosídicas β-1→4 (CZAJA et al., 2006). A celulose tem sido frequentemente identificada como um dos componentes da matriz polimérica extracelular em biofilmes formados por Enterobacteriaceae, tais como *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium e *Escherichia coli* (DA RE et al., 2006; FLEMMING; WINGENDER, 2010; ZOGAJ et al., 2003), que parece conferir proteção mecânica, química e biológica, facilitando a formação de biofilme (JONAS et al., 2007; ZOGAJ et al., 2001).

A celulose é polimerizada através de um complexo celulose sintase (SOLANO et al., 2002; ZOGAJ et al., 2001). A biossíntese de celulose é codificada pelo operon *bcsABZC*. O gene *bcsA* codifica celulose sintase, sendo que a função dos demais genes ainda não é completamente compreendida (JONAS et al., 2007; ZOGAJ et al., 2003). De acordo com Serra, Richter e Hengge (2013), as amostras de *E. coli* K-12 apresentam todo o aparato necessário para a expressão de celulose, porém não a expressam e a razão deste acontecimento ainda é desconhecida.

A matriz celular também é composta por outros exopolissacarídeos (EPS), ácido colânico, proteínas, podendo também ocorrer ácido desoxiribonucleico (ADN) (BELOIN, ROUX; GHIGO, 2008; FLEMMING; WINGENDER, 2010; VUONG et al., 2004).

A motilidade bacteriana é devida à presença de flagelos peritríqueos cujo filamento é formado pela polimerização de uma única subunidade proteica, a flagelina, que é codificada pelo gene *fli*C (FIELDS et al., 1997; MACNAB, 1992). A motilidade flagelar presente em

bactérias Gram negativas contribui para a virulência bacteriana e é também controlada via *quorum sensing* através de resposta a estímulos ambientais e densidade, através de auto-indutores (BARRIOS et al., 2006; FINLAY; FALKOW, 1997; PRATT; KOLTER, 1998; SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). O flagelo é um importante fator de virulência em EPEC, requerido para a motilidade e colonização do hospedeiro (SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002). A expressão dos genes flagelares é regulada em resposta a diversos sinais ambientais e são regulados temporalmente e divididos hierarquicamente em classe I, classe II e classe III. Os genes de classe I codificam o regulador principal, FlhDC, que ativa a transcrição dos genes de classe II, FlgM e FliA. FliA, regula a transcrição dos genes de classe III, sendo um deles *fliC*, que codifica a flagelina (CHILCOTT; HUGHES, 2000).

Pratt e Kolter (1998) verificaram que a motilidade de *E. coli* é crítica para a formação de biofilme, principalmente na adesão inicial, assim como na colonização de áreas adjacentes à superfície de adesão.

A formação de biofilme é afetada pela disponibilidade de nutrientes e fatores ambientais, como temperatura e atmosfera (DEWANTI; WONG, 1995). Dentre amostras de *E. coli*, o uso de diferentes temperaturas e meios de cultivo bacteriano, por exemplo, agar CFA (*colonization fator antigen*), meio T (Triptona) ou YESCA (*Yeast Extract Casamino Acids*) podem ocasionar diferentes expressões da fímbria curli (BOKRANZ et al., 2005; COLLINSON et al., 1991; OLSEN; JONSSON; NORMARK, 1989; UHLICH et al., 2006).

Meios de cultivo com baixa concentração de NaCl favorecem a expressão de *csgD*, que por sua vez aumenta a expressão de celulose e fímbria curli em *E. coli* K-12 (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013). Em *Salmonella*, a proteína Crl tem seus níveis aumentados na fase exponencial e estacionária em meio LB sem NaCl a 28 °C (ROBBE-SAULE et al., 2006).

Amostras de EAEC apresentaram maior formação de biofilme após incubação a 37 °C por 24 horas em meio DMEM com alta concentração de glicose (alta osmolaridade), entretanto não formaram biofilme quando cultivadas em caldo LB, BHI, TSB, Nutriente e Müeller-Hinton (SHEIKH et al., 2001), mostrando que diferentes condições influenciam a formação deste, assim como também foi verificado por Jesus et al. (2005). Ainda em relação ao meio DMEM, sabe-se que este favorece a expressão de fatores de virulência em EPEC a 37 °C (BUSTAMANTE et al., 2001; MOREIRA et al., 2006). Portanto, dependendo das condições e meios de cultura em que as amostras se encontram terão diferentes perfis na expressão de alguns genes e, dentre eles, os citados acima.

A amostra de *E. coli* K12 BW25113 apresentou maior formação de biofilme em meio YESCA e em meio LB com alta concentração de NaCl, do que em meio LB, após 24 horas de incubação a 28 °C. No entanto, após 16 horas de incubação, houve maior formação de biofilme apenas no meio LB. Estes resultados indicam que além dos diferentes meios de cultivo, o tempo em que os microrganismos permanecem em contato com determinados nutrientes também influencia a formação de biofilme (SHIMADA et al., 2012).

Hancock, Witsø e Klemm (2011) verificaram que a amostra de *E. coli* 83972 apresentou maior formação de biofilme em LB do que nos outros três meios empregados (meios mínimos: MOPS e ABTG; e urina humana). Já a amostra de *K. pneumoniae* i222-89 apresentou maior formação de biofilme em urina humana, e as amostras de *E. coli* Nissle 1917 e *E. coli* F-18 em meio mínimo MOPS. Porém, a amostra de EHEC 413/89-1 apresentou baixa formação de biofilme em todos os meios estudados. Estes resultados indicam mais uma vez que as amostras possuem diferentes capacidades de formação de biofilme, dependentes da condição de cultivo.

Oh et al. (2007) verificaram que amostras de EHEC O157:H7 formaram biofilme em superfície de vidro de acordo com a concentração de nutrientes disponíveis, sendo que em meios com baixos níveis de nutriente (M9), o biofilme foi desenvolvido mais rapidamente em relação ao meio rico LB, além de ser mais espesso.

Em trabalho de Prouty, Schweisinger e Gunn, (2002) foi verificado que amostras de *Salmonella* crescidas em caldo LB e TSB suplementados com sais biliares, aumentaram a formação de biofilme quando comparados com os caldos sem suplementação. Em EPEC, sais biliares aumentaram a adesão deste patótipo à células epiteliais (JESUS et al., 2005).

A bile é um líquido verde amarelado que contém ácidos biliares, colesterol, fosfolipídios e o pigmento bilirrubina, sendo produzida por hepatócitos, estocada na vesícula biliar e liberada no duodeno (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006). Sabe-se que EPEC coloniza o intestino delgado (SPERANDIO et al., 2003) e que possivelmente entra em contato com os sais biliares liberados na mesma porção intestinal. Portanto, possivelmente EPEC pode ser influenciada por este tipo de substância.

No trato gastrointestinal humano, EPEC é exposta a várias condições de estresse, tais como choque pelo ácido gástrico e sais biliares (JESUS et al., 2005). Bernstein et al. (1999) reportaram que a exposição bacteriana a estes últimos induz genes específicos de estresse em *E. coli*, sugerindo que a expressão alterada destes genes podem promover adesão à células do epitélio intestinal. Jesus et al. (2005) demonstraram que os fatores que elevam a adesão

causada por estresse ácido foi aumentada em quase duas vezes, dependente das condições de cultivo, sugerindo que essas condições influenciam na expressão de adesinas, responsáveis pelo aumento na adesão.

1.5.2 Ensaios empregados para verificar a formação de biofilme

Na última década, foram descritos vários ensaios para estudo da formação de biofilme *in vitro* (DONLAN; COSTERTON, 2002). Estes são divididos em ensaios de quantificação da biomassa do biofilme (baseado na quantificação da matriz, células vivas e mortas), ensaios de viabilidade (baseado na quantificação de células viáveis através de contagem de UFC, seja por plaqueamento ou por corantes específicos) e ensaios de quantificação de matriz (baseado na coloração específica de componentes de matriz) (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

A técnica de contagem de UFC/cm^2 é dependente de habilidade de manuseio do operador e por isso passível de erro devido à calibração incorreta de equipamentos, grande demanda de material, é uma metodologia exaustiva e devido à presença de grumos bacterianos, a contagem pode ser prejudicada (HANNIG et al., 2010, PETTIT et al., 2005), porém permite mensurar a quantidade de bactérias viáveis/mL e estudar a população destas em diferentes condições de cultivo, além de ser uma metodologia barata. No entanto, apresenta a desvantagem de detectar somente as células viáveis e cultiváveis, ou seja, aquelas capazes de formar colônias e muitas vezes as bactérias presentes dentro do biofilme podem não se replicar, prejudicando o cálculo (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Já a técnica através de coloração com cristal violeta, a qual mensura a quantidade de corante retida no material estudado é uma metodologia que permite obtenção de resultado relativamente rápido, não faz uso de uma quantidade abundante de material, grumos bacterianos não influenciam no resultado final, e permite estudar as amostras em diferentes condições ambientais, porém não permite diferenciar bactérias viáveis, mortas e componentes da matriz, ou seja, quantifica o biofilme como um todo. Deste modo, não permite analisar a resistência de bactérias a determinados compostos, como por exemplo, a presença de antimicrobianos (DANESE; PRATT; KOLTER, 2000; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Outra metodologia muito empregada e de baixo custo é o corante resazurina (Alamar Blue), que indica de maneira indireta, através da absorbância proporcional ao número de microrganismos metabolicamente ativos, a quantidade de bactérias viáveis. Este ensaio de viabilidade é baseado na redução da resazurina por células ativas metabolicamente. É um

composto azul que pode ser reduzido a resorufina tornando-se rosa, o qual é fluorescente (NAVES et al., 2010). É muito utilizado em ensaios de susceptibilidade de microrganismos a antimicrobianos. O corante, 5-ciano-2,3-ditolil cloreto de tetrazólio (CTC) e 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido (XTT) (MCCLUSKEY; QUINN; MCGRATH, 2005), são também muito utilizados. As principais desvantagens destes corantes é que são muito caros.

Essas metodologias são empregadas em microplacas de titulação de poliestireno ou de outros materiais, podendo se empregar lamínulas de vidro em microplacas de 24 poços, para assim serem testados diferentes tipos de superfícies. A microplaca de fundo chato é a mais empregada (HERNANDES et al., 2013; MOREIRA et al., 2006; NAVES et al., 2010; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007; SHEIKH et al., 2001; STEPANOVIC et al., 2000), no entanto deve-se levar em conta o fenômeno de sedimentação microbiana nos fundos dos poços.

Outro tipo de microplaca que vem sendo utilizada há pouco tempo para o estudo de biofilme por alguns grupos de pesquisa (CERI et al., 2001; LU; COLLINS , 2007; SEPANDJ et al., 2004), principalmente em ensaios de determinação de concentração mínima de eliminação de biofilme de antimicrobianos, desinfetantes, biocidas e metais contra biofilmes formados é a microplaca de poliestireno contendo pinos nas tampas, denominada sistema tipo MBEC – “Minimum biofilm eradication concentration” ou dispositivo de Calgary e que foi desenvolvida no Canadá por Ceri et al. (1999). Nesse dispositivo, o biofilme é formado nos pinos presentes nas tampas da microplaca, sendo embebidos por meio de cultura, eliminando assim a situação de sedimentação bacteriana no fundo dos poços. A quantificação da formação de biofilme pode ser realizada através de ensaio de coloração com cristal violeta (JOHNSON et al., 2013; MAMPEL et al., 2006) ou de contagem de UFC após rompimento por sonicação das bactérias aderidas aos pinos (CERI et al., 2001).

A formação de biofilme por bactérias também pode ser estudada qualitativamente através de ensaio de formação de anel (película) na interface ar-líquido-vidro ou plástico, dependendo do material. Nesse caso, a adesão bacteriana e desenvolvimento de biofilme ocorrem na parede do tubo, na região próxima à superfície do meio, podendo também ocorrer formação de película viscosa e rígida na superfície do meio de cultura, com produção de matriz exopolissacarídica (HERNANDES et al., 2013; LEHNER et al., 2005). Nesse ensaio, não há interferência da sedimentação das bactérias sobre a superfície de aderência.

Contudo, as técnicas de contagem de UFC e de medidas de absorbância após coloração com cristal violeta por exemplo, não permitem uma visualização direta do biofilme e sim valores de unidades formadoras de colônia (UFC/cm^2) e valores de DO (Densidade Óptica) respectivamente. Sendo assim, metodologias que apresentam a possibilidade de visualização da estrutura do biofilme formado também são constantemente utilizadas para a obtenção de imagens da estrutura tridimensional deste (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A aplicação da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) trouxe uma nova percepção da estrutura e função dos biofilmes microbianos (LAWRENCE et al., 1991). Anteriormente à utilização desta metodologia, a forma de visualização da estrutura em questão era possível somente através de microscópio eletrônico ou até mesmo microscópio óptico, a qual apresentava a possibilidade de análise de material após fixação das amostras que eram desidratadas. A visualização da arquitetura tridimensional das comunidades bacterianas foi possível através da metodologia de CLSM (COSTERTON et al.,1995). Atualmente, diversas metodologias empregam CLSM para verificar a estrutura do biofilme e mesmo quantificar bactérias viáveis das inviáveis (utilizando corantes específicos), como por exemplo, após tratamento com antimicrobianos (ITO et al., 2009), porém é difícil dizer ao certo o número exato de bactérias devido a grande proximidade que estas estão dentro de um biofilme.

CLSM se baseia na visualização de corantes fluorescentes (conjugados ou não a proteínas), ligados a componentes celulares ou constituintes do biofilme e visualização destes por uso de um apropriado comprimento de onda (ARNOLD; GROßMANN; BAUMANN, 2010). A essencial característica deste tipo de microscopia é a possibilidade de visualização de imagem onde a geometria do sistema possa ser alterada de modo que o plano focal passe a ter diferentes profundidades, dependente do alcance da luz difusora. Através de *softwares* que forneçam capacidades técnicas de processamento de imagens, estas podem ser sobrepostas originando-se assim fotos em três dimensões (ARNOLD; GROBMAN; BAUMANN, 2010; NEUT et al., 2005; WIMPENNY et al., 2000). CLSM ainda permite o estudo de biofilmes completamente hidratados e vivos (LAWRENCE; NEU 2003). Fornece informações simultâneas sobre estruturas 3D de biofilmes e identidade de diferentes componentes (NEU; WOELFL; LAWRENCE, 2004).

Dentre alguns corantes usados em CLSM, está o corante iodeto de propídio (IP), que tem baixa carga e, portanto uma alta afinidade por DNA, penetrando apenas em células danificadas (mortas) (DECKER, 2001; HANNIG et al., 2010) corando em vermelho as

bactérias do biofilme. Syto9 também possui afinidade com o DNA, sendo utilizado para estudar a composição e morfologia de biofilmes (LAWRENCE; NEU; SWERHONE, 1998; STRATHMANN; WINGENDER; FLEMMING, 2002). Como DNA é também uma parte significativa da matriz extracelular, esta coloração proverá informação sobre biomassa total do biofilme (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um dos corantes muito utilizados, os quais permitem conjugação com as proteínas, sendo o marcador fluorescente mais comumente usado para conjugar proteínas via grupo amina. Ele reage com grupos de proteínas com terminal amino ou aminas primárias (GOLIM et al., 2007), sendo assim este pode ser conjugado a faloidinas. Faloidinas pertencem a dois grupos de pequenas moléculas orgânicas que se ligam a actina e por isso tem sido usada amplamente para estudar, por exemplo, o papel da actina em processos biológicos e como modelos para proteínas ligantes de actina (COOPER, 1987).

Outros corantes amplamente utilizados são aqueles que permitem serem utilizados em conjunto para identificar ao mesmo tempo bactérias viáveis e inviáveis devido a afinidades a diferentes estruturas e por apresentarem diferentes comprimentos de onda quando excitados por um comprimento de onda especifico, como por exemplo, o corante *Live and Dead* (FLEMMING et al., 2009).

No entanto, todos os ensaios apresentam limitações, como diminuição da coloração e perda da fluorescência dependendo do tempo e atividade metabólica dos microrganismos testados (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Uma microscopia que possibilita a visualização de detalhes específicos é a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013). As desvantagens desta técnica são: a completa dessecação das amostras, ser trabalhosa e demorada (NEUT et al., 2005), apresentar alto custo e necessitar de preparo através de carbonização e metalização, a qual pode desestruturar os biofilmes a serem observados. Apesar de seus pontos negativos, MEV possibilita obter informações da estrutura de biofilmes, como células bacterianas e seus produtos, apresentando-se eficaz pela obtenção de imagens precisas (SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013).

Portanto, devido aos reduzidos estudos na literatura sobre o perfil da capacidade de formação de biofilme em EPEC atípica, um estudo global de seus sorotipos se faz necessário. No presente trabalho, 23 amostras de EPEC atípicas, de diferentes sorotipos e de padrões de adesão às células epiteliais HEp-2, foram avaliadas quanto à formação de biofilme em

diferentes meios de cultivo, assim como duas temperaturas de incubação: 26 º C e 37 ºC, simulando um ambiente de interação bacteriana com o ambiente (estratégia de sobrevivência, representando uma fonte de transmissão) e com o hospedeiro, respectivamente.

Devido a sua possível relação com a presença de alguns casos de diarreia persistente, é de extremo interesse aprofundar os conhecimentos na patogênese do processo de formação de biofilme deste patógeno, conhecendo os possíveis genes envolvidos e as condições de crescimento ideais para o estabelecimento de biofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

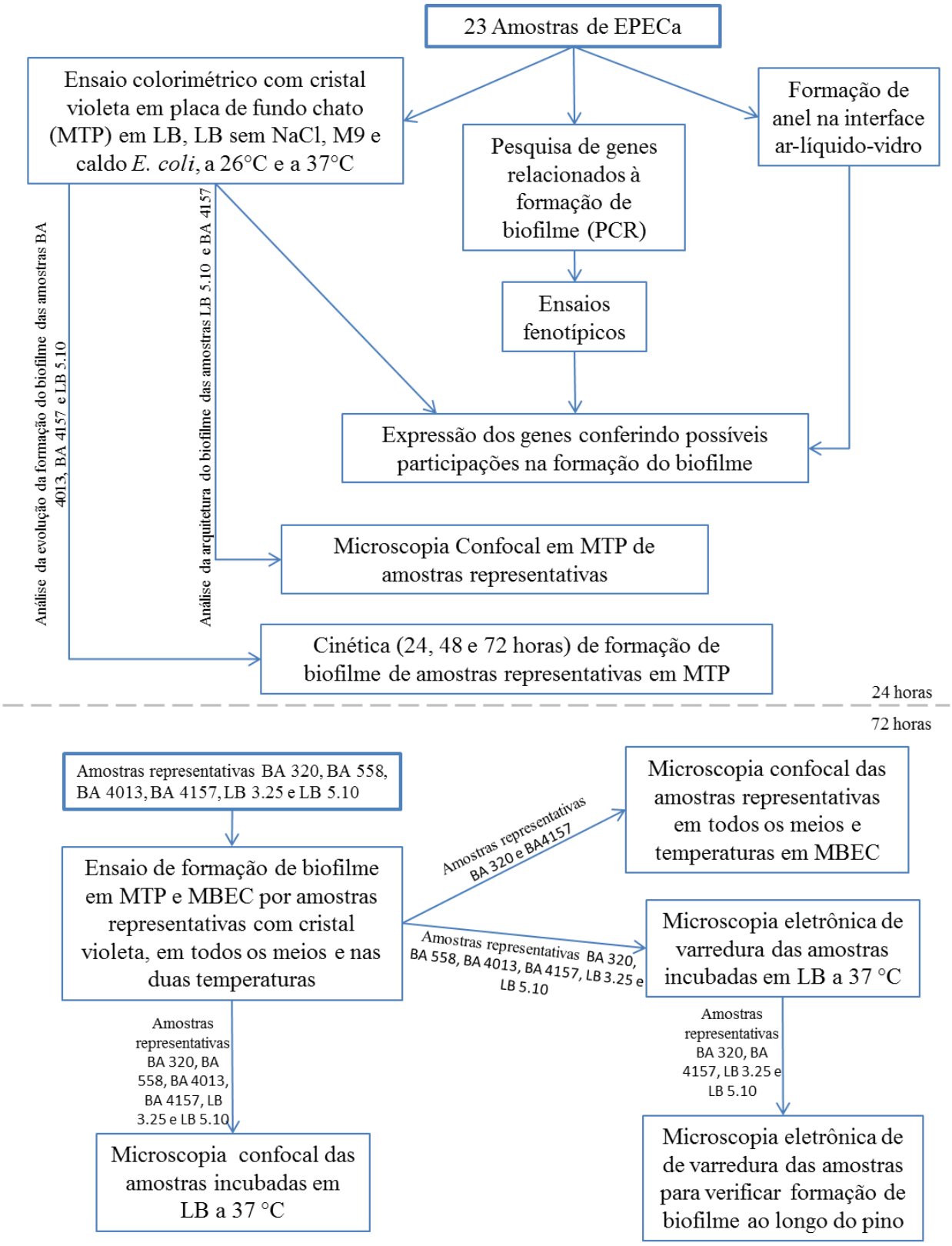
- Estudar a influência de diferentes condições de cultivo na formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica, relacionando possíveis características fenotípicas e pesquisa de possíveis genes relacionados a este processo.

2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença dos genes possivelmente associados com a formação de biofilme: *cgs*A e *crl* (fímbria curli), *fim*H (fímbria tipo I) e *bcs*A (celulose).
- Verificar a produção das fímbrias tipo I, fímbria curli e de celulose, além da motilidade.
- Investigar a capacidade das amostras de EPEC atípicas de formarem biofilme em microplacas de fundo chato e de formarem anel na interface ar-líquido-vidro após 24 horas de incubação, empregando diversas condições de cultivo.
- Avaliar a formação de biofilme de uma amostragem representativa de EPEC atípicas em microplacas de fundo chato (MTT) e em microplacas MBEC após 72 horas de incubação, empregando diversas condições de cultivo.
- Analisar qualitativamente a presença de estruturas em biofilmes de EPECa através das metodologias de Microscopia Confocal de Fluorescência (CLSM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental



3.2 Amostras

Foram analisadas 19 amostras de EPEC atípicas isoladas de crianças com diarreia no estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda em Salvador-Bahia (PRONEX) (BA) previamente caracterizadas por apresentarem o gene *eae* e não apresentarem o plasmídio EAF e os genes de virulência que caracterizam os outros patótipos de *E. coli* diarreiogênicas (BUERIS et al., 2007), assim como não expressarem BFP (ABE et al., 2009; NARA et al., 2009). Em adição, quatro amostras de EPEC atípicas da Coleção Bacteriológica do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (LB) foram incluídas no estudo (MAIRENA et al., 2004) (**Tabela 1**). A amostra protótipo de EAEC 042-sorotipo O44:H18 (NATARO et al., 1985) foi empregada como referencial de alta capacidade de formação de biofilme, enquanto a amostra de *E. coli* DH5α (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) foi empregada como referencial de baixa capacidade. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* da Coleção Bacteriológica foi empregada no ensaio de aglutinação.

Todas as amostras bacterianas foram mantidas em caldo Tripticaseína de soja (TSB) acrescido de glicerol a 80%, sendo armazenadas a -20 °C e -80 °C.

Tabela 1. Amostras de EPECa utilizadas neste estudo com seus respectivos sorotipos e padrão de adesão a células HEp-2. Amostragem representativa em destaque foi submetida aos ensaios de 72 horas, microscopia confocal e microscopia de varredura.

Amostra	Sorotipo	Adesão em HEp-2	Amostra	Sorotipo	Adesão em HEp-2
BA 92	O2:H16	AA	BA 2482	O119:H11	AA
BA 320	**O55:H7**	**ALL**	BA 2991	O34:H-	NA
BA 558	**O111:H40**	**AL**	BA 3378	O104:H2	ALL
BA 1244	O55:H7	ALL	**BA 4013**	**O88:H-**	**NA**
BA 1444	O115:H8	IND	BA 4147	O55:H7	ALL
BA 1738	O80:H26	NA	**BA 4157**	**ONT:H25**	**AA**
BA 1887	O111:h38	IND	BA 4182	O125:H6	IND
BA 2062	O171:h48	IND	**LB 3.25**	**O26:H11**	**ALL**
BA 2103	O26:H11	ALL	LB 13.15	O119:H2	ALL
BA 2145	O105:H7	AA	**LB 5.10**	**O55:H7**	**ALL**
BA 2459	O26:H11	IND	LB 19.2	O128:H2	AA
BA 2468	ONT:H19	NA			

AA = adesão agregativa; ALL = adesão localizada-like; IND = adesão indeterminada; NA = não aderente.
Fonte: Abe et al. (2009), Bueris et al. (2007) e Mairena et al. (2004).

3.3 Pesquisa dos genes *cgs*A, *crl*, *fim*H e *bcs*A

As técnicas gerais de manipulação e análise de DNA foram realizadas de acordo com metodologias previamente descritas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A presença dos genes *cgs*A, *crl*, *fim*H e *bcs*A foi pesquisada nas amostras em estudo através da técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Esses genes foram escolhidos por serem relatados como importantes para a formação de biofilme em diversos trabalhos. O DNA molde foi obtido conforme descrito a seguir: uma alçada do crescimento bacteriano, obtida a partir de cultivo em Ágar Luria Bertani (LBA), foi transferida para um microtubo contendo 300 µL de água ultrapura estéril, submetidos à fervura por 10 minutos e imediatamente colocados em banho de gelo. As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 µL, com os seguintes componentes: 10 mM Tris-HCl (pH8,3), 200 µM da mistura de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1,5 mM $MgCl_2$, 25 pmol de cada um dos iniciadores, 1,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Foster City, CA, EUA) e 1 µL do DNA molde, completando o volume com água ultrapura estéril. Na **Tabela 2**, encontra-se a sequência dos oligonucleotídeos para esses genes e o tamanho dos fragmentos. As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) programado para 94 °C por 5 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, temperatura de anelamento (**Tabela 2**) por 1 minuto, 72° por 1 minuto e um ciclo final de 72ºC por 7 min. Nas **Figuras 1**, **2**, **3** e **4** encontram-se os géis de agarose com os produtos da PCR amplificados com os iniciadores da **Tabela 2**.

Os géis de agarose foram preparados dissolvendo-se a agarose (Invitrogen™, Foster City, CA, EUA) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM ácido etilenodiaminotetracético) por aquecimento, numa concentração final de 1,5%. 10 µL das amostras de DNA amplificadas foram misturadas a 2 µL de tampão de amostras para DNA (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 30% de glicerol). Foi utilizado o marcador de peso molecular *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen™, Foster City, CA, EUA). A migração foi realizada sob voltagem de 70 V (volts) em tampão TAE. Após o encerramento da eletroforese, os géis foram corados em solução de Gel Red (Biotium, Hayward, CA, EUA) (1 µL da solução de Gel Red 10.000X diluído em 45 mL de água destilada complementado com 900 µL de NaCl 5M), durante 30 minutos. Os géis foram observados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com o auxílio do sistema de captação de imagem AlphaImager®2200 (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, EUA).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores para os genes *cgs*A, *crl*, *fimH* e *bcsA* temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos.

Gene	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
***csg*A**	F - GGCGGAAATGGTTCAGATGTTG	65	295	**BIAN et al., 2000**
Fimbria curli	R - CGTATTCATAAGCTTCTCCCGA			
crl	F - TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	55	250	**MAURER et al., 1998**
Gene regulador da Fimbria curli	R - CTTCAGATTCAGCGTCGTC			
***fim*H**[a]	F - ACGAGTTATTACCCTGTTTGCTG	63	508	**Este trabalho**
Fímbria tipo 1	R - GCCAGTAGGCACTACCACATC			
***bcs*A**[b]	F - AGTTGCGGTATCGGTAGAA	50	502	**Este trabalho**
Celulose	R - AATAAACGATACAACCCAGG			

[a]GenBank n° FJ865781.1; [b]GenBank AE005174.2; pb – pares de base; F – Foward; R – Reverse.

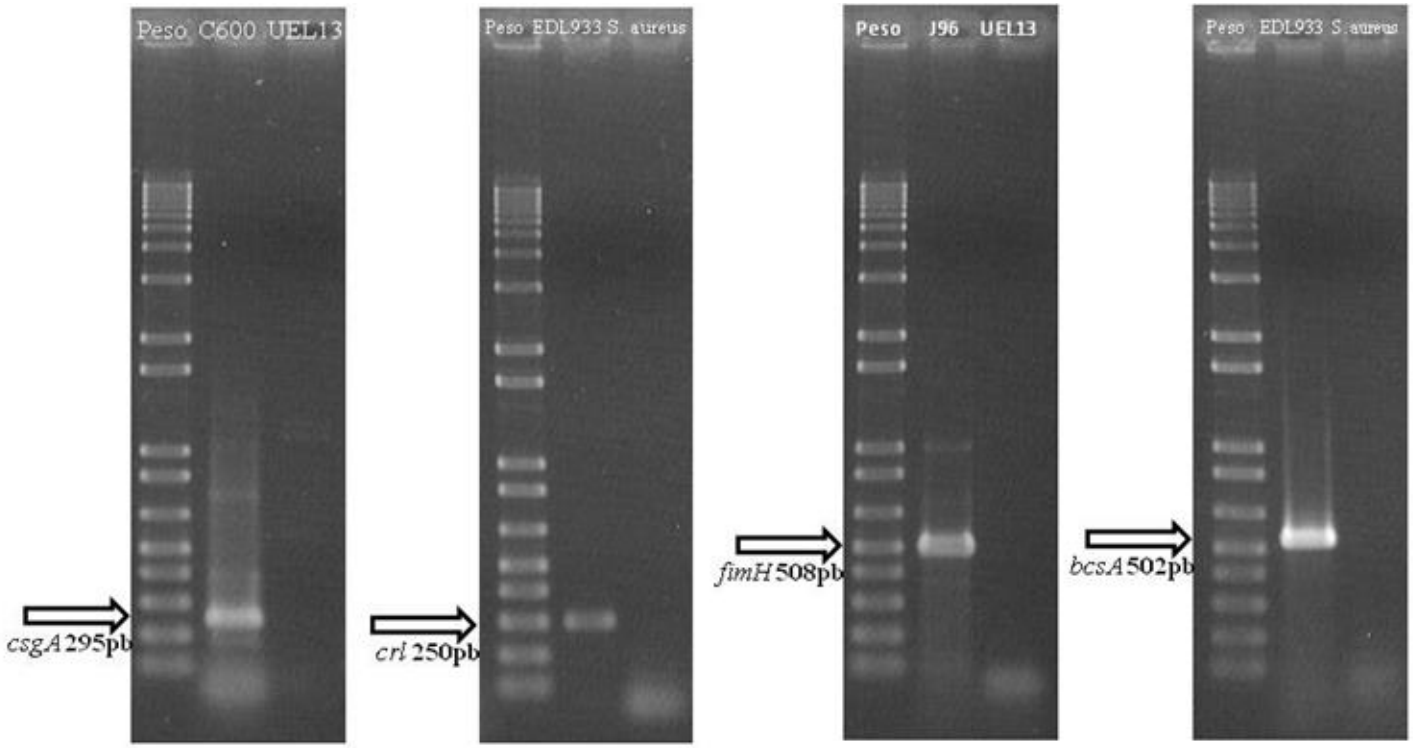


Figura 1 **Figura 2** **Figura 3** **Figura 4**

Figuras 1, 2, 3 e 4. Presença dos genes *csgA, crl, fimH,* e *bcsA* em gel de agarose a 1,5%. Na canaleta "Peso", peso molecular *1 kb Plus DNA Ladder*. Nas canaletas medianas encontram-se os controles positivos para os respectivos genes. Na última canaleta, seus respectivos controles negativos.

3.4 Ensaios fenotípicos

3.4.1 Expressão da fimbria tipo 1

A capacidade de produção da fímbria tipo 1 por amostras de EPECa foi analisada através de sua habilidade em aglutinar leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sobre superfície de lâminas de vidro, conforme Schembri et al. (2005), com modificações. As 23 amostras de EPECa foram cultivadas previamente por 18 horas a 37 °C em TSB numa diluição de 1:100. Em seguida, foram inoculadas em TSB com e sem 1% D-manose numa diluição de 1:100 e incubadas por 24 horas, sob a mesma temperatura. Para confirmar se a aglutinação é devido ao reconhecimento específico de resíduos manosídicos presentes na superfície de *Saccharomyces cerevisiae*, as amostras de EPECa crescidas com D-manose não devem aglutinar na presença das leveduras pois não terão fimbrias tipo 1 disponíveis para ligar nos resíduos manosídicos das leveduras. Após o período de incubação, 10 µL do inóculo bacteriano foram homogeneizados com uma colônia da levedura *Saccharomyces cerevisae*, crescida previamente em ágar tripticaseina de soja (TSA), sobre lâmina de vidro contra um fundo escuro, por um período máximo de 1 minuto e meio, até serem visualizados agregados, indicando a produção da fímbria tipo 1. A ligação específica à D-manose será positiva caso a bactéria possua fímbrias manose-sensíveis (BRITO et al., 2004; KORHONEN, 1979).

Portanto, as amostras que aglutinaram com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na ausência de D-manose formando grumos, foram consideradas positivas. Aquelas que não aglutinaram e não formaram grumos visíveis foram consideradas negativas.

3.4.2 Expressão da fímbria curli

Para verificar a produção de fímbria curli, foi seguida a metodologia descrita por Castonguay et al. (2006). As 23 amostras de EPECa foram cultivadas previamente por 18 horas a 37 °C em TSB numa diluição de 1:100. Após este período, as amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo ágar 2%, 40 µg/mL de corante Vermelho Congo (Merck, Darmstadt, Bundesland, Alemanha), 1% ácido casamino; 0,15% extrato de levedura e 0,005% sulfato de magnésio. Após a incubação a 26 ^{o}C por 48 horas seguidas de incubação por mais 24 horas a 37 ^{o}C, foi observada a expressão fenotípica da fímbria curli. As amostras que apresentaram colônias com coloração avermelhada foram consideradas positivas e as que

apresentaram colônias esbranquiçadas foram consideradas negativas para a expressão da fímbria curli.

3.4.3 Produção de celulose

A verificação da produção de celulose foi realizada de acordo com o método descrito por Römling et al. (2003). As amostras bacterianas foram previamente cultivadas em TSB a 37 °C por 18 horas numa diluição 1:100. Após este período, as amostras foram semeadas em meio LB (Luria Bertani) sem sal, pois permite maior expressão de celulose (BARNHART; CHAPMAN, 2006; WEISS-MUSKAT et al., 2010) complementado com 1,5% de ágar e contendo 50 μM do corante Calcofluor (Fluorescent Brightener 28 – Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), o qual é específico para polímeros de glicosídeos que contém ligações β[1-4] ou β[1-3], sendo rotineiramente empregados para a detecção presuntiva de celulose bacteriana (UDE et al., 2006).

A indicação da produção de celulose é verificada através da observação de colônias bacterianas fluorescentes sob uma fonte ultravioleta (UV) de 366 nm após 24 horas de incubação a 37 °C (RÖMLING et al., 2003), pois o Calcofluor é um corante dicroico ou seja, ele absorve um comprimento de onda e emite outro comprimento diferente.

Assim, este corante se liga à celulose formando pontes de hidrogênio com grupamentos hidroxila livres emitindo luz fluorescente mediante fonte UV (BENZIMAN et al., 1980).

3.4.4 Ensaio de motilidade

A motilidade das amostras de EPECa foi verificada de acordo com a metodologia empregada por Sperandio, Torres e Kaper (2002), com alterações. As amostras bacterianas foram cultivadas previamente em TSB a 37 °C por 18 horas numa diluição de 1:100. Após este período, 10 μL do pré inóculo foram pipetados no centro de placas de petri contendo 0,3% de ágar bacteriológico, 1% de triptona e 0,25% de NaCl e incubados a 37 °C, realizando leitura após 24 horas. O halo de crescimento bacteriano além do ponto de inoculo foi medido em milímetros, quando presente, sendo classificado como móvel (+) e altamente móvel (++). As amostras imóveis, que cresceram apenas no ponto de inóculo, não se disseminando sobre a superfície do ágar, foram denominadas negativas (-).

3.5 Ensaios de formação de biofilme

3.5.1 Ensaio colorimétrico com cristal violeta

Após as etapas anteriores, foi realizada a análise quantitativa da formação de biofilme das 23 amostras de EPECa em microplacas de poliestireno de fundo chato (MTP – *Microtiter plate*), empregando os seguintes meios de cultura: caldo LB com e sem NaCl, meio mínimo M9 e caldo *E. coli*, e sob as temperaturas de 26 ºC e 37 ºC, e por um período de 24 horas de incubação, seguindo a metodologia descrita por Sheikh et al. (2001), com algumas modificações. Os pré-inóculos foram cultivados por 18 horas a 37° C, em caldo tripticaseína de soja (TSB), em condições estáticas. Os cultivos bacterianos foram inoculados posteriormente em cada um dos meios e em temperaturas de incubação mencionados acima, numa diluição de 1:100 respectivamente em placas de poliestireno de 96 poços (TPP, Suiça), em volume final de 200 µL. Após 24 horas de incubação, foram feitas 3 lavagens com tampão fosfato (PBS) (NaCl 136,9 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM; pH 7,4) para remoção das bactérias planctônicas. O biofilme foi pré-fixado com 200 µL de etanol a 75% por 10 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as bactérias foram coradas com 200 µL de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. O corante foi removido e após 3 lavagens com PBS, as placas foram secas e posteriormente adicionados 200 µL de etanol 95% em cada poço, para solubilização do corante durante 2 minutos à temperatura ambiente. Foram transferidos 150 µL de cada poço para uma nova placa de microtitulação de poliestireno para leitura da absorbância a 595 nm no leitor de ELISA Multiskan®EX (Thermo Fisher Scientific, Hudson, New Hampshire, EUA). Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e em três repetições, sendo experimentos independentes e obtendo-se os valores médios de DO a 595 nm. Em cada ensaio foram incluídas as amostras controle DH5α (baixa capacidade de formar biofilme) e EAEC 042 (alta capacidade de formar biofilme).

Para a interpretação do teste, as amostras bacterianas foram classificadas de acordo com Stepanović et al. (2000) em quatro categorias distintas em relação à amostra DH5α, empregada como referencial de baixa capacidade de produção de biofilme, a serem visualizadas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Categorias e classificação dos níveis de formação de biofilme por amostras de EPECa de acordo com Stepanović et al. (2000).

Categorias	Classificação
Ausência de Formação de Biofilme	$DO_{Amostra} \leq DO_{DH5\alpha}$
Baixa Formação de Biofilme	$DO_{DH5\alpha} < DO_{Amostra} \leq 2(DO_{DH5\alpha})$
Formação Intermediária de Biofilme	$2(DO_{DH5\alpha}) < DO_{Amostra} \leq 4(DO_{DH5\alpha})$
Alta Formação de Biofilme	$DO_{Amostra} > 4(DO_{DH5\alpha})$

3.5.2 Ensaio de formação de anel na interface ar-líquido-vidro

Após a análise das 23 amostras através do ensaio descrito na seção 3.5.1, este ensaio foi realizado para verificar a capacidade de formação de biofilme das 23 amostras de EPECa na interface ar-líquido-vidro em diferentes meios de cultivo e tentar relacioná-las com o perfil genético e fenotípico das amostras.

A formação de uma estrutura na conformação de anel na interface ar-líquido-vidro pelas 23 amostras de EPECa foi verificada de acordo com a metodologia empregada por Lehner et al. (2005). As 23 amostras foram cultivadas previamente por 18 horas a 26° C e a 37° C em TSB numa diluição de 1:100. Após este período, as amostras foram inoculadas em 5 mL dos seguintes meios: caldo LB com e sem NaCl, meio mínimo M9 e caldo *E. coli*, numa diluição de 1:100, sendo incubadas tanto a 26° C quanto à 37° C, sob a agitação de 210 rotações por minuto (rpm) durante um período de 48 horas. Após a incubação foi observada a presença de uma estrutura na conformação de anel nas laterais do tubo.

A simples presença ou ausência deste material foi utilizada para inferir o potencial da capacidade ou incapacidade de formação de biofilme.

3.5.3 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em microplaca de fundo chato (MTP) em quatro meios de cultivo

Este ensaio foi realizado para analisar qualitativamente a arquitetura dos biofilmes através da microscopia confocal de fluorescência das amostras de EPECa LB 5.10 e BA 4157, e comparar com os resultados de formação de biofilme em microplaca de fundo chato (seção 3.5.1). Foi empregada a metodologia descrita por Cleary et al. (2004), com modificações. Foram utilizadas placas de 24 poços com lamínulas empregando os seguintes meios: caldo LB

com e sem NaCl, meio mínimo M9 e caldo *E. coli*, e sob as temperaturas de 26 ºC e 37 ºC por 24 horas de incubação, obtendo o inóculo inicial conforme a seção 3.5.1.

Após o término do período de incubação nas diferentes condições, todos os poços da placa foram lavados 3 vezes com PBS 1X. Em seguida, as bactérias foram fixadas com *p*-Formaldeído 4% em PBS 1X, por 18 horas a 4 °C. Após este período, as bactérias foram lavadas 5 vezes com PBS 1X e, em seguida, permeabilizadas pela adição de Triton X-100 a 0,1% em PBS 1X, por 5 minutos e lavadas com PBS por 3 vezes. Em seguida, as preparações foram coradas com uma solução de PBS/BSA 0,2% acrescida de 25 µL de iodeto de propídio (IP) (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) em uma concentração final de 1:1000. Em cada lamínula foram aplicados 25 µL da solução de iodeto de propídeo, sendo estas incubadas por 45 minutos sob abrigo da luz e novamente lavadas com PBS 1X, por 5 vezes. As lamínulas foram fixadas sobre lâminas de vidro com Mowiol (Clariant, Sulzbach, Hessen, Alemanha). Após 24 horas a 4 °C, as lâminas foram observadas através de microscópio confocal de fluorescência, no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, em aumento de 1000X, utilizando microscópio LSM 510 Meta (Zeiss, Heidelberg, Baden-Württemberg, Alemanha), com filtro 570-719 e comprimento de onda 543 nm para IP.

3.5.4 Cinética da formação de biofilme em microplaca de fundo chato (MTP), através do ensaio com cristal violeta

Após o ensaio inicial de formação de biofilme, foi selecionado o meio que propiciou a melhor formação de biofilme em cada temperatura para realização de uma cinética, com a finalidade de verificar a evolução da formação de biofilme nas amostras selecionadas.

As amostras de EPECa BA 4013, BA 4157 e LB 5.10, além das amostras controles DH5α e EAEC 042 foram ensaiadas para a formação de biofilme em microplaca de fundo chato e analisadas quantitativamente através do ensaio colorimétrico com cristal violeta, seguindo a metodologia descrita por Sheikh et al. (2001), com algumas modificações (seção 3.5.1). Os meios empregados foram: caldo LB sem NaCl e caldo *E. coli*, e sob as temperaturas de 26 ºC e 37 ºC respectivamente. Os períodos de incubação foram de 24, 48 e 72 horas, sendo realizada a troca total do meio de cultivo a cada 24 horas. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e em três repetições, sendo experimentos independentes e obtendo-se os valores médios de DO a 595nm.

3.5.5 Ensaio colorimétrico com cristal violeta em placa de fundo chato (MTP) e em Dispositivo de Calgary (MBEC) após 72 horas de incubação

As amostras utilizadas para a realização deste ensaio foram selecionadas a partir do ensaio colorimétrico com cristal violeta (seção 3.5.1), sendo selecionadas 6 amostras (BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10) com valores variados de Densidade Óptica (DO). As amostras DH5α e EAEC 042 foram utilizadas como controle, sendo todas analisadas em triplicata e em três repetições. As amostras foram ensaiadas paralelamente em MBEC (Nunc, Roskilde, Condado de Roskilde, Dinamarca) e MTP (TPP, Suiça) para comparar a formação de biofilme entre os dois tipos de placas (**Anexo B**).

O tempo de incubação empregado foi de 72 horas, efetuando-se trocas de meio a cada 24 horas (ensaio "quasi estático"), utilizando os seguintes meios: caldo LB com e sem NaCl, meio mínimo M9 e caldo *E. coli*, e sob as temperaturas de 26 ºC e 37 ºC.

O ensaio de biofilme em MTP foi realizado conforme a seção 3.5.1, excetuando que o período de incubação foi de 72 horas.

Para a análise da formação de biofilme em Dispositivo de Calgary (MBEC) foi realizada a metodologia descrita por Ceri et al. (1999), com modificações e adaptando a metodologia descrita por Sheikh et al. (2001) (seção 3.5.1), para coloração com cristal violeta. Os pré-inóculos foram cultivados por 18 horas a 37° C, em caldo tripticaseína de soja (TSB), em condições estáticas. Os cultivos bacterianos foram inoculados posteriormente em cada um dos meios mencionados acima, numa diluição de 1:100 respectivamente em placas de MBEC em volume final de 180 µL. Os meios de cultura foram totalmente substituídos a cada 24 horas. Após 72 horas de incubação, a tampa de MBEC foi transferida para outra parte inferior de placa de microtitulação para não ter interferência de material depositado no fundo do poço. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com PBS para remoção das bactérias planctônicas, não aderidas ao pino, através da imersão dos pinos em poços de microplacas contendo PBS. O biofilme foi pré-fixado com 180 µL de etanol a 75% por 10 minutos a temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as bactérias foram coradas com 180 µL de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. O corante foi removido e após 3 lavagens com PBS os pinos foram secos, e posteriormente adicionados 180 µL de etanol 95% em cada poço para solubilização do corante durante 2 minutos à temperatura ambiente. Foram transferidos 150 µL de cada poço para uma nova placa de microtitulação de poliestireno para leitura da absorbância a 595

nanômetros (nm) no leitor de ELISA Multiskan®EX. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas. Em cada ensaio foram incluídas as amostras DH5α e EAEC 042.

3.5.6 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em Dispositivo de Calgary (MBEC)

As amostras foram selecionadas a partir do ensaio de MBEC realizado na seção 3.5.5, com o intuito de analisar qualitativamente a estrutura do biofilme nos anéis formados na parte superior do pino da placa de MBEC.

A amostra representativa de baixa capacidade de formação de biofilme (BA 320) e a amostra representativa de alta capacidade de formação de biofilme (BA 4157), além das amostras controles DH5α e EAEC 042 foram ensaiadas para a formação de biofilme em placa de MBEC, empregando os meios de cultura: LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e a 37 °C por um período de 72 horas de incubação e foram analisadas através de microscopia confocal de fluorescência conforme metodologia descrita por Cleary et al. (2004), com modificações.

Após a incubação de 72 horas, realizando trocas de meio de cultura a cada 24 horas, a tampa da placa de MBEC com seus pinos contendo bactérias aderidas e formando biofilmes foram lavados com 180 µL de PBS 1X por 3 vezes. Em seguida, bactérias aderidas aos pinos foram fixadas com *p*-Formaldeído 4% em PBS, por 18 horas a 4 °C. Após este período, os pinos foram lavados 5 vezes com PBS 1X ficando submersos 2 minutos/lavagem e, em seguida, permeabilizadas pela adição de Triton X-100 a 0,1% em PBS, por 5 minutos e lavados com PBS 1X por 3 vezes, deixando os pinos submersos por 2 minutos/lavagem. Em seguida, os pinos foram retirados das microplacas, acondicionados em microtubos e estocados em 150 µL de Mowiol contendo iodeto de propídio em uma concentração final de 1:1000. Após 24 horas a 4 °C, os pinos foram observados através de microscópio confocal de fluorescência, no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, em aumento de 1000X, utilizando microscópio LSM 510 Meta, com filtro 570-719 e comprimento de onda 543 nm para IP.

Este ensaio foi realizado para observar qualitativamente o perfil de capacidade de formação de biofilme das amostras representativas testadas. A imagem positiva para a formação de biofilme em estágio maduro apresenta-se com estruturas sobressaindo-se da camada bacteriana aderida aos pinos.

3.5.7 Microscopia eletrônica de varredura

Este ensaio foi realizado com o objetivo de visualizar a aderência bacteriana e formação de biofilme nos pinos, assim como a presença de estruturas participantes na formação de biofilme.

As amostras de EPECa: BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 5.10 e LB 3.25, além das amostras controles DH5α e EAEC 042, foram ensaiadas para formação de biofilme em meio de cultura LB a 37 °C, em microplacas MBEC, através de microscopia eletrônica de varredura conforme metodologia descrita por Knutton (1995), com modificações. Após 72 horas de incubação, realizando trocas de meio de cultura a cada 24 horas, os pinos contendo bactérias aderidas e formando biofilmes foram retirados das microplacas, acondicionados em microtubos, sendo então fixados com uma solução de glutaraldeído a 3,0% em tampão cacodilato 0,1 M. As preparações foram lavadas por 3 vezes de 10 minutos no tampão cacodilato 0,1 M e foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. Após 15 minutos à temperatura ambiente, as preparações foram lavadas três vezes de 5 minutos com água destilada e foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (50, 75, 85, 95 e 100% - 10 minutos em cada solução). Após secagem completa do material, realizada pelo método de ponto crítico do gás carbônico (Leica EM CPD03, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), as preparações foram colocadas em um suporte apropriado para o microscópio de varredura e receberam uma fina camada de ouro (Sputtering Leica EM SCD050, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) para posteriormente serem observadas em MEV (Quanta 250, FEI Company, Eindhoven, Holanda), operando em 10 kV e distância de trabalho 9 mm, no Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan.

Através desta metodologia também foi realizada a microscopia eletrônica de varredura das partes inferior (ponta), mediana e superior dos pinos para verificar a formação de biofilme conforme este se aproxima da interface ar-líquido. Foram selecionadas 4 amostras, BA 320, BA 4157, LB 5.10 e LB 3.25.

3.5.8 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em Dispositivo de Calgary (MBEC) em LB a 37 °C

Este ensaio foi realizado com a finalidade de analisar as diferenças na arquitetura do biofilme em meio LB a 37 °C. As amostras ensaiadas foram as mesmas da seção 3.5.7., conforme a metodologia descrita na seção 3.5.6.

3.6 Análise estatística

Foi realizada a análise estatística dos valores de DO 595nm obtidos através do ensaio colorimétrico com cristal violeta das 23 amostras de EPEC atípicas empregando Anova de dois fatores de medidas repetidas, no programa SPSS ("Statistical Package for the Social Sciences"), quando possível. O teste foi aplicado às amostras submetidas à incubação por 24 horas em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, sob as temperaturas de 26 °C e 37 °C. As amostras também foram submetidas à análise estatística através do teste-T de Student quando necessário.

4 RESULTADOS

As 23 amostras de EPEC atípicas, 19 isoladas do estudo epidemiológico sobre a etiologia da diarreia aguda em Salvador-Bahia (PRONEX – BA) e 4 pertencentes a Coleção Bacteriológica do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, foram analisadas neste estudo.

4.1 Presença dos genes *csg*A, *crl*, *fim*H e *bcs*A

A presença das sequências genéticas da principal subunidade da fímbria curli - a curlina (*csg*A); do regulador da fimbria curli (*crl*); da fimbria tipo 1 (*fim*H) e da celulose (*bsc*A) foram analisadas por PCR e estão apresentados na **Tabela 4**. Na **Tabela 2** e nas **Figuras 1 a 4** encontram-se os dados de cada um dos genes mencionados acima.

O gene *csgA* foi detectado somente nas amostras BA 92, BA 558, BA 1444, BA 1738, BA 2062 e BA 2468, enquanto que as outras 17 amostras (73,9%) foram negativas para esse gene. O gene *crl*, regulador da fímbria curli e o gene *bcsA* (celulose sintase) foram detectados nas 23 amostras (100%). O gene *fimH* não foi amplificado apenas na amostra BA 558.

Tabela 4. Presença de genes para fímbria curli, fímbria tipo I e celulose em 23 amostras de EPECa.

Amostras	**Fímbria Curli**		**Fimbria tipo I**	**Celulose**
	(*csg*A)	**(*crl*)**	**(*fim*H)**	**(*bcsA*)**
BA 92	+	+	+	+
BA 320	-	+	+	+
BA 558	+	+	-	+
BA 1244	-	+	+	+
BA 1444	+	+	+	+
BA 1738	+	+	+	+
BA 1887	-	+	+	+
BA 2062	+	+	+	+
BA 2103	-	+	+	+
BA 2145	-	+	+	+
BA 2459	-	+	+	+
BA 2468	+	+	+	+
BA 2482	-	+	+	+
BA 2991	-	+	+	+
BA 3378	-	+	+	+
BA 4013	-	+	+	+
BA 4147	-	+	+	+
BA 4157	-	+	+	+
BA 4182	-	+	+	+
LB 3.25	-	+	+	+
LB 13.15	-	+	+	+
LB 5.10	-	+	+	+
LB 19.2	-	+	+	+
N° total	**6**	**23**	**22**	**23**
%	**26**	**100**	**95,6**	**100**

4.2 Expressão dos genes *csg*A, *crl*, *fim*H e *bcs*A

4.2.1 Expressão da fímbria curli

Na **Figura 5,** está ilustrada uma amostra positiva para a expressão da fímbria curli (BA 320) e uma amostra negativa para esta fímbria (BA 92). A amostra positiva apresentou uma coloração avermelhada devido à adsorção do corante Vermelho Congo na fímbria, indicando um resultado positivo enquanto a amostra negativa apresentou uma coloração mais clara.

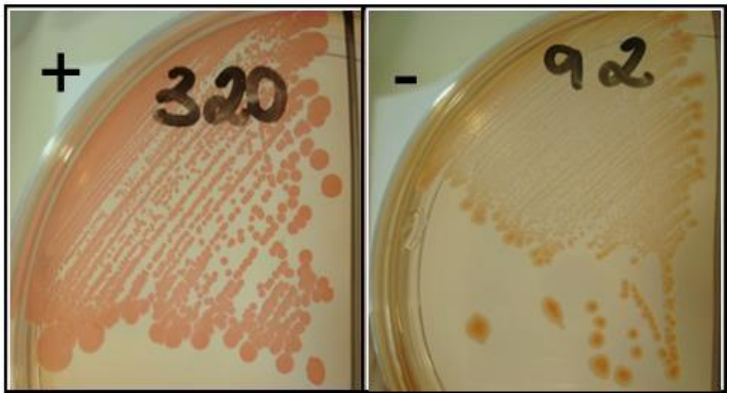


Figura 5. Ensaio de expressão da fímbria curli em ágar Vermelho Congo. Amostra positiva (BA 320) apresentando colônias avermelhadas e amostra negativa (BA 92), com colônias mais claras.

A produção da fímbria *curli* foi verificada em 11 (47,8%) amostras de EPECa, quando cultivadas em ágar contendo o corante Vermelho Congo (**Tabela 5**).

Tabela 5. Expressão da fímbria curli em ágar Vermelho Congo por 23 amostras de EPECa.

Amostras	**Expressão da fímbria curli**
BA 92	-
BA 320	+
BA 558	-
BA 1244	-
BA 1444	+
BA 1738	+
BA 1887	+
BA 2062	-
BA 2103	-
BA 2145	+
BA 2459	+
BA 2468	+
BA 2482	-
BA 2991	-
BA 3378	+
BA 4013	-
BA 4147	+
BA 4157	+
BA 4182	+
LB 3.25	-
LB 13.15	-
LB 5.10	-
LB 19.2	-
Total de amostras positivas	**11**
%	**47,8**

4.2.2 Expressão da fímbria tipo 1

Na **Figura 6**, podemos observar a aglutinação da amostra BA 4157 com leveduras (*Sacharomyces cerevisae*) devido à expressão da fímbria tipo 1, apresentando aglomerados celulares envoltos por um meio translúcido. A amostra BA 558 representa o resultado negativo, onde é possível visualizar somente um líquido com aspecto leitoso.

Figura 6. Ensaio de aglutinação das amostras BA 4157 (positiva) e BA 558 (negativa) na presença da levedura *Sacharomyces cerevisae*.

Os resultados das 23 amostras ensaiadas através do teste de aglutinação com leveduras podem ser visualizados na **Tabela 6**. Através deste teste foi observado que 16 dentre as 23 amostras de EPECa (69,6%) aglutinaram na presença da *Sacharomyces cerevisae*, sendo os resultados confirmados pela ausência de aglutinação quando as amostras foram pré incubadas em TSB contendo 1% de manose.

Tabela 6. Expressão da fímbria tipo 1 por 23 amostras de EPECa, através do ensaio de aglutinação.

Amostras	Expressão da fímbria tipo I
BA 92	+
BA 320	+
BA 558	-
BA 1244	+
BA 1444	+
BA 1738	-
BA 1887	+
BA 2062	+
BA 2103	+
BA 2145	+
BA 2459	-
BA 2468	-
BA 2482	+
BA 2991	-
BA 3378	-
BA 4013	+
BA 4147	+
BA 4157	+
BA 4182	+
LB 3.25	+
LB 13.15	-
LB 5.10	+
LB 19.2	+
Total de amostras positivas	**16**
%	**69,6**

4.2.3 Produção de celulose

A visualização da ausência ou presença de celulose está demonstrada na **Figura 7**. O corante Calcofluor é incorporado à matriz extracelular (EPS) e faz com que a cepa apresente uma coloração fluorescente, sendo considerado assim um resultado presuntivo positivo.

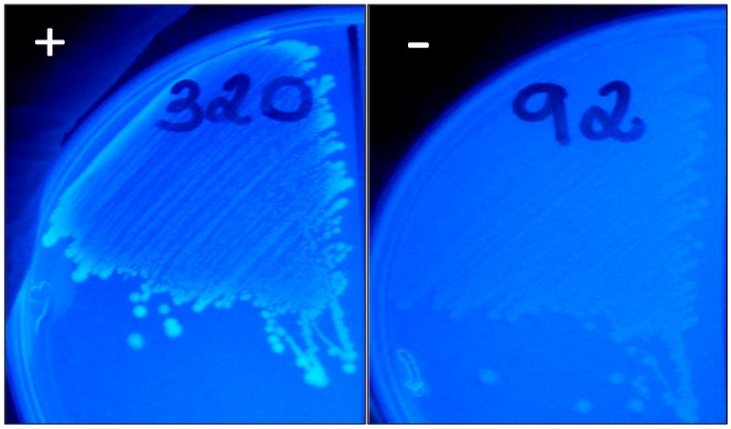


Figura 7. Amostra de EPECa BA 320 (esquerda) positiva para expressão de celulose, apresentando colônias fluorescentes sob uma fonte de luz ultravioleta de 366 nm e amostra EPECa BA 92 negativa (direita), não fluorescente. Placas de ágar contendo LB sem NaCl com Calcofluor.

Como podemos visualizar na tabela **Tabela 7**, apenas 13 amostras de EPECa (56,5%) apresentaram a produção de celulose.

Tabela 7. Expressão de celulose em ágar Calcofluor por 23 amostras de EPECa.

Amostras	Expressão de celulose
BA 92	-
BA 320	+
BA 558	-
BA 1244	+
BA 1444	+
BA 1738	+
BA 1887	+
BA 2062	+
BA 2103	-
BA 2145	+
BA 2459	+
BA 2468	-
BA 2482	-
BA 2991	-
BA 3378	+
BA 4013	-
BA 4147	+
BA 4157	+
BA 4182	+
LB 3.25	-
LB 13.15	+
LB 5.10	-
LB 19.2	-
Total de amostras positivas	**13**
%	**56,5**

4.2.4 Presença de motilidade

De acordo com a **Tabela 8**, 18 (78,3%) amostras de EPECa apresentaram motilidade, sendo que 5 (21,7%) apresentaram-se imóveis (BA 92, BA 2103, BA 2468, BA 2991 e BA 4013). As amostras positivas (+) apresentaram um halo de até 30 milímetros enquanto que amostras altamente móveis (++) apresentaram um halo maior que 30 milímetros. Os símbolos utilizados foram simplesmente para efeito de distinção visual do tamanho do halo.

Tabela 8. Presença ou ausência de motilidade nas 23 amostras de EPECa.

Amostras	Motilidade	Halo (mm)
BA 92	-	0
BA 320	+	10
BA 558	++	46
BA 1244	++	49
BA 1444	++	30
BA 1738	+	18
BA 1887	+	16
BA 2062	+	11
BA 2103	-	0
BA 2145	+	9
BA 2459	+	7
BA 2468	-	0
BA 2482	++	31
BA 2991	-	0
BA 3378	+	12
BA 4013	-	0
BA 4147	+	8
BA 4157	+	14
BA 4182	++	30
LB 3.25	+	12
LB 13.15	++	30
LB 5.10	++	55
LB 19.2	++	56
Total de amostras positivas	**18**	**-**
%	**78,3**	**-**

Na **Tabela 9**, encontra-se o perfil de cada amostra para a expressão das quatro diferentes estruturas (fímbria curli, fímbria tipo 1, celulose e flagelo) descritas acima. A maioria das amostras (7) apresentou as quatro estruturas, 4 apresentaram fímbria tipo 1 e motilidade, 3 apresentaram fímbria curli, celulose e motilidade, 3 apenas fímbria tipo 1, 2 apresentaram fímbria tipo 1, celulose e motilidade, 1 apresentou celulose e motilidade, 1 apresentou apenas motilidade, 1 apenas fímbria curli e apenas uma amostra foi negativa para todos os genes.

Tabela 9. Perfil das amostras de EPECa para a expressão dos genes *csgA*, *crl*, *fimH* e *bcsA*

Fenótipo	Amostras							Total
Fímbria tipo 1, fímbria curli, celulose e motilidade	BA 320	BA 1444	BA 1887	BA 2145	BA 4147	BA 4157	BA 4182	7
Fímbria tipo 1 e flagelo	BA 2482	BA 3.25	BA 5.10	BA 19.2				4
Fímbria curli, celulose e motilidade	BA 1738	BA 2459	BA 3378					3
Fímbria tipo 1	BA 92	BA 2103	BA 4013					3
Motilidade, fímbria tipo 1 e celulose	BA 1244	BA 2062						2
Celulose e Motilidade	LB 13.15							1
Fímbria curli	BA 2468							1
Só flagelo	BA 558							1
Ausência de fenótipo	BA 2991							1

4.3 Ensaio colorimétrico com cristal violeta das 23 amostras de EPECa no período de 24 horas de incubação em diferentes condições de cultivo em placas de fundo chato (MTP)

Após a análise do perfil genético e fenotípico das amostras, foi realizado o ensaio colorimétrico com cristal violeta para verificar a formação de biofilme em placas de MTP e através do ensaio de formação de anel na interface ar-líquido-vidro, em diferentes meios de cultivo e temperaturas. Estes ensaios foram relacionados à expressão da fímbria curli, fímbria tipo 1, celulose e motilidade.

Foram utilizados meios de cultivo e temperaturas diferentes com o propósito de analisar a influência de diferentes nutrientes e condições na formação de biofilme. Este teste foi realizado com o objetivo de verificar o perfil das amostras em estudo com relação à capacidade de aderir e possivelmente formar biofilme em superfície abiótica.

Esta metodologia é um teste indireto que mensura a capacidade de formação de biofilme de acordo com a ligação do corante cristal violeta às bactérias vivas, mortas, moléculas carregadas negativamente e aos polissacarídeos da matriz (EPS) (LI; YAN; XU, 2003).

Nos **Gráficos 1** e **2**, estão representadas as 23 amostras de EPECa cultivadas em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C e 37 °C, respectivamente.

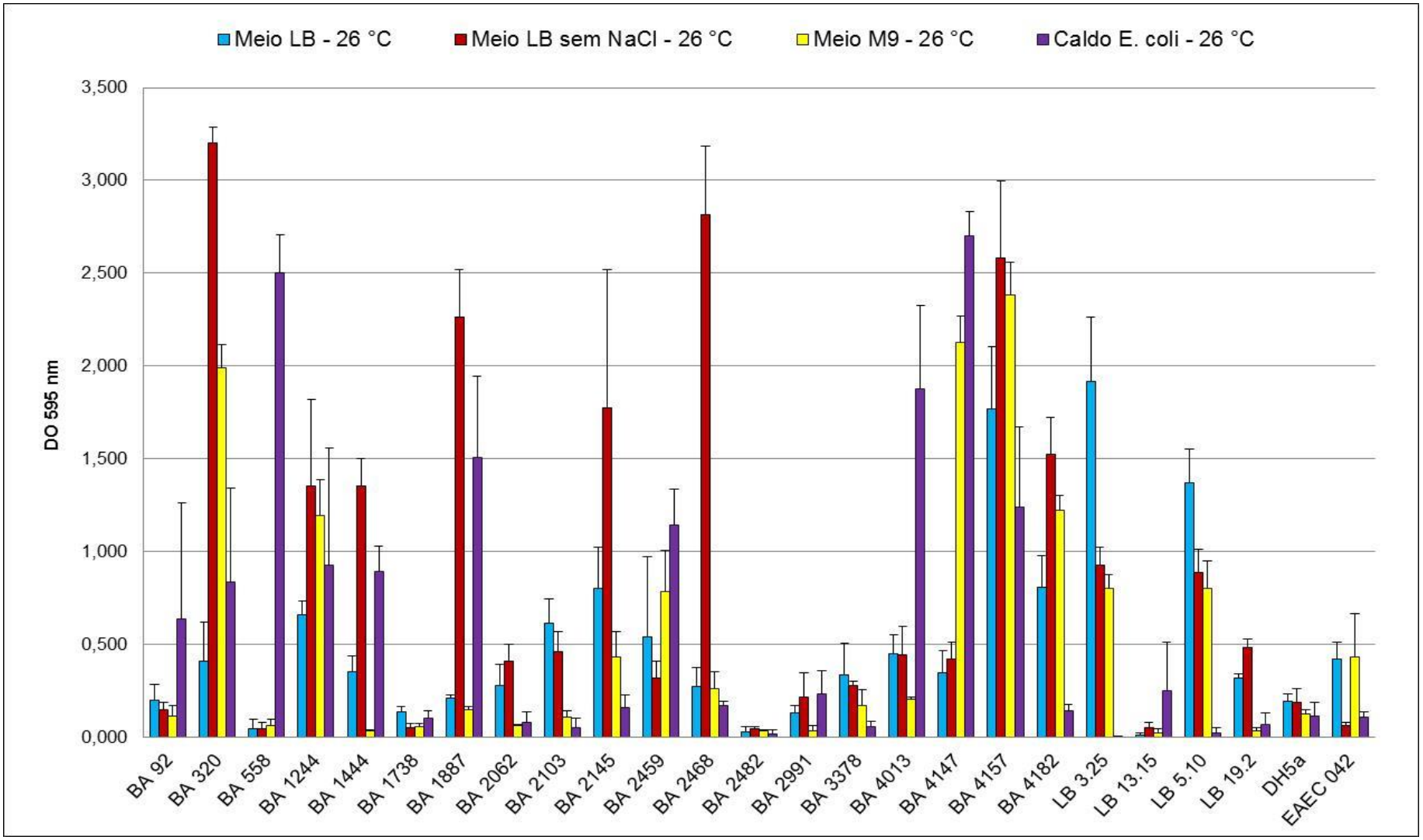


Gráfico 1. Capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa utilizando o ensaio colorimétrico com cristal violeta. Incubação em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C por 24 horas.

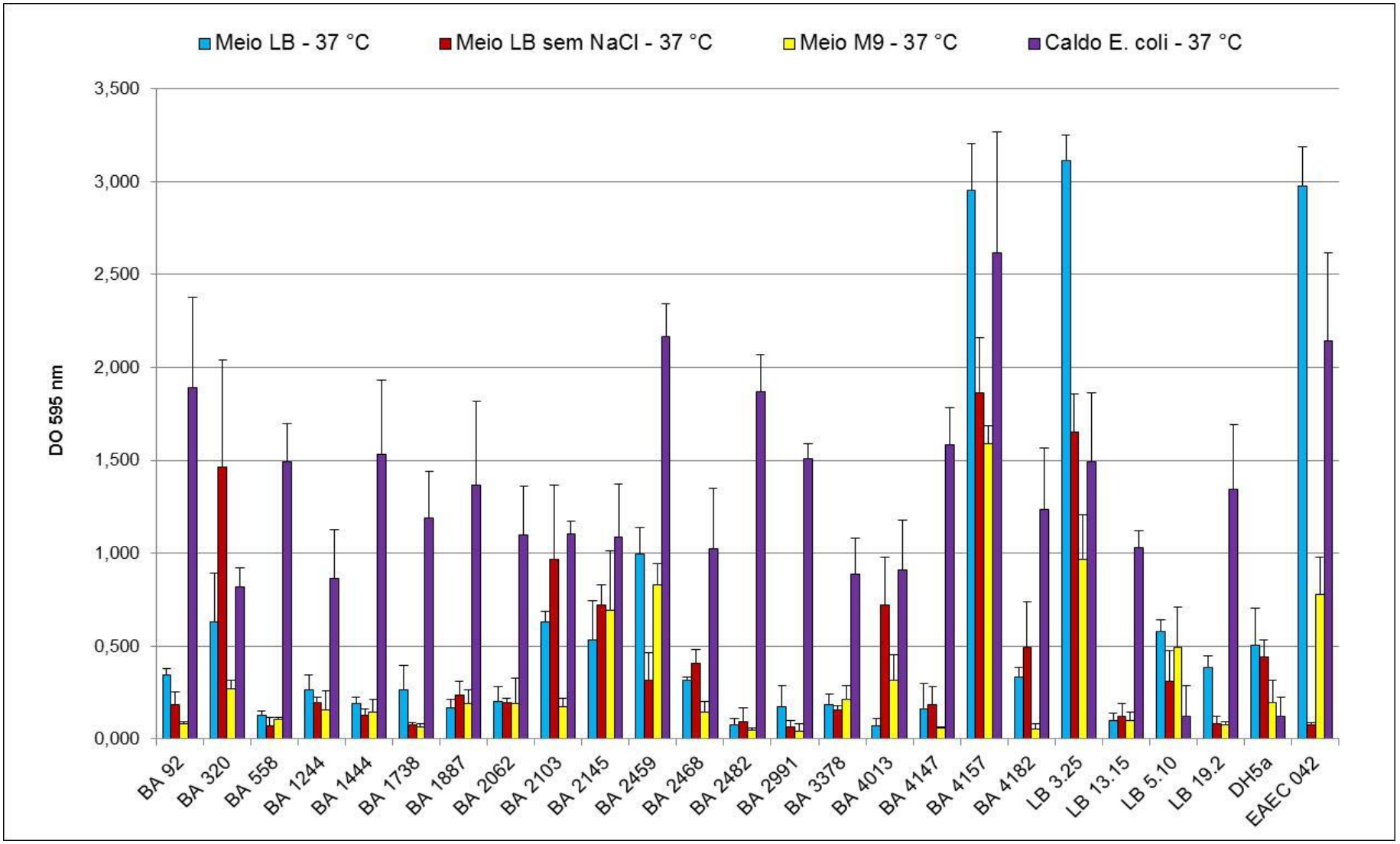


Gráfico 2. Capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa utilizando o ensaio colorimétrico com cristal violeta. Incubação em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C por 24 horas.

Nos ensaios a 26 °C, analisando as 23 amostras de forma geral em relação à capacidade de formação de biofilme, o meio LB sem NaCl significativamente permitiu uma maior capacidade de formação de biofilme das amostras ($p<0,05$), enquanto os outros meios não apresentaram diferença significativa entre si ($p>0,05$).

Nos ensaios a 37 °C, todos os meios apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) quanto aos resultados de formação de biofilme quando comparados entre si, com exceção dos meios LB e LB sem NaCl, que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) (**Tabela 10**).

Tabela 10. Diferenças estatísticas da formação de biofilme por 23 amostras de EPECa, através do ensaio com cristal violeta, nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, após incubação a 26 °C e a 37 °C.

	26 °C	Estatística*		37 °C	Estatística*
LB	LB sem NaCl	$p<0,05$	LB	LB sem NaCl	$p>0,05$
	M9	$p>0,05$		M9	$p<0,05$
	Caldo *E. coli*	$p>0,05$		Caldo *E. coli*	$p<0,05$
LB sem NaCl	M9	$p<0,05$	LB sem NaCl	M9	$p<0,05$
	Caldo *E. coli*	$p<0,05$		Caldo *E. coli*	$p<0,05$
M9	Caldo *E. coli*	$p>0,05$	M9	Caldo *E. coli*	$p<0,05$

* ANOVA com dois fatores de medidas repetidas

Porém, quando as amostras são comparadas através da estratificação da capacidade de formação de biofilme de acordo com Stepanović et al. (2000), o número de amostras em caldo *E. coli* no nível "Alta Formação de Biofilme" foi superior em relação aos outros meios (**Tabela 11**). A estratificação de cada amostra de EPECa encontra-se na **Tabela 13**, juntamente com os resultados de formação de anel.

Tabela 11. Classificação da formação de biofilme por 23 amostras de EPECa, através de ensaio com cristal violeta após 24 horas de incubação.

	LB	LB sem NaCl	M9	caldo *E. coli*	Classificação
26 °C	5 (21,7%)	5 (21,7%)	10 (43,5%)	10 (43,5%)	Formação de Biofilme Ausente
	8 (34,9%)	3 (13,1%)	0	2 (8,7%)	Pouca Formação de Biofilme
	5 (21,7%)	5 (21,7%)	3 (13%)	0	Intermediária Formação de Biofilme
	5 (21,7%)	10 (43,5%)	10 (43,5%)	11 (47,8%)	Alta Formação de Biofilme
	18 (78,3%)	18 (78,3%)	13 (56,5%)	13 (56,5%)	Formação de Biofilme Presente
37 °C	17 (74%)	16 (69,7%)	15 (65,3%)	1 (4,3%)	Formação de Biofilme Ausente
	4 (17,3%)	3 (13%)	3 (13%)	0	Pouca Formação de Biofilme
	0	3 (13%)	2 (8,7%)	0	Intermediária Formação de Biofilme
	2 (8,7%)	1 (4,3%)	3 (13%)	22 (95,7%)	Alta Formação de Biofilme
	6 (26%)	7 (30,3%)	8 (34,7%)	22 (95,7%)	Formação de Biofilme Presente

Conforme o **Gráfico 3**, visualiza-se a média dos valores de DO da massa total do biofilme do grupo das 23 amostras de EPECa, para cada meio de cultivo e temperatura. A 26 °C, a massa do biofilme foi maior em meio LB sem NaCl, enquanto os outros meios foram similares entre si. Porém, a 37 °C o meio que mais se destacou foi o caldo *E. coli*, sendo que os outros meios foram mais semelhantes entre si.

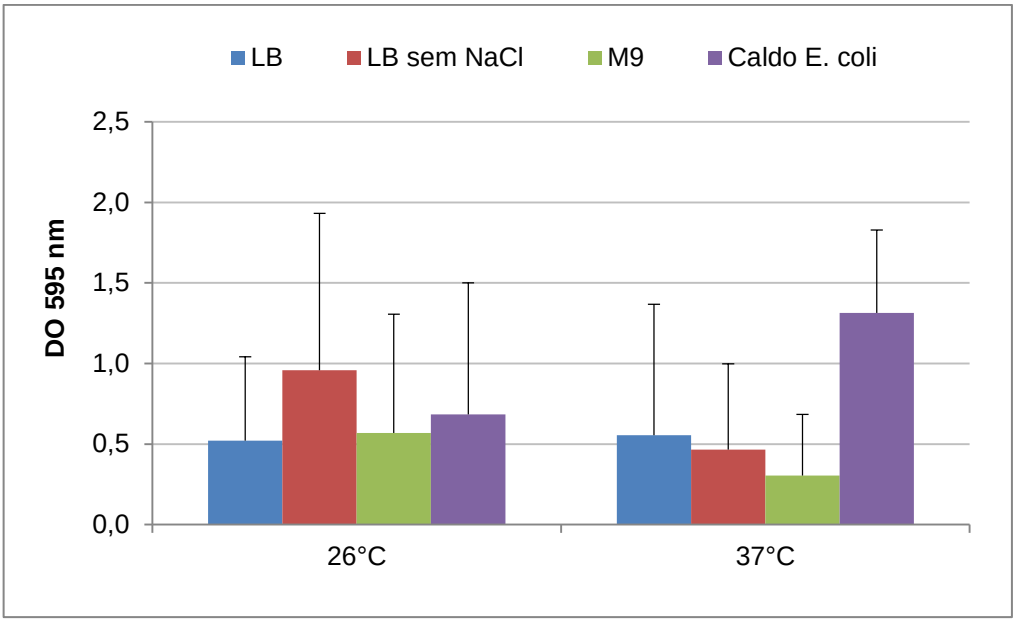


Gráfico 3. Massa de biofilme das 23 amostras de EPECa em diferentes condições de cultivo.

Através da estratificação da capacidade de formação de biofilme destas amostras conforme Stepanović et al. (2000), o meio que propiciou maior capacidade de formação de biofilme a 37 °C foi o caldo *E. coli* (**Tabela 11**), sendo que 22 amostras foram agrupadas no nível "Alta Formação de Biofilme" e uma no nível "Formação de Biofilme Ausente". Estes resultados se correlacionam com os resultados de massa geral do biofilme (caldo *E. coli*, a 37 °C) (**Gráfico 3**). Os demais meios apresentaram dados similares.

Comparando a capacidade da formação de biofilme geral das amostras nos mesmos meios em diferentes temperaturas (26 °C e 37 °C), todos apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$), exceto o meio LB (**Tabela 12**). No **Gráfico 4**, está representado a diferença da capacidade de formação de biofilme dos meios de cultivo em 26 °C e 37 °C, indicando maior formação de biofilme pelas amostras crescidas em caldo *E. coli* a 37 °C, enquanto que nos demais meios as amostras apresentaram maior formação de biofilme a 26 °C.

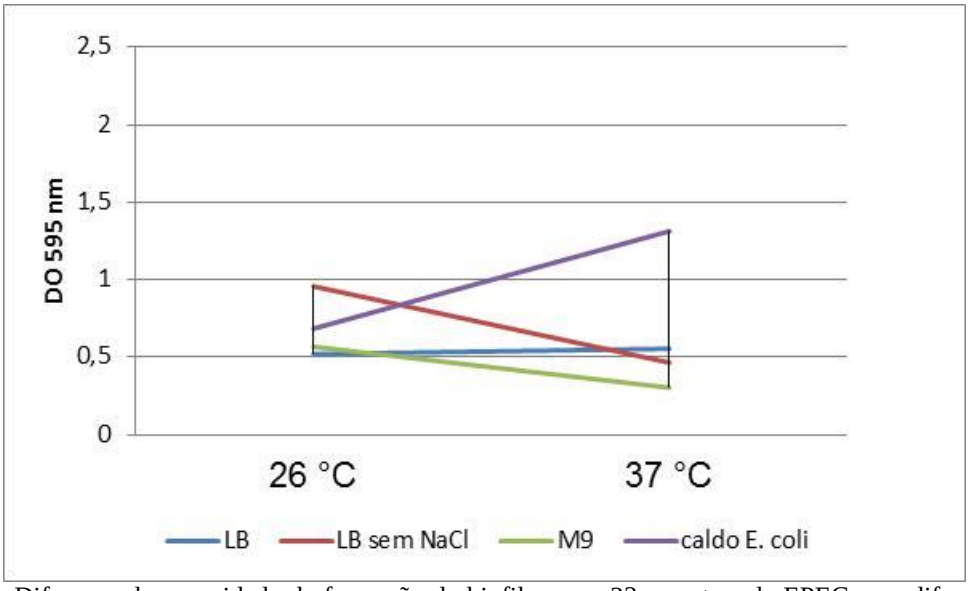


Gráfico 4. Diferença da capacidade de formação de biofilme por 23 amostras de EPECa em diferentes meios nas temperaturas de 26 °C e 37 °C.

Tabela 12. Comparação entre as temperaturas de 26 °C e 37 °C nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, quanto a capacidade de formar biofilme.

26 °C x 37 °C	Estatística*
LB	$p>0,05$
LB sem NaCl	$p<0,05$
M9	$p<0,05$
Caldo *E. coli*	$p<0,05$

* ANOVA com dois fatores de medidas repetidas

4.4 Presença de anel na interface ar-líquido-vidro

Esta metodologia foi realizada para verificar a capacidade das amostras formarem anel na interface ar-líquido-vidro e relacioná-la com a formação de biofilme em placas de fundo chato (MTP) e com a expressão dos genes *csgA*, *crl*, *fimH* e *bcsA*.

Na **Tabela 13**, verifica-se a formação de anel pelas amostras de EPECa incubadas sob agitação a 26 °C, nos meios LB, LB sem NaCl e caldo *E. coli*, apresentando 22 (95,6%), 21 (91,3%) e 23 (100%) de amostras positivas, respectivamente, enquanto que apenas 9 (39,1%) amostras foram capazes de formar anel no meio mínimo M9. Os resultados obtidos a 37 °C se mostraram contrários aos apresentados a 26 °C, em que nos meios LB, LB sem NaCl e M9 ocorreram 1 (4,3%), 3 (13,0%) e 1 (4,3%) amostras positivas, respectivamente (**Tabela 13**). O

meio mínimo M9 destacou-se como o que menos proporcionou a formação de anel e o caldo *E. coli* o que mais proporcionou, para ambos os meios e temperaturas.

O mesmo perfil apresentado no ensaio de formação de anel na interface ar-líquido-vidro foi verificado no ensaio de formação de biofilme em MTP (**Gráficos 1** e **2**), ou seja, em ambas as metodologias a formação de biofilme foi quase ausente a 37 °C. Entretanto, o caldo *E. coli* foi o meio que apresentou uma exceção à este perfil, apresentando formação de anel e biofilme pela maioria das amostras de EPECa em ambas as temperaturas (**Tabela 13**).

Quanto a formação de biofilme e expressão gênica, a maioria das amostras que formaram biofilme nas duas metodologias apresentadas expressaram ou fímbria curli ou fímbria tipo 1 ou celulose, exceto as amostras BA 558 e BA 2991 que não expressaram celulose, fímbria curli e fímbria tipo 1, sendo ainda que a amostra BA 2991 não apresentou nem motilidade (**Tabela 9**). No entanto, apesar da reduzida formação de biofilme por essas amostras, estas ainda foram capazes de formar anel na interface ar-líquido-vidro e biofilme em MTP sob algumas condições (**Tabela 13**).

Em sete amostras (BA 92, BA 2103, BA 2482, BA 4013, LB 3.25, LB 5.10 e LB 19.2) não houve expressão de fímbria curli e celulose porém estas amostras expressaram fimbria tipo 1. Com relação às 5 amostras imóveis (BA 92, BA 2103, BA 2468, BA 2991 e BA 4013), foi possível verificar a capacidade de formação de biofilme em ambas as metodologias, MTP e formação de anel na interface ar-líquido-vidro, porém com uma capacidade muito inferior às demais amostras, exceto no caso da amostra BA 4013. A maioria das amostras que foram imóveis também foram negativas para a expressão de celulose e fímbria curli (**Tabela 9**).

Tabela 13. Formação de anel na interface ar-líquido-vidro e formação de biofilme por 23 amostras de EPECa a 26 °C e 37 °C.

	Formação de anel a 26 ºC				Formação de anel a 37 °C					Formação de biofilme a 26 ºC				Formação de biofilme a 37 ºC			
Amostras	**LB**	**LB sem sal**	**M9**	**Caldo *E. coli***	**LB**	**LB sem sal**	**M9**	**Caldo *E. coli***	**Amostras**	**LB**	**LB sem sal**	**M9**	**Caldo *E. coli***	**LB**	**LB sem sal**	**M9**	**Caldo *E. coli***
BA 92	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 92	+	-	-	+++	-	-	-	+++
BA 320	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 320	++	+++	+++	+++	+	++	+	+++
BA 558	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 558	-	-	-	+++	-	-	-	+++
BA 1244	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 1244	++	+++	+++	+++	-	-	-	+++
BA 1444	+	+	-	+	-	-	-	+	BA 1444	+	+++	-	+++	-	-	-	+++
BA 1738	+	+	-	+	-	-	-	+	BA 1738	-	-	-	-	-	-	-	+++
BA 1887	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 1887	+	+++	++	+++	-	-	-	+++
BA 2062	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 2062	+	++	-	-	-	-	-	+++
BA 2103	+	+	-	+	-	-	-	+	BA 2103	++	++	-	-	-	++	-	+++
BA 2145	+	+	-	+	-	+	-	+	BA 2145	+++	+++	+++	-	+	+	++	+++
BA 2459	+	+	-	+	+	-	-	+	BA 2459	++	+	+++	+++	+	-	+++	+++
BA 2468	+	+	-	+	-	-	-	+	BA 2468	+	+++	+++	-	-	-	-	+++
BA 2482	+	+	-	+	-	-	-	+	BA 2482	-	-	-	-	-	-	-	+++
BA 2991	+	+	-	+	-	-	-	-	BA 2991	-	+	-	+	-	-	-	+++
BA 3378	-	+	-	+	-	-	-	+	BA 3378	+	+	++	-	-	-	+	+++
BA 4013	+	+	-	+	-	+	-	+	BA 4013	++	++	++	+++	-	+	+	+++
BA 4147	+	-	+	+	-	+	-	+	BA 4147	+	++	+++	+++	-	-	-	+++
BA 4157	+	+	+	+	-	-	+	+	BA 4157	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
BA 4182	+	+	+	+	-	-	-	+	BA 4182	+++	+++	+++	+	-	+	-	+++
CB 3.25.	+	+	-	+	-	-	-	+	CB 3.25.	+++	+++	+++	-	+++	++	+++	+++
CB 13-15.	+	-	-	+	-	-	-	+	CB 13-15.	-	-	-	+++	-	-	-	+++
CB 5-10.	+	+	-	+	-	-	-	-	CB 5-10.	+++	+++	+++	-	+	-	++	-
CB 19-2.	+	+	-	+	-	-	-	+	CB 19-2.	+	++	-	-	-	-	-	+++
Total N°	**22**	**21**	**9**	**23**	**1**	**3**	**1**	**21**	**Total N°**	**18**	**18**	**18**	**13**	**6**	**7**	**8**	**22**
%	**95,6**	**91,3**	**39,1**	**100**	**4,3**	**13**	**4,3**	**91,3**	**%**	**78,3**	**78,3**	**78,3**	**56,2**	**26**	**30,4**	**34,8**	**95,6**

Formação de biofilme: -, sem formação; +, baixa; ++, intermediária; e +++, elevada formação de biofilme.

4.5 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em microplaca de fundo chato (MTP) em quatro meios de cultivo

A partir do ensaio colorimétrico com cristal violeta, foram selecionadas as amostras LB 5.10 e BA 4157, as quais apresentaram respectivamente, níveis intermediário e alto de formação de biofilme na maioria das condições de cultivo. O objetivo deste ensaio foi verificar qualitativamente a capacidade das amostras de EPECa formarem biofilme, além de comparar com os resultados do ensaio colorimétrico com cristal violeta. As amostras foram cultivadas nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, sob as temperaturas de 26 °C e 37 °C por um período de 24 horas.

Na **Figura 8**, observa-se que a amostra LB 5.10, quando incubada a 26 °C nos diferentes meios, apresentou maior capacidade para a formação de biofilme do que quando incubada a 37 °C. Na temperatura de 26 °C, em todos os meios de cultura, visualiza-se estruturas mais espessas e com projeções mais amplas do que nas condições a 37 °C. Esses resultados corroboram com o ensaio colorimétrico com cristal violeta, com exceção do caldo *E. coli*.

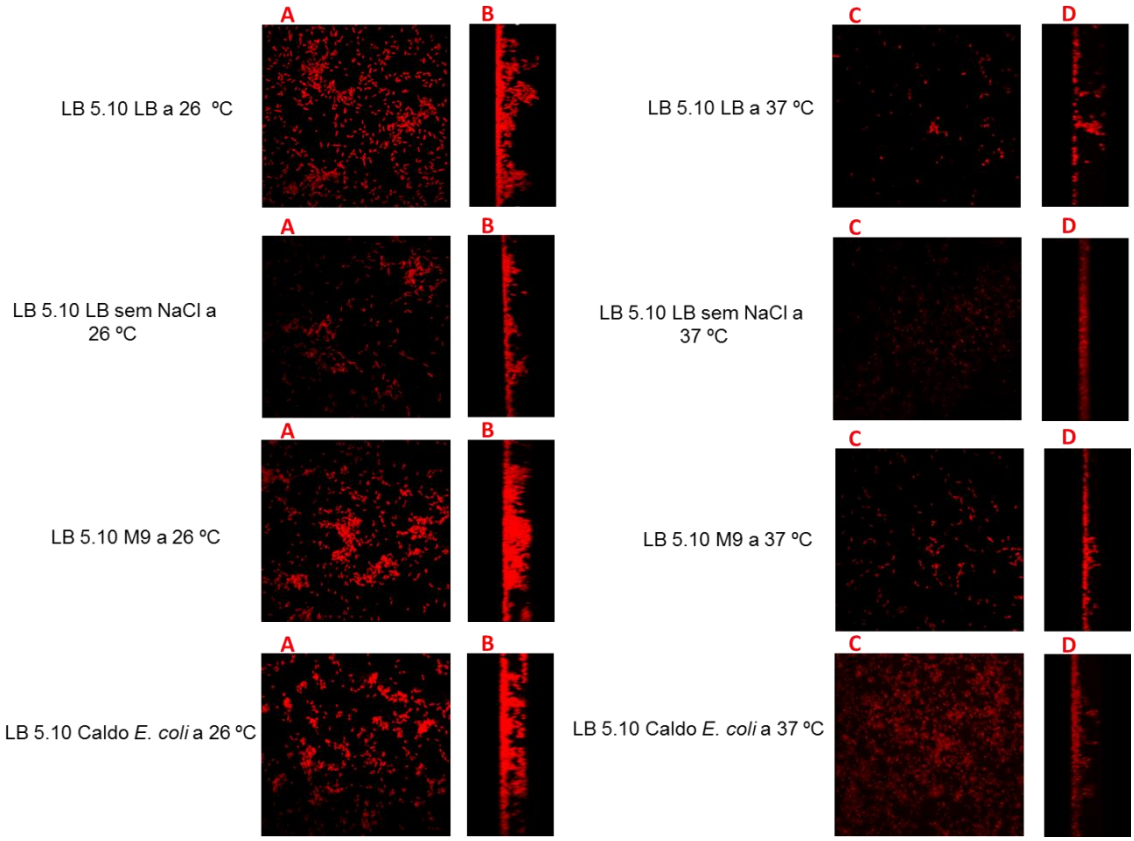


Figura 8. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa LB 5.10 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, a 26 °C e a 37 °C em MTP após 24 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz.; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X.

Na **Figura 9**, observa-se que a amostra BA 4157 incubada nos meios de cultivo a 37 °C forneceram maior capacidade para a formação de biofilme em relação a 26 °C. Estes dados são opostos aos resultados verificados na amostra LB 5.10 (**Figura 8**), pois a amostra LB 5.10 apresentou maior formação a 26 °C, enquanto que a amostra BA 4157 apresentou maior formação de biofilme a 37 °C. Assim como para a amostra LB 5.10, estes dados corroboram quase inteiramente com os dados do ensaio colorimétrico com cristal violeta em placa de MTP (**Gráfico 1** e **2**).

Quando comparadas as amostras BA 4157 e LB 5.10, a formação de biofilme da primeira (**Figura 9**) apresentou-se mais compacto e espesso com relação a amostra LB 5.10 (**Figura 8**).

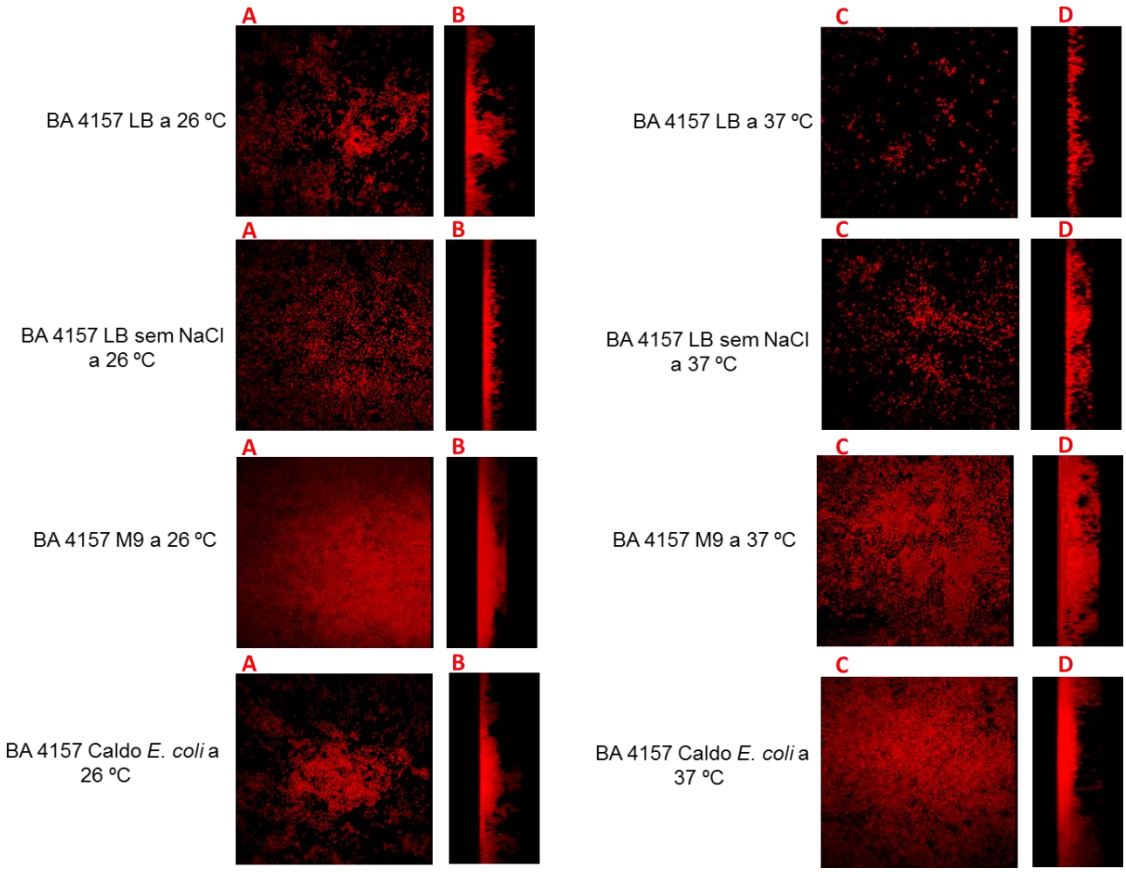


Figura 9. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa BA 4157 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, a 26 °C e a 37 °C em MTP após 24 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz.; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X.

4.6 Cinética da formação de biofilme em microplacas de fundo chato (MTP) em LB sem NaCl a 26 °C e em Caldo *E. coli* a 37 °C por amostras representativas de EPECa

Após a realização do ensaio colorimétrico com cristal violeta e confirmação da formação de biofilme pelas 23 amostras de EPECa após 24 horas de incubação em diferentes meios e temperaturas (**Gráfico 1** e **2**), foram selecionados os meios LB sem NaCl e caldo *E. coli* para serem ensaiados nas temperaturas de 26 °C e 37 °C, respectivamente, baseado no **Gráfico 3**. A finalidade deste estudo foi comparar a evolução da capacidade das amostras formarem biofilme por um período mais prolongado de incubação. De acordo com o **Gráfico 5**, as amostras LB 5.10 e BA 4157 apresentaram elevada formação de biofilme no período de 48 horas, sendo que a primeira apresentou valores de DO significativamente diferentes em relação ao período seguinte ($p<0,05$). Porém, a amostra BA 4013 teve uma diminuição significativa ($p<0,05$) na formação de biofilme de 24 para 48 horas, elevando-se de 48 para 72 horas, com diferença significativa ($p<0,05$).

A amostra controle EAEC 042 apresentou-se com baixo valor de DO, no período de 24 horas (**Gráfico 5**). Este dado corrobora com o valor de DO obtido no ensaio colorimétrico com cristal violeta (**Gráfico 1**). Porém, o perfil da cinética desta amostra não apresentou altos valores de DO, o que não era esperado. A amostra controle DH5α apresentou-se com baixo valor de DO em todos os períodos da cinética (**Gráfico 5**).

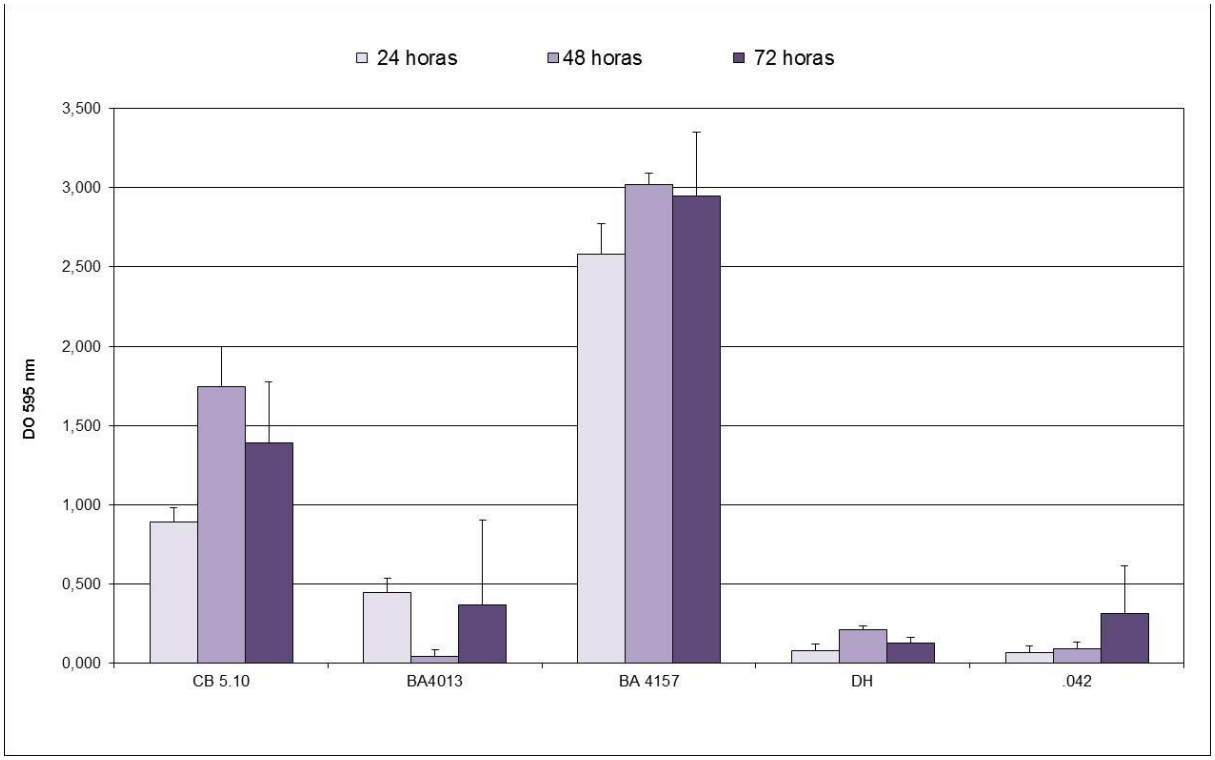


Gráfico 5. Cinética de formação de biofilme em MTP das amostras de EPECa em meio LB sem NaCl a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta.

No **Gráfico 6**, a amostra BA 4157 apresentou uma formação de biofilme crescente nos períodos ensaiados, com diferença significativa apenas no período de 24 para 48 e 72 horas ($p<0,05$). Entretanto, a amostra LB 5.10 apresentou crescimento evolutivo do período de 24 para 48 horas, porém houve uma diminuição de 48 para 72 horas de incubação, ambas com diferenças significativas ($p<0,05$).

No **Gráfico 6**, a amostra controle EAEC 042 apresentou alto valor de DO no período de 24 horas, corroborando com os dados do ensaio colorimétrico com cristal violeta no mesmo período de incubação. Os dados nos três períodos consecutivos apresentaram alta capacidade de formação em período prolongado. A amostra controle DH5α apresentou baixa formação de biofilme em 24 horas, também corroborando com os dados obtidos ensaio colorimétrico com cristal violeta (**Gráfico 2**).

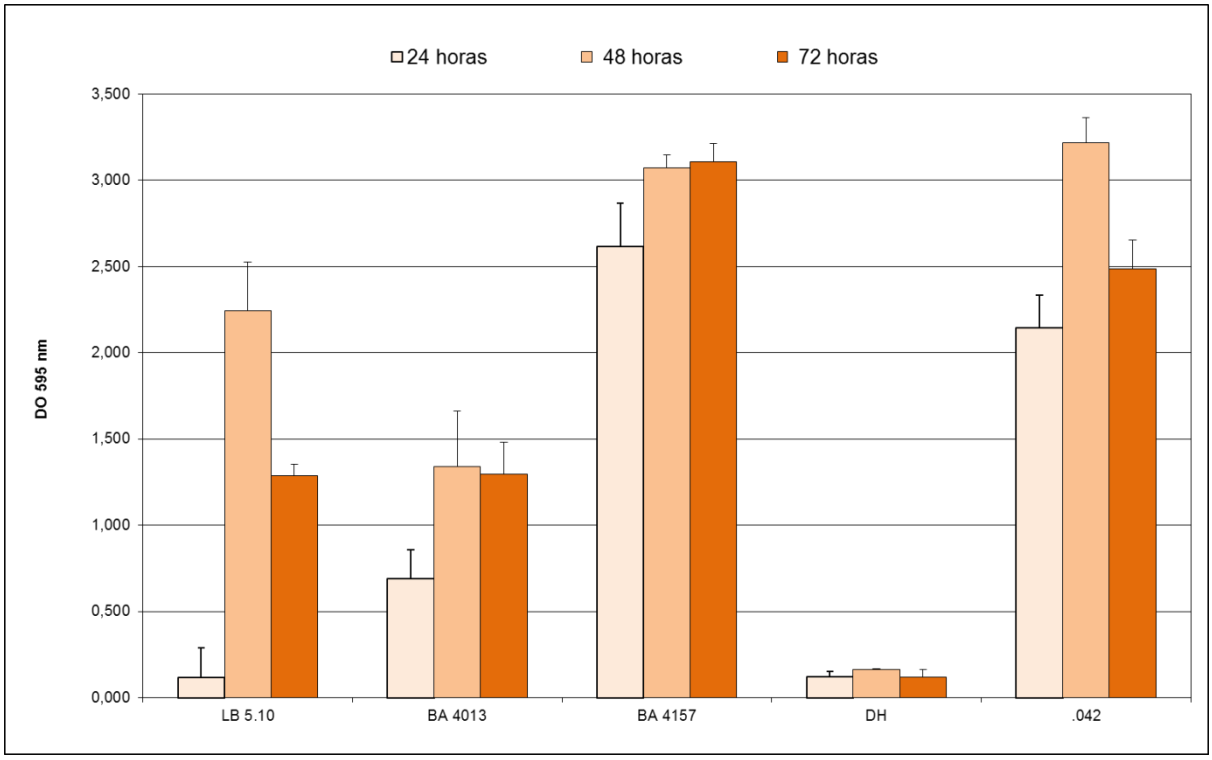


Gráfico 6. Cinética de formação de biofilme em MTP de amostras de EPECa em caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta.

4.7 Ensaio colorimétrico com cristal violeta de amostras representativas de EPECa no período de 72 horas de incubação em microplacas de fundo chato (MTP) e Dispositivo de Calgary (MBEC) em diferentes meios e temperaturas

Seis amostras de EPECa (BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10) foram ensaiadas em período de 72 horas de incubação nos meios LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* nas temperaturas de 26 °C e 37 °C, utilizando placas de MTP e MBEC para comparar a formação de biofilme nestes dois tipos de placa. As amostras DH5α e EAEC 042 foram utilizadas como controle, sendo todas as amostras analisadas em triplicata e em três repetições.

Analisando os **Gráficos 7** e **8**, as amostras apresentaram heterogeneidade em relação a formação de biofilme nos diferentes meios.

A amostra LB 5.10 apresentou grande aumento da formação de biofilme em todos os meios a 26 °C (**Gráfico 7**) em relação a 37 °C (**Gráfico 8**). Este perfil foi observado também na amostra BA 320, com exceção do meio LB.

A amostra BA 558 apresentou um aumento em LB e LB sem NaCl a 37 °C (**Gráfico 7**) comparado com a temperatura de 26 °C (**Gráfico 7**). A amostra BA 4013, apresentou maior heterogeneidade, pois apresentou maior formação de biofilme a 26 °C em meio M9 e caldo *E. coli*, e a 37 °C em LB sem NaCl. Já a amostra LB 3.25 apresentou aumento em LB, LB sem NaCl a 37 °C em relação a 26 °C (**Gráficos 7 e 8**, respectivamente) enquanto a 26 °C apresentou aumento na formação de biofilme em meio M9.

A amostra BA 4157 apresentou alta capacidade de formação de biofilme em todos os meios a 26 °C (**Gráfico 7)** e um leve aumento na formação de biofilme a 37 °C em relação a 26 °C (**Gráfico 8**).

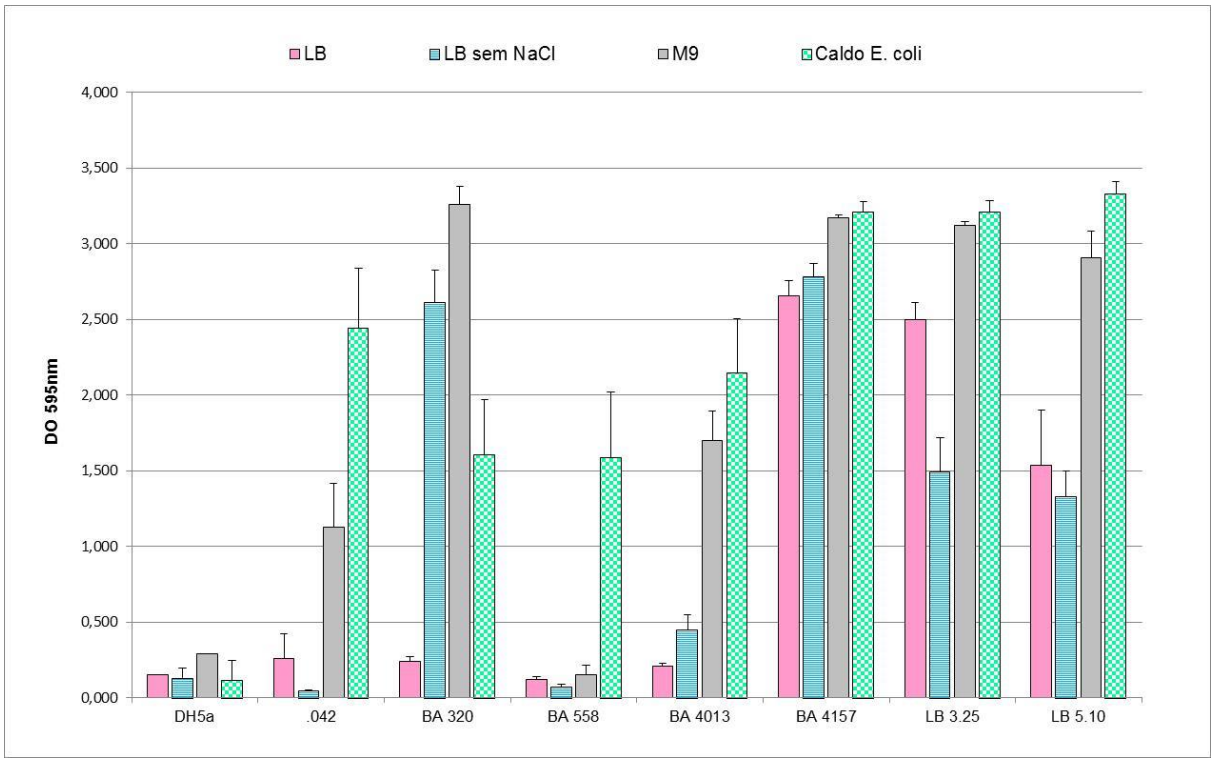


Gráfico 7. Capacidade de formação de biofilme em MTP de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação.

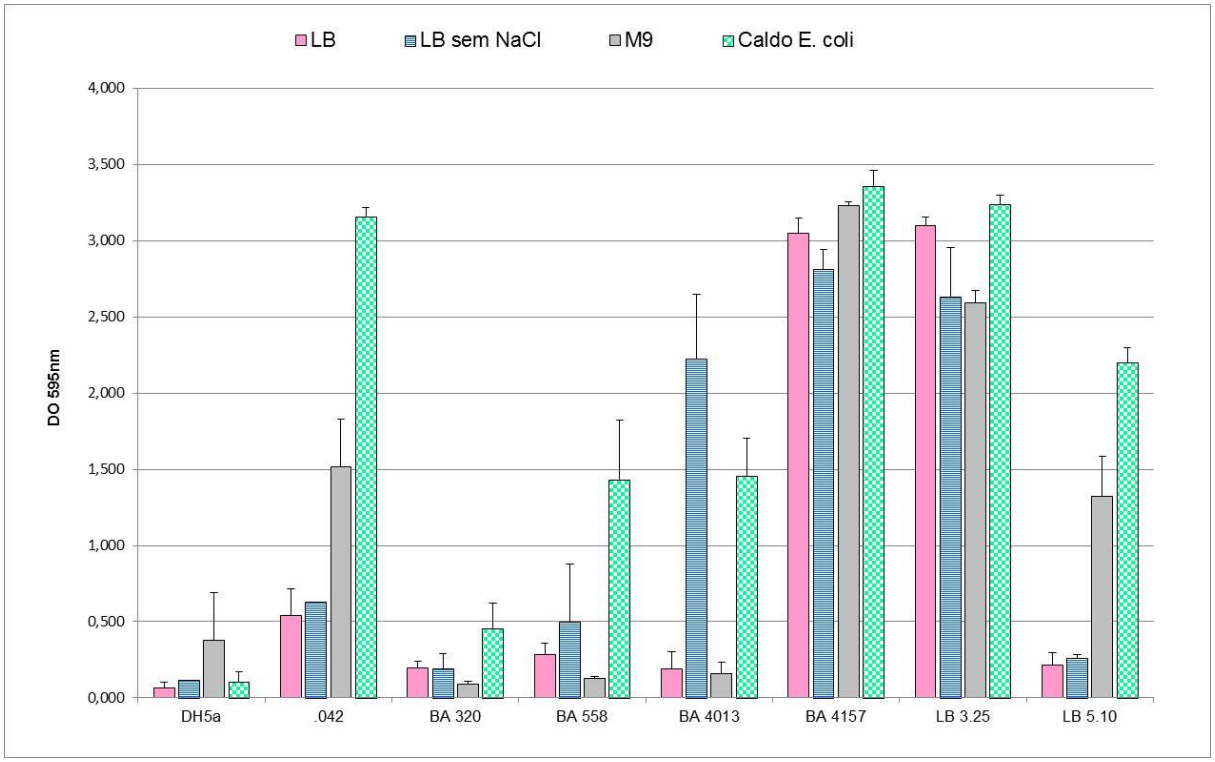


Gráfico 8. Capacidade de formação de biofilme em MTP de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação.

Quanto as amostras ensaiadas através de MBEC, a amostra BA 320 apresentou baixa capacidade de formação de biofilme nos meios estudados a 37 °C, exceto em LB sem NaCl e LB, (**Gráfico 10**) enquanto que nos meios LB sem NaCl e M9 a 26 °C (**Gráfico 9**), esta amostra atingiu valores de DO acima de 3,0.

A amostra BA 558 apresentou baixa capacidade de formação de biofilme a 26 °C (**Gráfico 9**) e 37 °C (**Gráfico 10**), exceto no meio LB sem NaCl a 37° C. A amostra BA4013 apresentou alta formação de biofilme no meio LB sem sal a 26 °C e a 37 °C.

As amostras BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10 apresentaram valores de DO acima de 1,5 em todos os meios em ambas as temperaturas, com exceção da amostra LB 5.10 a 37 °C nos meios LB e LB sem NaCl, cujos valores de DO foram inferiores a 0,5.

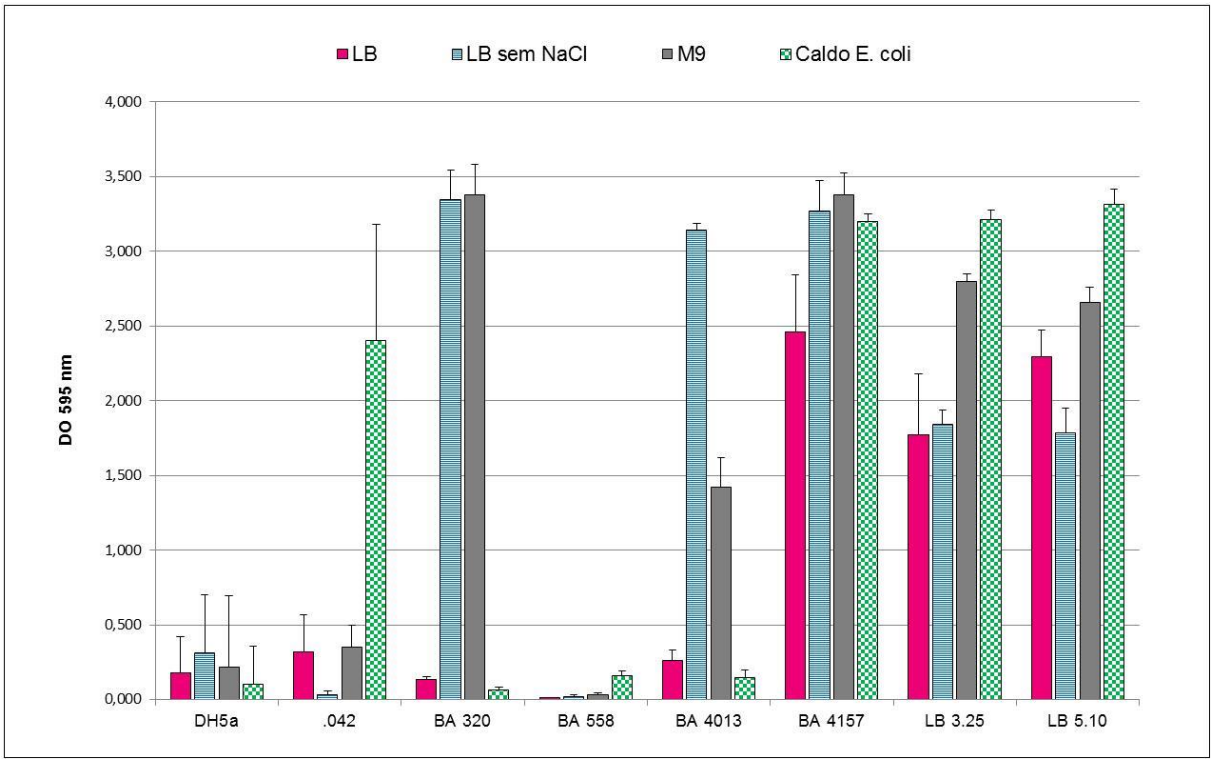


Gráfico 9. Capacidade de formação de biofilme em MBEC de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação.

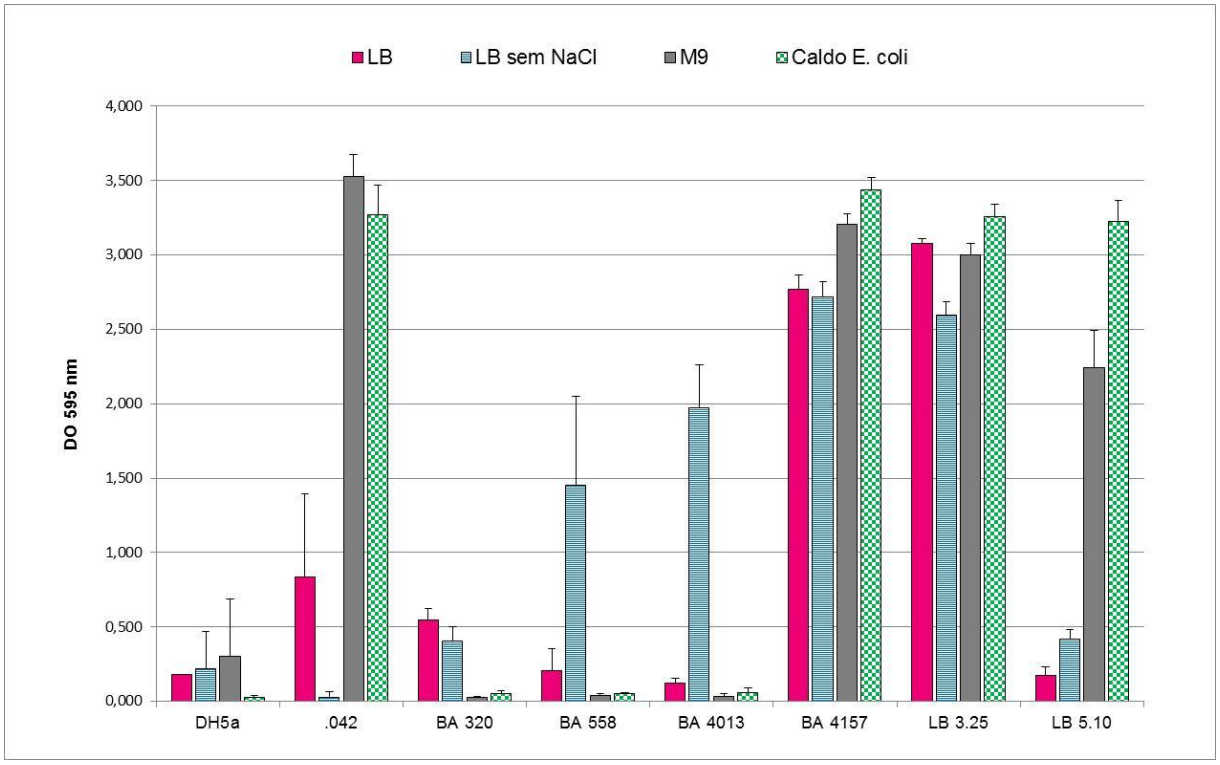


Gráfico 10. Capacidade de formação de biofilme em MBEC de 6 amostras de EPECa em meio LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 37 °C, através de ensaio com cristal violeta após 72 horas de incubação.

De forma geral, os resultados de formação de biofilme pelas amostras de EPECa foram similares nas duas bases empregadas: MTP e MBEC, exceto em relação ao caldo *E.*

coli. Neste meio de cultivo, a formação de biofilme pelas amostras BA 320, BA 558 e BA 4013 foi superior em MTP comparado a MBEC em ambas as temperaturas, enquanto que o meio LB sem NaCl propiciou maior formação de biofilme pelas amostras BA 320 e BA 4013 em MBEC sob a temperatura de 26 °C, e pelas amostras BA 558 e BA 320 a 37 °C. Os demais meios apresentaram-se com perfil semelhante em todas as condições de cultivo ensaiadas (**Gráficos 7**, **8**, **9** e **10**).

Comparando os resultados de formação de biofilme nos mesmos meios entre MTP e MBEC, verificamos que houve diferença significativa apenas na temperatura de 26 °C em caldo *E. coli* e LB sem NaCl ($p<0,05$), sendo que o caldo *E. coli* propiciou maior formação de biofilme em MTP enquanto que em LB sem NaCl em MBEC as amostras apresentaram maior formação de biofilme.

Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os valores apresentados nos ensaios de formação de biofilme empregando MTP e MBEC a 37 °C, assim como comparando os resultados obtidos sob diferentes temperaturas (a 26 °C e a 37 °C), tanto em MTP quanto em MBEC.

4.8 Microscopia confocal de fluorescência de biofilmes formados em MBEC pelas amostras BA 320 e BA 4157 após 72 horas de incubação em diferentes condições de cultivo

Este ensaio foi realizado com o objetivo de analisar qualitativamente a formação de biofilme (anel na interface ar-líquido-poliestireno) na região superior dos pinos das placas de MBEC, pelas amostras BA 320 e BA 4157 em diferentes meios de cultivo (LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*) e temperaturas (26 °C e 37 °C). Na seção 4.7, verificamos quantitativamente a formação de biofilme em toda superfície do pino.

Apesar das amostras não formarem estruturas de anel na interface ar-líquido-vidro nos tubos de ensaio (seção 3.5.2, **Tabela 13**) na maioria dos meios de cultura empregados a 37 °C, nos ensaios utilizando as placas de MBEC, foi possível visualizar a presença de anel na interface ar-liquido-poliestireno e por este motivo foram estudadas.

A amostra BA 320 apresentou heterogeneidade de formação de biofilme entre as diferentes condições estudadas. Os meios nos quais a amostra apresentou uma estrutura de biofilme mais espessa foram em LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli* a 26 °C. As amostras incubadas em meios LB e caldo *E. coli* apresentaram pouca formação de biofilme comparados às condições anteriores. A 37 °C, esta amostra apresentou estruturas mais delgadas, com

espaçamento entre as bactérias nos meios M9 e caldo *E. coli*, enquanto que nos meios LB e LB sem NaCl houve a presença de uma estrutura mais densa, podendo ser visualizadas microcolônias (**Figura 10**).

A amostra BA 4157 apresentou uma formação de biofilme mais homogênea nas diferentes condições de cultivo empregadas. O caldo *E. coli* foi o meio em que foi possível visualizar estruturas bacterianas mais densas, em ambas as temperaturas, assim como o meio M9 a 37 °C. Nos demais meios e temperaturas, a formação de biofilme foi semelhante, exceto em LB sem NaCl a 37 °C onde houve a presença de uma estrutura mais delgada (**Figura 11**).

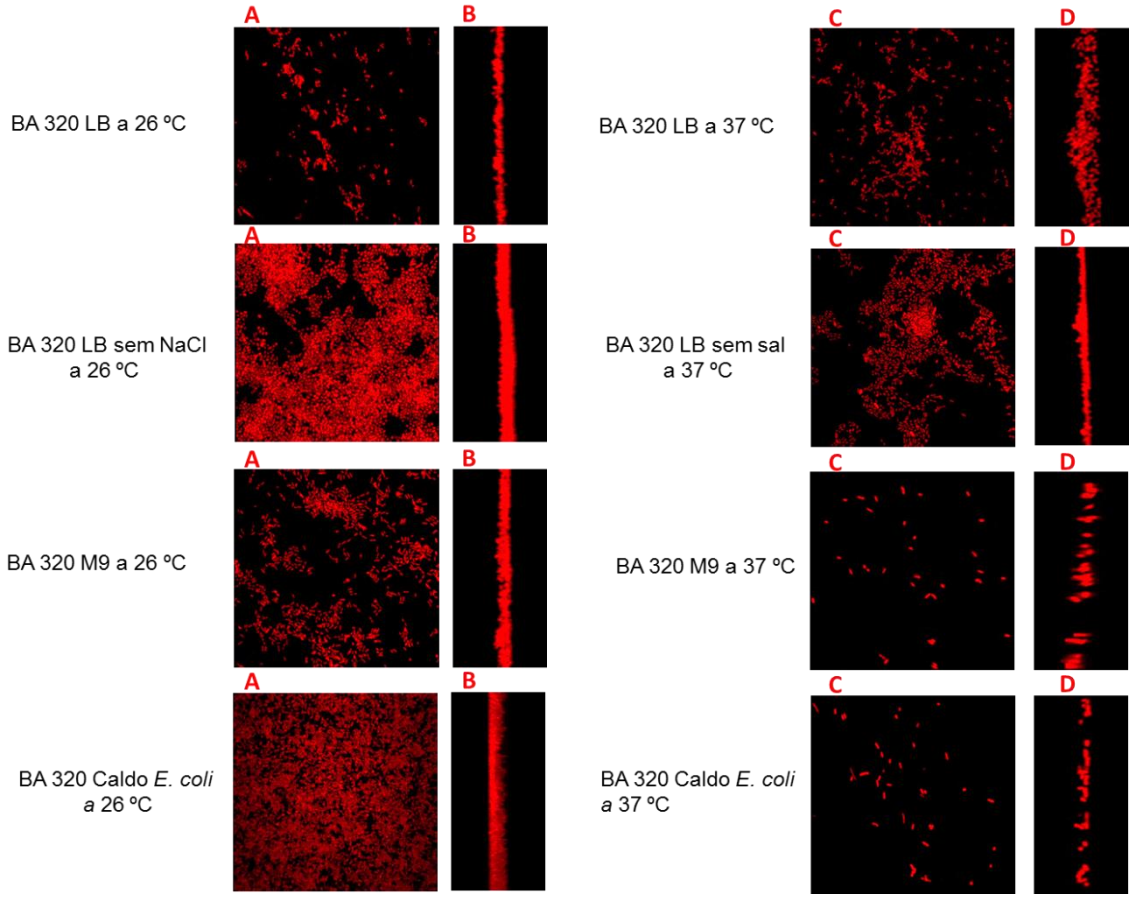


Figura 10. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa BA 320 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, a 26 °C e a 37 °C em MBEC após 72 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz.; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X.

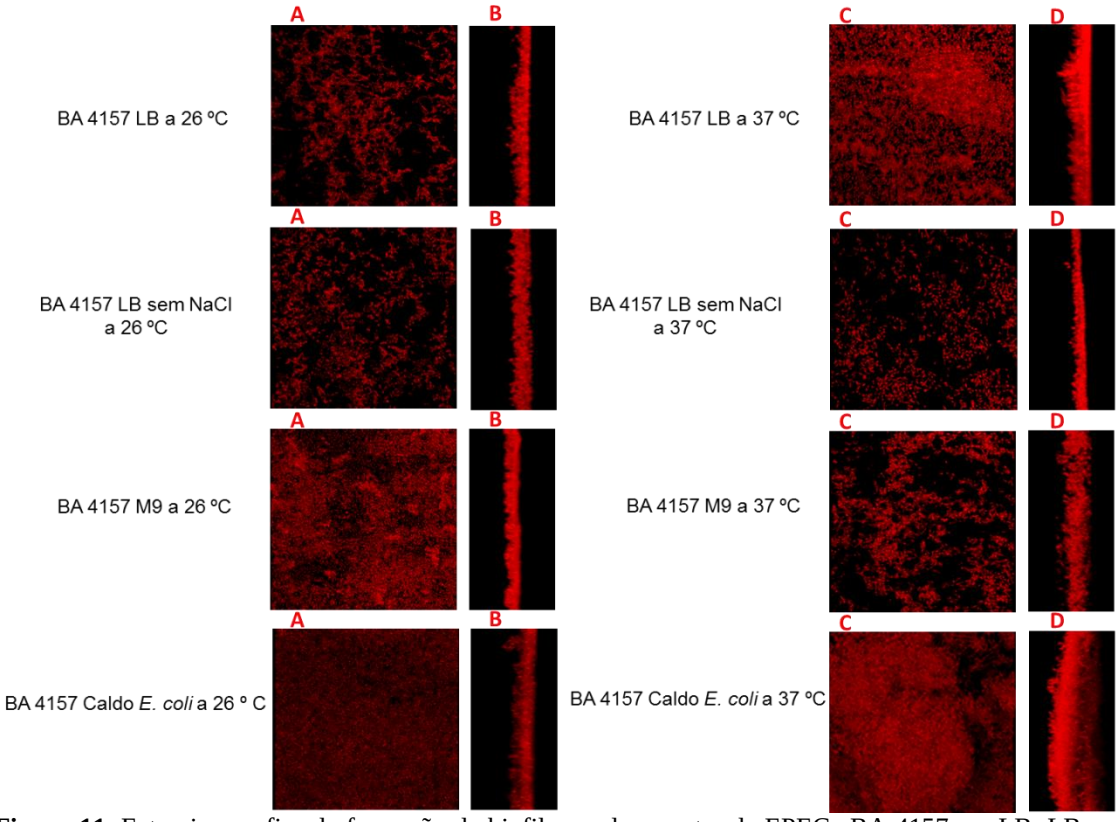


Figura 11. Fotomicrografias de formação de biofilme pela amostra de EPECa BA 4157 em LB, LB sem NaCl, M9 e caldo *E. coli*, a 26 °C e a 37 °C em MBEC após 72 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz.; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X.

Dentre os meios e temperatura ensaiados, a amostra que mais se destacou, apresentando uma estrutura mais densa foi a amostra BA 4157 em caldo *E. coli* a 37 °C e a amostra que apresentou menor capacidade de formação de biofilme após 72 horas de incubação foi a amostra BA 320 em LB a 26 °C e meio M9 e caldo *E. coli* a 37 °C. Estes dados corroboram com os respectivos valores de DO obtidos nas condições ensaiadas da seção 4.7.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

As 6 amostras de EPECa (BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10) também foram ensaiadas para verificar a formação de biofilme em MBEC após 72 horas de incubação em meio LB a 37 °C. Foi analisada a arquitetura da formação de biofilme através de microscopia eletrônica de varredura na parte superior dos pinos, onde se estabelece a formação do anel (interface ar-líquido-poliestireno), buscando-se estruturas que pudessem

auxiliar na formação do biofilme. Além disso, analisamos a formação de biofilme nas diferentes porções dos pinos da microplaca de MBEC.

Todas as amostras apresentaram elevada capacidade de aderir aos pinos da microplaca de MBEC. É possível visualizar na **Figura 13** que a amostra de EPECa BA 558 possui uma estrutura que a recobre. Em menor presença, esta estrutura também aparentemente recobre as amostras BA 320, BA 4013, BA 5.10 e o controle EAEC 042.

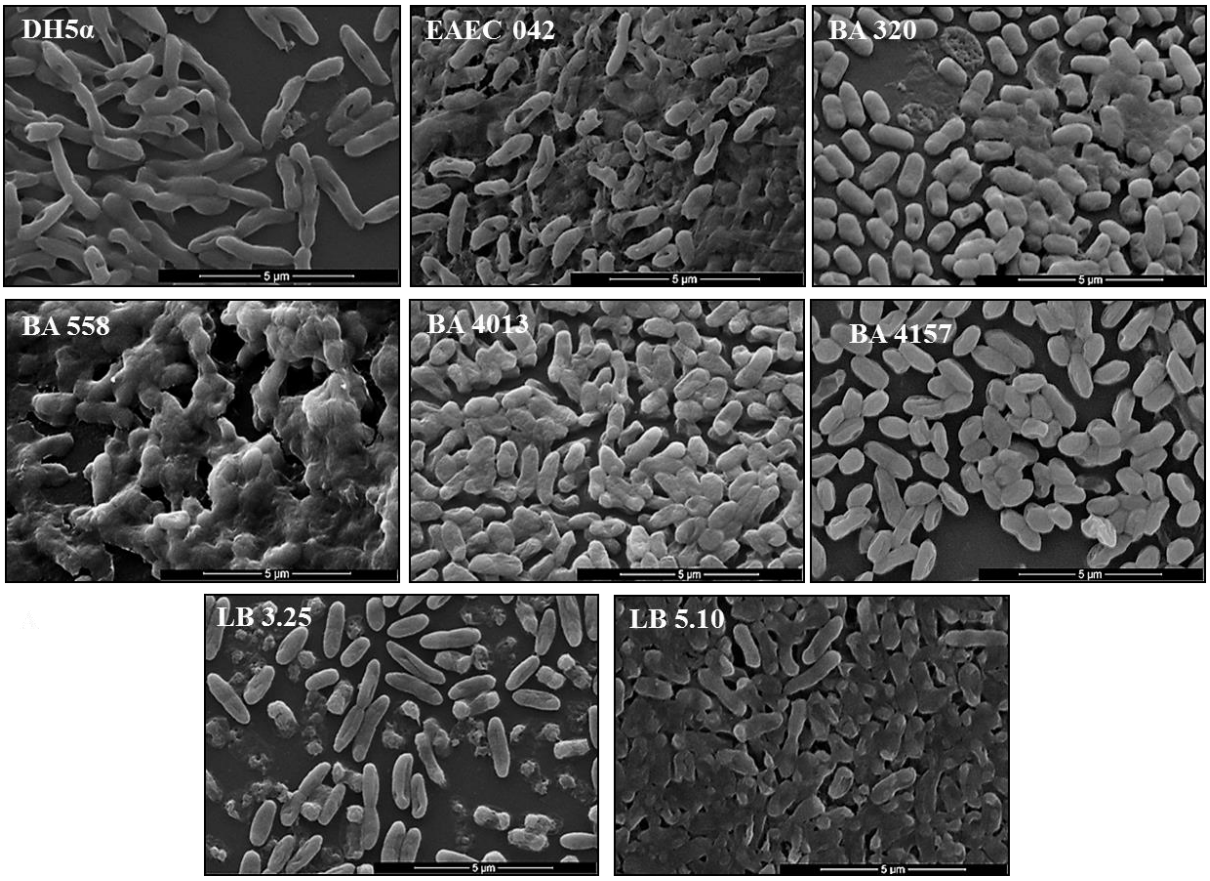


Figura 12. Fotomicrografia eletrônica de varredura em MBEC das amostras de EPECa BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10 em LB a 37 °C, após 72 horas de incubação.

Podemos visualizar na **Figura 13** algumas amostras de EPECa aderidas nas diferentes porções dos pinos das placas de MBEC, apresentando maior quantidade de bactérias na parte superior do pino, onde se estabelece a formação do anel (interface ar-líquido-poliestireno), com uma diminuição gradativa a medida que se aproximava da ponta (parte inferior), exceto a amostra BA 320 que apresentou quantidades de bactérias semelhantes nas partes mediana e inferior do pino.

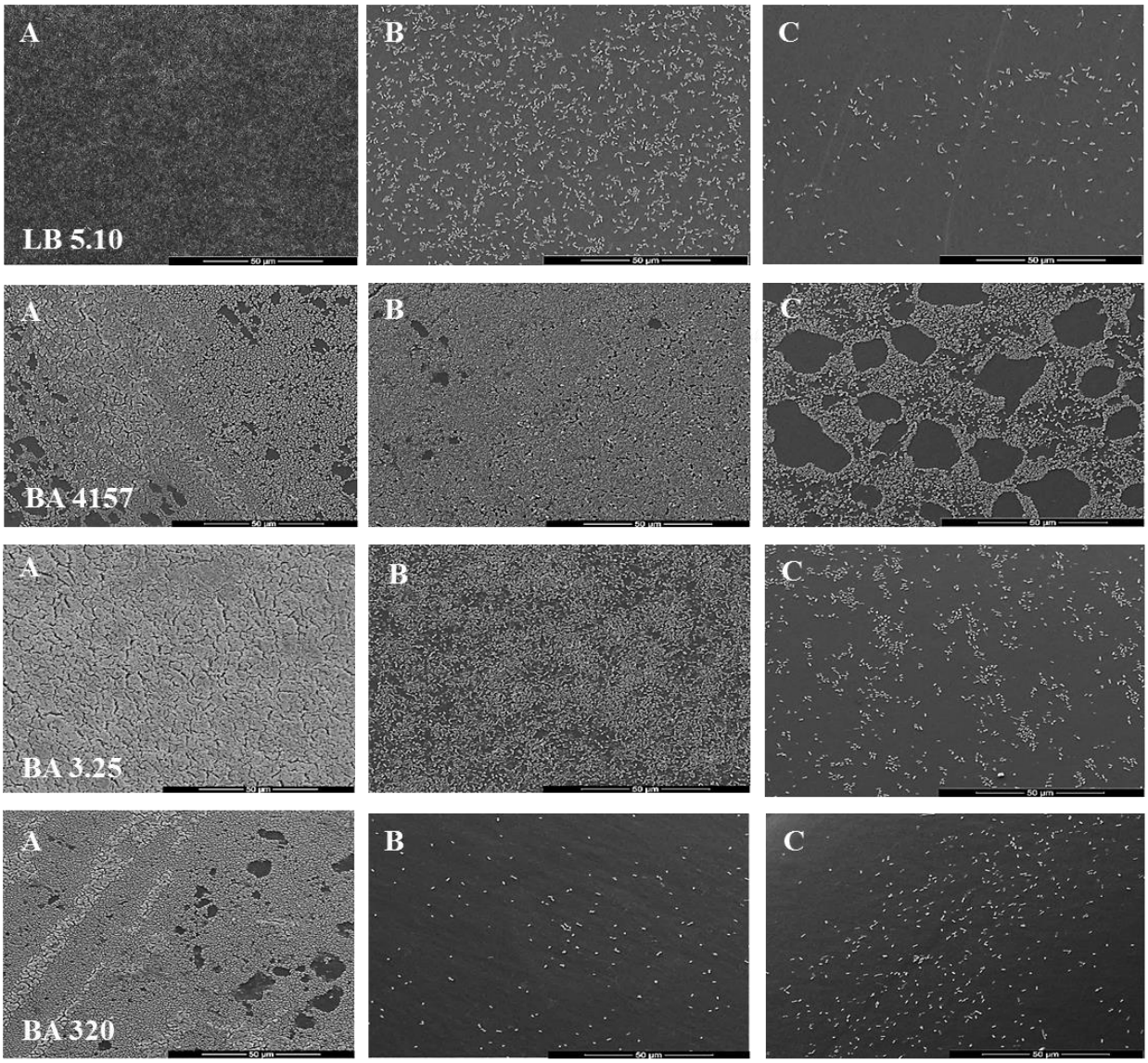


Figura 13. Fotomicrografias eletrônica de varredura em MBEC das amostras de LB5.10, BA 4157, LB 3.25 e BA 320 em LB a 37 °C, após 72 horas de incubação. A – parte superior do pino; B – parte mediana e C – a extremidade inferior do pino.

4.10 Microscopia confocal de fluorescência em MBEC em meio LB a 37 °C após 72 horas de incubação

As mesmas 6 amostras analisadas na seção 4.9 foram avaliadas qualitativamente através da metodologia confocal de fluorescência para verificar a diferença de arquitetura entre as amostras em MBEC após 72 horas de incubação em meio LB a 37 °C.

A amostra LB 3.25 apresentou uma estrutura compacta, sem a apresentação de pequenas estruturas salientes. A amostra BA 558 apresentou uma estrutura mais espessa, porém compacta semelhante à da amostra LB 3.25. As amostras BA 320, BA 4013, BA 4157

apresentaram-se compactas, porém com o aparecimento de saliências indicando a presença de microcolônias em sua estrutura.

A amostra LB 5.10 apresentou biofilme mais delgado, com bactérias mais espaçadas. A amostra controle EAEC 042 apresentou uma estrutura muito espessa e compacta enquanto a amostra DH5α apresentou poucas bactérias aderidas.

A forma côncava da superfície do pino faz com que as imagens fiquem inclinadas, pois os pinos possuem estruturas cilíndricas limitando o campo de visualização e captação de imagem. (**Figura 14**).

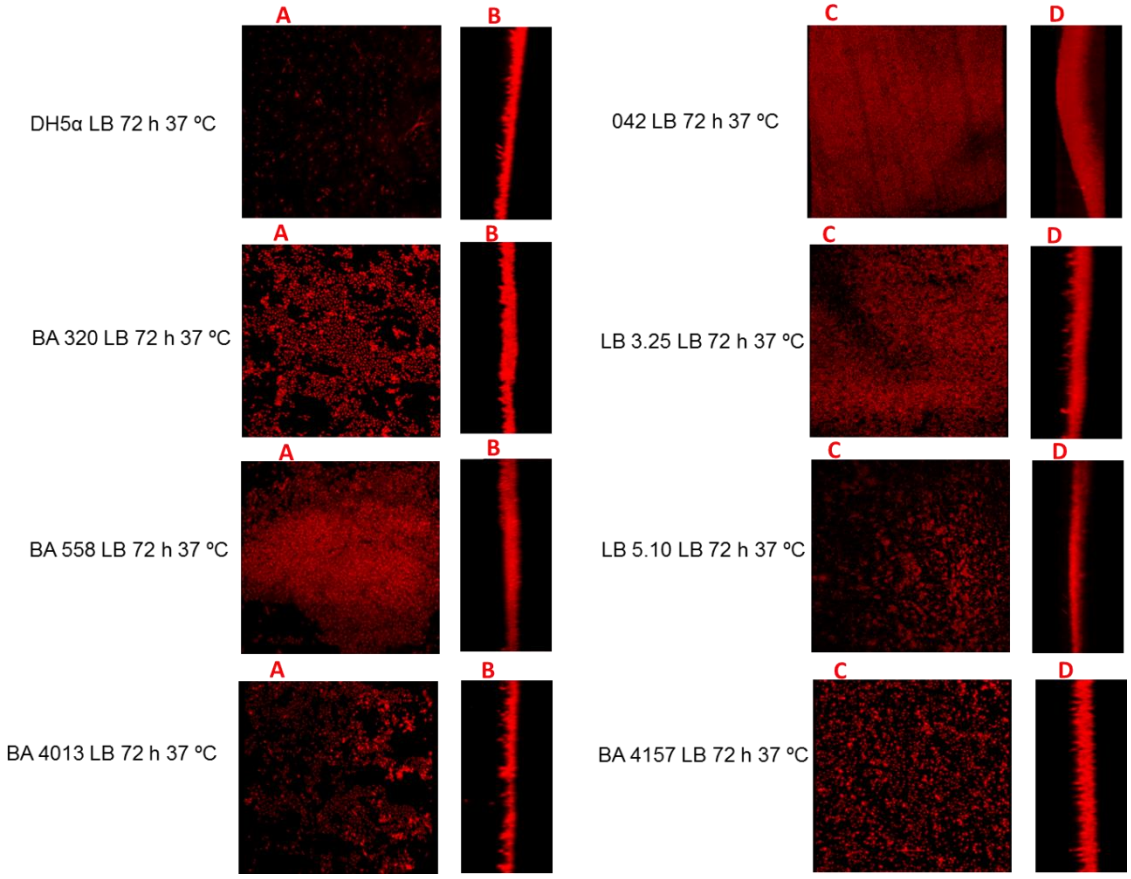


Figura 14. Fotomicrografia de formação de biofilme em MBEC pelas amostras de EPECa BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 5.10 e LB 3.25 em LB a 37 °C após 72 horas de incubação. A e C, imagem panorâmica do biofilme no eixo xyz.; B e D: projeção no eixo z da imagem anterior no eixo xyz. Aumento de 1000X.

5 DISCUSSÃO

EPEC atípica é um patógeno emergente entre os agentes causadores de diarreia e que compreende diversos sorotipos, sendo encontrado tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (MORENO et al., 2010; OCHOA et al., 2008; BUERIS et al., 2007; NGUYEN et al., 2006; FRANZOLIN et al., 2005; ROBINS-BROWNE at al., 2004; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Além de ter sido descrito recentemente, as amostras pertencentes a este patótipo apresentam-se heterogêneas, pois além de expressarem os fatores de virulência codificados na ilha de patogenicidade LEE podem expressar fatores de virulência adicionais, não localizados nesta ilha, tais como a expressão de enterohemolisinas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), toxina Pic (ELIAS, 2008), entre outros. Nas últimas décadas, vários estudos vêm sendo realizados para melhor compreender os mecanismos de patogênese desenvolvidos por esse patótipo.

O biofilme pode ser uma estratégia para a amostra bacteriana permanecer no ambiente e que poderia implicar em maiores chances de infectar os seres humanos e animais, principalmente nos locais onde a população vive em condições de pobreza (GUERRANT et al., 1983; MORAES et al., 2003). Winfield e Groisman (2003) verificaram que após serem excretados pelo hospedeiro, os patógenos entéricos são confrontados com características diversas do hospedeiro, como disponibilidade de nutriente limitada, estresse osmótico, grandes variações em temperatura e pH, assim como predação.

Os biofilmes são descritos como comunidades de microrganismos tipicamente envoltos por uma matriz secretada pela própria bactéria, contendo substâncias poliméricas (NIKOLAEV; PLAUKUNOV, 2007), podendo ser formado por uma única espécie ou mais comumente por múltiplas espécies bacterianas (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Essa estrutura tem papel fundamental na colonização de superfícies (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2001; HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011), ocasionando problemas em diversas áreas, dentre elas, a da saúde (DONLAN; COSTERTON, 2010).

Weiss-Muskat et al. (2010) verificaram que amostras de EPECa do sorotipo O55:H7 são capazes de formar biofilme apenas a 26 °C e não a 37 °C, possuindo um comportamento multicelular, porém esta capacidade não foi verificada em amostras de sorotipos diferentes. No entanto, mais recentemente Hernandes et al. (2013) verificaram que uma amostra isolada de criança com diarreia do sorotipo ONT:H-, também formou biofilme a 37 °C. Devido à formação de biofilme ser de grande importância não somente para EPECa como também para

outros microrganismos, conferindo proteção e favorecendo a contaminação, a formação de biofilme em EPEC atípica talvez desempenhe em parte algum papel para a emergência deste patótipo. Como são escassos os estudos sobre biofilme nesse patótipo, o presente estudo visou contribuir com novos conhecimentos.

Sabe-se que alguns meios de cultura específicos estimulam a expressão de diversas estruturas em muitas bactérias (BUSTAMANTE et al., 2001; MOREIRA et al., 2006; PRINGENT-COMBARET et al., 2001; SERRA; RICHTER; HENGGE, 2013) e que algumas destas estruturas são melhores expressas em determinadas temperaturas. Por esse motivo é de grande importância a pesquisa da formação de biofilme em EPECa em diversos meios de cultura e temperaturas, mimetizando o ambiente encontrado no hospedeiro e fora deste.

Alguns genes possuem papel fundamental para a formação de biofilme, seja codificando estruturas, seja participando da regulação da expressão destas. Os genes *fim*H, *csg*A, *crl* e *bcs*A foram selecionados para serem pesquisados nas amostras em estudo devido à sua importância na formação de biofilme relatada em outros trabalhos (BARNHART; CHAPMAN, 2006; MOREIRA et al., 2003; PRATT; KOLTER, 1998; SERRA; RICHTER; HENGEE, 2013). Assim como mencionado anteriormente, as amostras de EPECa são muito heterogêneas geneticamente, sendo importante verificar a prevalência desses genes na tentativa de relacioná-los com a capacidade de formação de biofilme. Devido a associação de infecções por EPEC com casos de diarreia persistente (FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000), existe a possibilidade da formação de biofilme em *E. coli* estar relacionada com essa enfermidade, sendo importante a verificação de possíveis estruturas relacionadas.

A fímbria tipo 1 está associada à eficiente formação de biofilme por *Escherichia coli in vitro* e é a adesina mais comum dentre as *Enterobacteriaceae* (MOREIRA et al., 2003; NAVES et al., 2008). É considerada um fator de virulência em *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) e responsável pelo estabelecimento inicial do biofilme em EAEC (MOREIRA et al., 2003) enquanto em EPEC típica (EPECt) é responsável pela formação de microcolônias (MOREIRA et al., 2006). Deste modo, consideramos interessante verificar sua presença no patótipo EPECa.

FimH é uma adesina manose específica a qual permite que *E. coli* interaja especificamente com resíduos manosídicos localizados em células eucarióticas, facilitando algumas infecções (PRATT; KOLTER, 1998). O gene *fimH* foi detectado em 22 (95,6%) das amostras estudadas, indicando uma alta prevalência desta adesina nas amostras de EPECa analisadas, porém foi expressa apenas em 16 amostras.

A amostra BA 558 não apresentou o gene e não foi capaz de aglutinar as leveduras, o que era esperado. Porém, nem sempre um gene não amplificado através da PCR empregando determinados iniciadores indica a ausência deste, sendo possível que tenha pequenas deleções ou mutações impedindo a amplificação da região desejada. As amostras BA 2459, BA 2468 e BA 3378 aglutinaram mesmo sendo cultivadas com 1% de D-manose, sendo consideradas negativas devido à ausência de especificidade para fímbria tipo 1. Neste caso pode ter ocorrido alguma interação com outros componentes bacterianos que possuam afinidade pelos resíduos manosídicos da levedura. Experimentos como *immunoblotting* poderiam confirmar a expressão da fímbrias tipo 1.

Apesar de apenas 16 amostras terem aglutinado, 22 (95,6%) amostras apresentaram o gene *fimH*. Este fato pode ser explicado devido às condições não favoráveis para a expressão desta fímbria, ou algum outro gene essencial pode estar ausente, ou ainda, podem apresentar alguma deleção significante impedindo a montagem da fímbria. Em *E.coli* K-12, por exemplo, não há produção de celulose, porém possui todos os genes necessários para a síntese desta (DA RE; GHIGO, 2006; SERRA; RICHTER; HENGEE, 2013). Este mesmo problema pode estar ocorrendo em nossas amostras, mas em relação à fímbria tipo 1.

As bactérias expressam estas estruturas superficiais para permitir a interação e a sobrevivência em seu *habitat*, importantes na adesão ao substrato. Esta fímbria promove adesão, invasão, sinalização celular e formação de biofilme. Durante a fase inicial da formação de biofilme, a fímbria do tipo 1 está presente predominantemente (HERNANDES et al., 2011; SCHEMBRI et al., 2005).

A fímbria curli é o principal componente proteico da matriz extracelular de algumas espécies de enterobactérias, a qual confere a capacidade de adesão em superfícies sólidas e está relacionada com as fases iniciais de formação de biofilme, (BARNHART; CHAPMAN, 2006) e também é considerado um fator de virulência deste patógeno, sendo melhor expressa em temperaturas abaixo de 30 °C (CASTONGUAY et al., 2006; PRINGENT-COMBARET et al., 2001).

Neste trabalho, o gene *csgA* foi detectado somente em 6 (26%) das 23 amostras de EPECa analisadas, enquanto que o gene *crl* foi amplificado em todas as amostras (100%). Para verificar se os genes detectados através da PCR estariam sendo expressos, foi realizado o ensaio fenotípico com o objetivo de relacionar a presença ou ausência da fímbria curli com a presença ou ausência do gene *csgA*.

Após o período de crescimento, pôde-se observar colônias avermelhadas provavelmente devido à interação química entre as proteínas expressas pelos genes *csgA* e *csgB*, as quais possuem alto número de folha beta-pregueada em sua conformação terciária, possuindo afinidade pela composição química do corante em questão (HAMMAR et al., 1995; OLSÉN et al., 2002; SALDAÑA et al., 2009), indicando resultado positivo para produção da fímbria curli..

Após a análise da expressão da fímbria curli, 11 amostras foram consideradas positivas, porém apenas 6 amostras apresentaram o gene *csgA*. Uma possível explicação para estes resultados é que os iniciadores empregados para amplificar *csgA* não anelaram eficientemente em todas as amostras, provavelmente devido à sequências divergentes neste gene, pois EPECa é um patótipo muito heterogêneo (ABE et al., 2009; CULLER, 2010; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Resultados similares foram encontrados por Hernandes et al. (2011), no qual, grande número de amostras foram negativas para *csgA* e a maioria positiva para *csgD* e os autores indicaram que possivelmente os iniciadores para *csgA* não anelaram em todas as amostras estudadas. Portanto, provavelmente este gene seja muito heterogêneo nas amostras de *E. coli*, sendo ainda que os genes de diferentes características também podem sofrer pressão seletiva devido as suas funções apresentando deleções, mutações ou polimorfismos (variantes) (MOURA et al., 2009), não podendo ser amplificados as vezes com os iniciadores empregados.

Ainda em relação à fímbria curli, três amostras foram positivas para *csgA* e negativas para expressão da fímbria curli. Uma explicação para estes resultados é a ausência de outros genes importantes para montagem da fimbria ou a ausência de condições necessárias para a expressão destes. Alguns trabalhos ilustram este tipo de resultado em amostras de EPECa que possuem todo o aparato para formação da lesão A/E, porém, *in vitro* não são capazes de formá-las e quando ensaiadas através de biópsias intestinais humanas são positivas para a lesão (BAI et al., 2008; ROCHA et al., 2011). Outro exemplo são amostras de *Escherichia coli* K-12 as quais não expressam curli, embora todos os genes funcionais necessários estejam presentes (PRINGENT-COMBARET et al., 2001). Portanto, outro fator que pode ter contribuído foi a condição de cultivo utilizada neste ensaio que pode não ter propiciado um ambiente apto à expressão desta estrutura.

Zogaj et al. (2001) verificaram que espécies pertencentes às *Enterobacteriaceae* possuem em sua matriz extracelular a celulose, componente importante na prevenção de choques químicos e mecânicos. A celulose desempenha uma função na adesão a células

epiteliais, juntamente com a fímbria curli (SALDAÑA et al., 2009). Celulose é um dos principais componentes da matriz e, em conjunto com a fímbria curli pode formar uma camada hidrofóbica muito resistente às intempéries do meio externo, formando um complexo rígido na mucosa intestinal do hospedeiro permitindo a sua manutenção por um período de tempo maior, sem ser eliminado do hospedeiro (BARNHART; CHAPMAN, 2006; ZOGAJ et al., 2001).

As amostras de EPECa ensaiadas através da PCR para este gene apresentaram 100% de positividade e posteriormente foram ensaiadas para verificar presuntivamente a expressão da celulose através do cultivo das amostras em ágar contendo o corante Calcofluor. Este corante tem afinidade com um dos produtos da matriz extracelular do biofilme, os β-glucanos, e concomitante ao cultivo bacteriano em meio sólido contendo este composto, o Calcofluor se liga ao composto recém sintetizado (RÖMLING et al., 2003; SOLANO et al., 2002).

Apesar de todas as amostras serem positivas para o gene *bcsA*, 10 (43,5%) amostras não expressaram o fenótipo conferido por este gene. Desta forma, a presença da sequência genética não significa que a celulose será expressa, sendo às vezes necessária a atuação de outros genes, assim como existe a influência de nutrientes presentes no meio e condições ambientais. No entanto, podem ocorrer mutações espontâneas e/ou pequenas deleções de genes, impedindo a sua expressão.

Após a análise da expressão da fímbria tipo 1, fímbria curli e celulose, foi analisada a motilidade das 23 amostras. As amostras de *E. coli* geralmente são móveis por possuir flagelos peritríquios (HOUDT; MICHIELS, 2005) e a motilidade tem importância na interação inicial com o substrato e deslocamento sobre o mesmo, uma vez que esta auxilia a superação das forças repulsivas da superfície do substrato, facilitando o crescimento e distribuição do biofilme. A motilidade flagelar é considerada um importante fator para formação inicial de biofilme (PRATT; KOLTER, 1998) e também para dispersão do mesmo (McCLAINE; FORD, 2002; WOOD et al., 2006). Sendo assim, consideramos que o estudo da presença do flagelo é importante devido a sua função no estabelecimento e dispersão do biofilme.

Neste trabalho, 18 (78,3%) amostras apresentaram motilidade, sendo que 5 (21,7%) apresentaram-se imóveis, porém apresentaram formação de anel na interface ar-líquido-vidro e formação de biofilme, principalmente a 26 °C, indicando possivelmente que no momento da adesão inicial bacteriana, o flagelo pode não estar desempenhando uma função importante sendo esta realizada por outras estruturas, tais como fímbria curli, fímbria tipo 1 ou outras

fímbrias. Das 5 amostras imóveis, 4 expressam ou fímbria curli ou fímbria tipo 1, com exceção da amostra BA 2991.

Wood et al. (2006) demonstraram através de diferentes mutações em genes que conferem motilidade que a capacidade de *E. coli* K-12 formar biofilme está diretamente correlacionada com a capacidade de se mover em meio aquoso. Apesar disso, a motilidade não é um requisito absoluto para a formação de biofilme, além de que bactérias não móveis podem formar esta estrutura sob determinadas condições, como demonstrado em *E. coli* K-12 (PRATT; KOLTER 1998) e EAEC (SHEIKH et al., 2001).

Reisner et al. (2003) demonstraram que quando amostras de *E. coli* albergavam um plasmídeo que superexpressa constitutivamente pili conjugativa, que possivelmente age como um fator de adesão célula-célula e célula-superfície, a presença do flagelo era dispensável na formação de biofilme. Pringent-Combaret et al. (2000) também verificaram que a expressão de flagelo pode ser dispensada em amostras de *E. coli* que superexpressam a fímbria curli.

Portanto, estes resultados indicam que a motilidade também não é fundamental para EPECa formar biofilme, uma vez que a presença de estruturas fimbriais possam auxiliar na adesão inicial da bactéria-substrato, sem a necessidade de flagelo.

Através dos resultados obtidos, verificou-se que a maioria das amostras amplificou diversos genes envolvidos na formação de biofilme e que também foram capazes de expressar esses fatores nas condições empregadas, indicando a sua potencialidade em formar biofilme, possivelmente num comportamento multifatorial ou multicelular. Outros fatores não estudados podem estar associados à formação de biofilme nessas amostras, inibindo-a ou estimulando-a.

Para verificar a capacidade de adesão e de formação de biofilme pelas amostras de EPECa na interface ar-líquido-vidro e tentar relacionar com a fímbria curli, fímbria tipo 1, celulose e motilidade, foi realizado o ensaio de formação de anel em tubos de vidro. A 26 °C, quase todas as amostras formaram anel ao serem incubadas nos meios LB, LB sem NaCl e caldo *E. coli* (acima de 91,3% das amostras), enquanto que apenas 39,1% das amostras incubadas no meio mínimo M9 foram positivas. No entanto, os resultados obtidos a 37 °C se mostraram contrários aos apresentados a 26 °C, em que nos meios LB, LB sem NaCl e M9 o porcentual de amostras positivas foi menor do que 13%, enquanto que no caldo *E. coli*, 91,3% das amostras formaram anel. Deste modo, o meio mínimo M9 foi o que menos proporcionou a formação de anel e o caldo *E. coli* o que mais proporcionou, para ambos os meios e temperaturas.

O meio M9 pode ter apresentado estes resultados pelo fato de ser um meio composto apenas por sais, carentes de aminoácidos essenciais os quais são fundamentais para produção de estruturas proteicas, tais como fímbrias e adesinas. Além disso, a produção de fímbrias tem uma demanda altamente energética e o modo de vida em comunidade bacteriana (biofilmes) induz um grande número de genes relacionados a estresse assim como genes envolvidos em transporte, por exemplo, genes de bomba de efluxo (KVIST et al., 2008), que prejudicariam a formação de fímbrias em meio mínimo M9 e consequentemente, as bactérias permaneceriam no estágio planctônico (HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011).

Quanto a maior formação de biofilme verificada em caldo *E. coli*, pode ser devido a presença de sais biliares em sua composição, os quais são capazes de estimular a adesão de EPEC em células epiteliais (JESUS et al., 2005) e possivelmente podem estar estimulando a expressão de fímbrias responsáveis pela adesão em superfície abiótica, como por exemplo fímbria curli e fímbria tipo 1.

Em relação a maior formação de anel a 26 °C, possivelmente seja devido a maior expressão da fímbria curli nesta temperatura, pois em alguns trabalhos foram relatados que diversas amostras apresentam maior expressão de curli em temperatura ambiente (CASTONGUAY et al., 2006; PRINGENT-COMBARET et al., 2001). Weiss-Muskat et al. (2010) também verificaram, apenas a 26 °C, que amostras mutantes em fímbria curli (*csgFG*) não formaram estruturas similares a anéis em tubos de ensaio, enquanto as amostras selvagens e complementadas formaram, indicando que fímbria curli está envolvida com a formação desta estrutura.

Porém, algumas amostras que foram negativas para a expressão da fímbria curli, apresentaram a formação de anel. Uma possível explicação para estes resultados pode ser devido à presença da fímbria tipo 1, pois em trabalho de Hernandes et al. (2013) foi verificado que mutantes em fimbria tipo 1 (*fimA*) são incapazes de formar estruturas similares a anéis em tubo de ensaio, enquanto as amostras selvagens e complementadas formavam esta estrutura. No entanto, os autores ensaiaram suas amostras para este teste apenas a 37 °C. Deste modo, não é possível saber se as amostras testadas em ambos os trabalhos, Hernandes et al. (2013) e Weiss-Muskat et al. (2010), apresentariam o mesmo perfil em temperaturas diferentes das ensaiadas pelos autores.

Portanto, tanto a fímbria tipo 1 quanto fímbria curli podem estar envolvidas na formação de anel na interface ar-líquido-vidro.

Por fim, algumas amostras foram negativas para a expressão da fímbria tipo 1 e da fímbria curli, mas foram capazes de formar anel na interface ar-líquido-vidro, indicando que outras estruturas ainda não descritas possam estar envolvidas na adesão das amostras na parede do tubo ou que possivelmente celulose também esteja envolvida nesta formação.

Uma amostra que indica a presença de outros possíveis genes envolvidos na formação de biofilme é a amostra BA 2991, pois não expressou nenhuma das estruturas estudadas (fímbria curli, celulose, fímbria tipo 1 e motilidade), ao menos nas condições testadas neste trabalho, porém mesmo assim foi capaz de formar biofilme e anel em algumas condições.

Portanto, esses resultados sugerem que a 26 °C a fímbria tipo 1 possa também estar envolvida com a formação de anel na parede do tubo e que ainda outras estruturas estejam realizando esta função.

Outras estruturas que possivelmente estariam implicadas na adesão e/ou formação de biofilme poderiam ser a adesina denominada pilus comum de *E. coli* (*E. coli* common pilus - ECP), cuja subunidade maior da pilina é codificada pelo gene *ecp*A; assim como o antígeno 43 (Ag43), uma proteína autotransportadora de superfície codificada pelo gene *flu* que confere capacidade de agregação célula-célula, resultando em floculação e sedimentação bacteriana. Ambas as estruturas são amplamente distribuídas em *E. coli* patogênicas e comensais (BELOIN, ROUX; GHIGO, 2008; HERNANDES et al., 2011; PRATT; KOLTER, 1998), e poderiam estar atuando juntamente com as estruturas pesquisadas nesse estudo, possivelmente num processo multifatorial, ou compensando a ausência de expressão destas. Vale ressaltar que a maioria das amostras do presente estudo possuem os genes que codificam algumas estruturas fimbriais como fímbria polar longa (LPF), ECP e Pil, além de Ag43 (dados não publicados).

A vantagem de formar biofilmes na superfície do líquido seria a maior aeração devido ao contato mais próximo do ar fornecendo assim um aporte maior de energia em relação às bactérias que estão mais abaixo (HASMAN; CHAKRABORTY; KLEMM, 1999; OLD; DUGUID, 1970). Para tanto, fímbrias assim como celulose poderiam permitir que as bactérias flutuem, estabelecendo-se rapidamente na superfície do meio formando uma camada bacteriana, a qual possibilitaria a utilização do oxigênio atmosférico para posterior produção de energia (OLD; DUGUID, 1970).

O ensaio de anel é uma metodologia que se aproxima mais da verdadeira produção de biofilme, não apresentando a situação de depósito ou sedimentação bacteriana como o que ocorre nos fundos dos poços das microplacas de titulação. No entanto, é um ensaio qualitativo

e para aferirmos quantitativamente a formação de biofilme, para podermos classificar os níveis de potencial para aderir e formar biofilme analisamos as 23 amostras deste estudo através do ensaio colorimétrico com cristal violeta, que indiretamente quantifica a biomassa bacteriana.. O cristal violeta é um corante básico que tem afinidade por moléculas negativamente carregadas, à peptideoglicanos e à polissacarídeos na matriz extra celular, porém não indica se a célula bacteriana se encontra viável ou morta (MOREIRA et al., 2006, PEETERS; NELIS; COENYE, 2007). O corante tem afinidade somente com o material biológico e não adere ou adere de forma insignificante ao poliestireno das placas empregadas no ensaio, evitando assim um resultado falso positivo para formação de biofilme (DANESE; PRATT; KOLTER, 2000; PRATT; KOLTER, 1998).

Apesar deste ensaio ser menos laborioso comparado às demais metodologias empregadas para esta finalidade (por exemplo, contagem de UFC/cm^2) e também provido de baixo custo, é sujeito a variações de resultados devido à desidratação que estas amostras são submetidas (MOREIRA et al., 2006). Ainda assim, esta metodologia é muito utilizada em diversos trabalhos que estudam a formação de biofilme, em diversas espécies bacterianas (*Vibrio cholerae*, EPEC, ETEC, EAEC, EHEC, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras). No entanto, apesar das limitações desta metodologia, os resultados obtidos neste estudo não sofreram muitas variações entre si.

As condições pesquisadas neste ensaio foram as mesmas para a metodologia de formação de biofilme na interface ar-líquido-vidro. Ambas foram ensaiadas com a finalidade de mimetizar a colonização no meio ambiente (26 °C) e no hospedeiro (37 °C). Os meios LB e LB sem NaCl foram ensaiados para verificar o perfil da capacidade de formação de biofilme frente à diferentes condições de osmolaridade. Os meios M9 e caldo *E. coli* foram ensaiados com a finalidade de verificar o perfil da capacidade de formação de biofilme frente à diferentes locais de colonização, mimetizando algumas condições do meio ambiente (M9) e o hospedeiro (caldo *E. coli*).

A composição dos meios de cultivo podem induzir fatores de virulência (BUSTAMANTE et al., 2001; HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011), criando condições que influenciam positivamente ou inibem a formação de biofilme.

A osmolaridade propiciada pela adição de NaCl ou glicose em meios de cultivo influencia a expressão de estruturas bacterianas, como fímbria curli que é produzida em baixa osmolaridade. Em trabalho realizado por Pringent-Combaret et al. (2001) foi verificado que a osmolaridade (e não forças iônicas do meio de cultivo) é responsável pela adesão bacteriana,

ocorrendo inibição da formação de biofilme na presença de alta osmolaridade no mesmo, sendo um fator chave para promover a formação desta estrutura. Em trabalho realizado por Serra, Richter e Hengge (2013), foi demonstrado que a baixa concentração de NaCl favorece a expressão de *csgD*, que por sua vez aumenta a expressão de celulose e fímbria curli em *E. coli* K-12. Deste modo, foi escolhido o meio LB sem NaCl e LB com NaCl para comparar se a osmolaridade interfere na formação de biofilme das amostras de EPECa estudadas. Na condição de 26 °C, o meio de cultura em que foi evidenciado maior número de amostras com capacidade de formarem biofilme em placa de MTP foi o LB sem NaCl, corroborando com os dados obtidos por Serra, Richter e Hengge (2013).

Pudemos verificar que o caldo *E. coli* proporcionou excelentes condições para a formação de biofilme. Esse meio apresenta em sua composição sais biliares, os quais são encontrados na porção inicial do intestino delgado, o duodeno, e sabe-se que EPECa coloniza todo o intestino delgado (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006; SPERANDIO et al., 2003). A exposição aos sais biliares induz genes específicos de estresse em *E. coli*, os quais elevam a adesão aos enterócitos (BERNSTEIN et al., 1999), devido a indução da expressão de adesinas de EPECt (JESUS et al., 2005). Dessa forma, empregamos o caldo *E. coli*, havendo a possibilidade de analisar as amostras de EPECa frente à substância de estresse descrita e presente no intestino humano.

A amostra BA 4157 apresentou DO>2,0 (a mais elevada entre todas as amostras) sob a temperatura de 26 °C nos meios M9 e LB sem NaCl enquanto que a 37 °C apresentou este perfil nos meios LB e caldo *E. coli*. Estes dados no meio M9 ilustram que esta amostra possui capacidade para formar biofilme fora do hospedeiro e em condições precárias de nutrientes, onde possivelmente desenvolve esta estrutura como meio de sobrevivência e dispersão em busca de um local mais propício para colonizar (CASTONGUAY et al., 2006), sendo controlado por vias complexas de regulação (SIRCILI et al., 2004). Os meios de cultivo de diferentes osmolaridades se destacaram em condições diferentes, sendo que a amostra BA 4157 apresentou DO>2,0 em LB sem NaCl a 26 °C e em LB a 37 °C.

Quanto ao caldo *E. coli*, estaria simulando o ambiente do hospedeiro, onde os sais biliares presentes no meio atuam ocasionando estresse por desestabilizar a membrana (BEGLEY; HILL; GAHAN, 2006) e a bactéria reagiria formando biofilme para se proteger, podendo se manter naquele meio por um período prolongado. Possivelmente por esse motivo, as amostras incubadas a 37 °C em caldo *E. coli* apresentaram elevados valores de DO, inferindo uma maior capacidade de formação de biofilme sob condições de estresse. A

produção de adesinas e de matriz extracelular pode ser estimulada por esse estresse, com a finalidade de proteção às intempéries, tanto no hospedeiro (a 37 °C) quanto no ambiente (26 °C), influenciando assim a formação do biofilme. Em contrapartida, o caldo *E. coli* é um meio de enriquecimento específico para *E. coli*, proporcionando vários nutrientes que ocasionarão uma proliferação exacerbada e dessa forma mais bactérias poderão aderir ao substrato abiótico.

De modo geral, houve um crescimento predominante das amostras em meio LB sem sal a 26 °C e em caldo *E. coli* a 37 °C. Segundo Hancock, Witsø e Klemm (2011), o filme condicionante formado pela adsorção do material contido no meio de cultura modifica a superfície, tornando-a favorável para instalação da bactéria ao substrato. Os meios mencionados anteriormente, em suas respectivas temperaturas de incubação, possivelmente promoveram este filme condicionante que, nas determinadas condições, favoreceram a adesão bacteriana ao substrato e posteriormente formação de microcolônias e assim, a formação de biofilme.

Verificamos uma elevação na intensidade da formação de biofilme no meio LB sem sal a 26 °C, estando de acordo com os resultados observados por Weiss-Muszkat et al. (2010). Este grupo verificou que esse meio favorecia a formação de anel e de biofilme, além da expressão de curli e celulose em amostra de EPECa O55:H7 a 26 °C, mas não a 37 °C. Serra, Richter e Hengge (2013) verificaram a mesma influência de meios de cultura, favorecendo a expressão de fímbria curli. O efeito esperado, sendo considerado um fator de estresse, seria que as amostras apresentassem maior DO em LB devido à presença de NaCl, influenciando positivamente no aumento da DO (densidade óptica). Porém, conforme trabalho de Pringent-Combaret et al. (2001), NaCl (componente que eleva o grau de osmolaridade do meio) interfere na expressão das fímbrias curli e tipo 1, podendo assim alterar a capacidade das amostras formarem biofilme.

Portanto, uma amostra que formou biofilme em determinada condição pode não necessariamente formar biofilme em outras condições (meio, temperatura e substrato) (HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011). Por isso deve-se analisar com cautela a capacidade de formação de biofilme das amostras testadas.

De acordo com análise estatística (ANOVA) de dois fatores de medidas repetidas, existe efeito de interação significante entre meio de cultivo e temperatura, ($p<0,001$) entre as amostras bacterianas cultivadas em diferentes meios e temperaturas após 24 horas de incubação. Esses dados sugerem mais uma vez que os meios de cultivo, além de diferentes

temperaturas e diferenças das próprias amostras interferem na formação de biofilme pelas EPECa.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram variações entre formação de biofilmes pelas EPECa, tal como observado entre amostras de *E. coli* K-12 (REISNER et al., 2006), assim como em estudos realizados em amostras individuais de EAEC por Sheikh et al. (2001). Além disso, a influência das condições ambientais ressalta a necessidade de um sistema mais próximo da realidade, sendo que a escolha da composição do meio de crescimento e o substrato são fatores muito importantes. No presente trabalho tentamos nos aproximar ao máximo dessas condições. Com base em todos os dados até aqui apresentados podemos confirmar que EPECa, com heterogeneidade entre as amostras, altera sua formação de biofilme de acordo com o meio de cultura e temperatura que é exposta e que possivelmente a expressão de algumas estruturas dependem do meio de crescimento, condições de aeração do meio, assim como diferentes tipos de substrato.

Com o objetivo de visualizar mais claramente os diferentes potenciais das amostras para aderir e formar biofilme ou até mesmo a sua incapacidade nas condições testadas, foi realizada a estratificação das amostras deste estudo de acordo com a classificação de Stepanović et al. (2000), a qual apresenta-se em quatro níveis, sendo elas a ausência de formação de biofilme baixa, intermediária e alta formação de biofilme. Nas amostras estudadas, foi observado que o número de amostras em caldo *E. coli* no nível “Alta Formação de Biofilme” se destacou em relação às demais estratificações.

Pudemos verificar que a grande maioria das amostras de EPECa que foram classificadas como formadoras de biofilme, assim como as formadoras de anel nas diferentes condições de cultivo, possuíam genes relacionados com a formação de biofilme, sendo que houve uma maior expressão desses genes pela maioria das amostras, indicando uma possível associação positiva.

Após a confirmação da influência de diferentes meios de cultivo e temperaturas na formação de biofilme pelas 23 amostras de EPECa, foram selecionadas as amostras LB 5.10 por ser intermediária formadora de biofilme e por pertencer ao sorotipo O55:H7 e apresentar o padrão de adesão ALL (adesão localizada-like) e BA 4157 por apresentar alta capacidade de formação de biofilme, para serem ensaiadas através de microscopia confocal de fluorescência (CLSM – “confocal laser scanning microscopy”) em todos os meios de cultivo e temperaturas.

A CLSM possui a propriedade de capturar sessões individuais e posteriormente juntá-las através de um software para formar uma imagem 3D. A microscopia confocal requer uma fluorescência a partir da amostra, apresentando autofluorescência ou induzindo-a com colorações específicas (PAMP; STERNBERG; TOLKEN-NIELSEN, 2009).

O corante empregado na microscopia confocal de fluorescência foi o iodeto de propídio (IP), o qual apenas consegue adentrar a célula onde sua membrana esteja danificada. Este corante tem afinidade a ácidos nucleicos, corando as bactérias em vermelho (HANNIG et al., 2010; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Analisando as fotomicrografias obtidas, observa-se que as amostras apresentaram diferenças entre as condições de cultivo que foram submetidas. A amostra BA 5.10 apresentou maior capacidade de formação de biofilme na temperatura de 26 °C, apresentando-se com projeções. Entretanto esta amostra quando cultivada sob a temperatura de 37 °C, não apresentou estruturas densas. A amostra BA 4157 apresentou maior capacidade de formar biofilme a 37 °C, apresentando um perfil oposto ao da amostra LB 5.10.

Em alguns meios a formação de biofilme foi maior em relação aos outros , e às vezes apresentava estruturas mais compactas ou formação de microcolônias ou ainda estruturas semelhantes a pilares diminutos. Portanto, os dados apresentados corroboram quase totalmente com os dados obtidos através do ensaio colorimétrico com cristal violeta, principalmente em relação à influência dos diferentes meios de cultivo e temperatura na formação de biofilme. Possivelmente em períodos maiores de incubação, as amostras apresentariam estágios mais avançados de formação de biofilme, com grandes projeções formando pilares, tal como observado por Culler (2010), porém neste trabalho pudemos verificar o potencial de adesão dessas amostras ao substrato.

Após verificarmos a capacidade de adesão e de formação de biofilme pelas amostras de EPECa formam biofilmes em variadas condições de cultivo e que possuem arquitetura características em período de 24 horas, realizamos uma cinética da formação de biofilme por períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação, pois sabe-se que EPECa está envolvida em casos de diarreia persistente (HEDBERG et al., 1997; NGUYEN et al., 2006; YATSUYANAGI et al., 2003). Foram selecionadas 3 amostras de EPECa: BA 4157, LB 5.10 e BA 4013 (esta por ter apresentado uma capacidade intermediária de formação de biofilme). Empregamos os dois meios que mais propiciaram a formação de biofilme no período de 24 horas, sendo caldo *E. coli* a 37 °C e LB sem NaCl a 26 °C.

A amostra BA 4157 apresentou formação de biofilme similar entre os três períodos e nos dois meios de cultivo utilizados, mantendo seu alto potencial, enquanto a amostra BA 4013 apresentou formação de biofilme maior em caldo *E. coli*, sendo que em LB sem NaCl apresentou diminuição no período de 48 horas e posterior aumento no período de 72 horas de incubação. Em relação à amostra LB 5.10 houve um grande aumento na formação de biofilme após 24 horas de incubação, sendo que em 48 horas apresentou a maior elevação. A amostra controle DH5α manteve o seu perfil, sendo baixa formadora de biofilme enquanto a amostra EAEC 042, alta formadora, manteve o seu perfil apenas a 37 °C. No entanto, a 26 °C em meio LB sem NaCl apresentou baixa capacidade assim como a amostra DH5α, indicando que possivelmente a amostra EAEC 042 é muito sensível a modificações de temperatura, ao menos nos meios estudados. Dessa forma, verificamos a capacidade dessas amostras de aderirem e formarem biofilmes em períodos mais prolongados de incubação, indicando a sua importância potencial de ocasionar diarreia persistente e permanência prolongada no meio ambiente.

No geral, as amostras sempre apresentaram formação de biofilme mais elevada no período de 72 horas, comparado com o período de 24 e 48 horas onde as amostras LB 5.10 e BA 4013 apresentaram valores bem baixos, respectivamente, através deste ensaio. Dessa forma, escolhemos o período de 72 horas para dar continuidade aos próximos experimentos.

Como o ensaio em placas de MTP propicia a sedimentação das bactérias no fundo dos poços, principalmente por serem utilizadas em condições estáticas de cultivo foi empregado um tipo diferente de placa no qual essa sedimentação não interferiria nos resultados, denominada sistema tipo MBEC – “Minimum biofilm eradication concentration” ou dispositivo de Calgary.

Nesse dispositivo, o biofilme é formado nos pinos presentes nas tampas da microplaca, sendo embebidos por meio de cultura, eliminando assim a situação de sedimentação bacteriana no fundo dos poços. Assim, não ocorrerá sedimentação bacteriana na superfície do substrato que será analisado quanto à formação de biofilme.

No entanto, a desvantagem desse tipo de placa é o alto custo em relação às microplacas comuns, a necessidade de importação, havendo apenas duas empresas fabricantes, uma no Canadá e outra na Dinamarca, e a chance aumentada de contaminação em relação à placa de MTP, devido à maior manipulação.

Para este estudo, foram selecionadas 6 amostras de EPECa e ensaiadas em período de 72 horas em placas de MTP e MBEC. De modo geral, em ambas as placas a formação de

biofilme foi semelhante, exceto em relação ao meio LB sem NaCl e caldo *E. coli* a 26 °C que apresentaram diferença significativa. O meio LB sem NaCl se destacou mais em MBEC enquanto em MTP o caldo *E. coli* apresentou maior destaque.

Estes resultados são complexos de serem analisados, pois as amostras apresentam grande heterogeneidade, tal como verificado nos ensaios após 24 horas de incubação. Esse achado corrobora com as informações apresentadas por Culler (2010), que verificou que amostras de EPECa apresentam grande heterogeneidade, tanto qualitativa quanto quantitativamente em relação à formação de biofilme, em superfície abiótica e em superfície celular a 37 ºC em meio DMEM suplementado com glicose após 24 horas de incubação, assim como em períodos mais prolongados. Cabe salientar que em estudos de diversos fatores de virulência, constatou-se que EPECa é um patótipo que apresenta grande heterogeneidade (ABE et al., 2009; TRABULSI et al., 2002)

Sendo assim, fica difícil relacionar essas diferenças entre os dois meios nos dois tipos de placas, porém uma hipótese é a expressão e regulação gênica diferente de acordo com os diferentes meios e talvez o meio LB sem NaCl esteja estimulando celulose e fímbria curli que estão envolvidas com formação de biofilme na interface ar-líquido. Além disso, a fímbria tipo 1 pode ter auxiliado nesta adesão, pois em trabalho de Hernandes et al. (2013) foi verificada relação desta fímbria com formação de anel na interface ar-líquido-vidro. No entanto, a amostra BA 558 também obteve aumento na formação de biofilme em placa de MBEC, mas não expressou fímbria tipo 1, fímbria curli e celulose nos ensaios fenotípicos realizados neste trabalho. Estes resultados levantam a hipótese de que outras estruturas estejam participando da formação de biofilme nesta amostra, ou que nesse ensaio em MBEC ocorreram condições mais adequadas para a expressão dessas estruturas e que nas condições empregadas no ensaio para avaliação das características fenotípicas não foram apropriadas.

Contudo, a amostra BA 558 apresentou grande motilidade (halo de 48 mm) e é conhecido que o gene regulador *csgD* regula positivamente curli e celulose em algumas amostras enquanto ao mesmo tempo regula negativamente flagelo (BOEHM; VOGEL, 2012). Portanto, talvez pelo fato dessa amostra não possuir curli e celulose este regulador não esteja funcional e assim não inibe flagelo que por sua vez é mais expresso. Como a bactéria tem essa maior motilidade talvez auxilie na formação de biofilme na interface ar-líquido-poliestireno na superfície do pino, em associação com outra estrutura desconhecida. Além disso, em meio líquido a bactéria está sujeita a forças da gravidade e movimento Browniano, neste momento a bactéria pode utilizar a motilidade para superar as forças repulsivas e hidrodinâmicas ao

redor da superfície, e consequentemente permitir uma maior chance de interação com a mesma (DONLAN; COSTERTON, 2002).

No caso do caldo *E. coli*, a maior formação de biofilme nesse meio pelas amostras BA 320, BA 558 e BA 4013 em MTF, em comparação com os resultados obtidos em MBEC, poderia ser possivelmente pelo efeito de sedimentação de bactérias nos fundos dos poços e/ou talvez este meio esteja estimulando a expressão de alguma fímbria que promova agregação e sedimentação, como por exemplo, o Antígeno 43. Talvez por esse motivo as bactérias formaram mais biofilme em placa de MTP em relação à placa de MBEC em algumas amostras. Outro fator a ser considerado é a diferença de superfície entre os dois tipos de placa. Conforme Mampel et al. (2006), a área de superfície de um poço de microplaca de fundo chato (MTP) é de 148 mm^2, sendo 34 mm^2 referentes ao fundo do poço, enquanto que os pinos das placas MBEC (Nunc) possuem 95 mm^2 de área (1,5 vezes menor), sendo empregados volumes de 200 µl de meio de cultura com bactérias. Os autores verificaram através de ensaio com cristal violeta, uma formação de biofilme por amostras de *Legionella pneumophila* em MBEC duas vezes menor em comparação com os valores de DO obtidos pelas amostras em MTF. No entanto, no presente trabalho não foi constatada essa menor formação em placas de MBEC em todas as amostras, as quais apresentaram grande variabilidade de resultados.

Cabe salientar que em ensaios de formação de anel em tubos de vidro várias amostras não formaram biofilmes, mas em MBEC (poliestireno) isto tenha sido possível devido às diferenças dos substratos (DONLAN; COSTERTON, 2002; HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011).

Após analisarmos a formação de biofilme por EPECa em placas de MBEC, foi realizado o ensaio através de microscopia confocal de fluorescência com o objetivo de analisar qualitativamente a formação de biofilme na interface ar-líquido-poliestireno, ou seja, na região superior dos pinos, pelas amostras BA 320 e BA 4157 em diferentes condições de cultivo.

A análise da formação de biofilme pela amostra BA 4157 mostrou diferenças na arquitetura, sendo que em LB a 37 °C e em M9 a 26 °C apresentou formação de microcolônias enquanto em caldo *E. coli* a 26 °C e 37 °C apresentou colônias mais compactas além de que esta amostra apresentou um biofilme mais espesso a 37 °C. Nos meios LB sem NaCl e LB a 26 °C, e em M9 37 °C, apesentou-se com colônias mais espaçadas. Quanto à amostra BA 320, apenas foram verificadas colônias dispersas em LB e caldo *E. coli* a 26 °C e

em LB sem NaCl a 37 °C houve o aparecimento de algumas microcolônias, enquanto que a 26 °C houve o aparecimento de várias estruturas desse tipo.

Cabe salientar que apenas em parte esses dados corroboram com o ensaio com cristal violeta em MBEC, pois ele indica a formação de biofilme ao longo de todo o pino, enquanto que através do CLSM apenas a região do anel foi analisada. Portanto, as amostras foram capazes de formar biofilme em diferentes condições de cultivo. De forma geral, os biofilmes apresentaram-se sem grandes projeções e pilares característicos de biofilme maduro, mas pudemos confirmar o potencial dessas amostras.

Posteriormente ao ensaio em MBEC com as 6 amostras de EPECa (BA 320, BA 558, BA 4013, BA 4157, LB 3.25 e LB 5.10), foi realizada a análise da arquitetura dos biofilmes através da microscopia eletrônica de varredura na parte superior dos pinos, onde se estabelece a formação do anel (interface ar-líquido-poliestireno), buscando-se estruturas que pudessem auxiliar na formação do biofilme. Para esta análise foi utilizado meio LB a 37 ° C, pois é um meio rico e muito utilizado em laboratórios de pesquisa, e que aparentemente não proporcionaria uma produção exacerbada de biofilme, como o caldo *E. coli* e assim poderíamos distinguir os níveis de produção entre as amostras, avaliando se haveria diferenças na formação de biofilme. Selecionamos a temperatura de 37 °C para simular o ambiente do hospedeiro. As amostras ensaiadas através desta metodologia apresentaram estruturas que podem estar relacionadas com a formação de biofilme, como EPS.

A amostra BA 558 apresenta uma densa estrutura, aparentemente viscosa, a qual recobre as bactérias presentes nos pinos de MBEC. Esta estrutura se assemelha com a descrição da união da expressão de fímbria curli com celulose, as quais participam do EPS. Este complexo pode formar uma camada hidrofóbica muito resistente às intempéries do meio externo. A estrutura visualizada parece ser rígida garantindo a proximidade das bactérias e estabilidade da estrutura formada. Esta estrutura confere às amostras estabilidade na colonização permitindo que não sofram segregação, dispersão e que não sejam eliminadas do hospedeiro (BARNHART; CHAPMAN, 2006; ZOGAJ et al., 2001). Porém, em nossos ensaios fenotípicos não houve expressão destas estruturas por essa amostra e possivelmente as condições utilizadas no ensaio não favoreceram a sua expressão, principalmente no caso de celulose, pois nos ensaios de expressão foi utilizada incubação de 24 horas e nos testes de microscopia eletrônica o período foi de 72 horas. Talvez em períodos maiores essa amostra possa expressar celulose. Este resultado foi semelhante ao obtido pelas as amostras BA 4013 e LB 5.10, porém nestas duas, a estrutura visualizada foi bem menor.

Na amostra BA 320 e na amostra controle EAEC 042 também foi possível verificar esta estrutura. Serra, Richter e Hengee (2013) verificaram em amostra de *E. coli* K-12 estruturas semelhantes através de congelamento e secção de colônias visualizadas através de MEV, as quais apresentaram fímbria curli e celulose na arquitetura do biofilme apresentado.

Além disso, analisamos a formação de biofilme pelas amostras BA 320, BA 4157, LB 5.10 e LB 3.25 nas diferentes porções dos pinos da microplaca de MBEC nas mesmas condições citadas acima. Foi observado que o local que apresentou maior quantidade de bactérias foi a parte superior do pino, a qual está em contato com o ar e com o meio de cultivo. Todas as amostras apresentaram adesão de forma crescente na direção da parte inferior (ponta) para a parte superior do pino, exceto a amostra BA 320 que apresentou quantidades semelhantes de bactéria nas partes mediana e inferior do pino.

Cabe salientar que em ensaios de formação de anel em tubos de vidro várias amostras não formaram biofilmes, mas em MBEC (poliestireno) isto tenha sido possível devido às diferenças dos substratos (DONLAN; COSTERTON, 2002; HANCOCK; WITSØ; KLEMM, 2011). Deste modo, houve presença de anel e também adesão por toda a superfície do pino que estava imersa no meio de cultivo com bactérias planctônicas.

A adesão inicial da bactéria ao substrato depende de interações eletrostáticas e físico-químicas. As forças de atração e repulsão permitem uma interação fraca entre a bactéria e substrato, resultando em uma adesão reversível. Este tipo de adesão é influenciado fortemente por condições ambientais, inclusive pela composição da superfície do substrato (BELOIN; ROUX; GHIGO, 2008; DUNNE-JUNIOR, 2002). O filme condicionante formado no tubo de vidro pode ser diferente em relação ao formado em poliestireno, influenciando a adesão bacteriana dependendo da natureza das moléculas envolvidas (OFEK; DOYLE, 1994; WATNICK; KOLTER, 1999). Portanto, a visualização da estrutura na conformação de anel no pino foi observada.

A vantagem desta localização para as bactérias aderidas nesta região do pino é apresentar uma maior dispersão, pois poderiam se desprender e colonizar outras áreas mais facilmente, além de obter uma maior oxigenação.

Como a técnica de MEV não permite a visualização 3D desta estrutura (anel na interface ar-líquido-poliestireno), estas amostras foram ensaiadas e observadas qualitativamente em microscópio confocal de fluorescência.

A amostra BA 558 que apresentou uma densa camada recobrindo as bactérias visualizadas através da metodologia MEV, apresentou-se densa e sem estruturas salientes

através da CLSM. Já as amostras que apresentaram pouco material recobrindo-as (BA 320, BA 4013, BA 4157 e LB 5.10), mostraram-se densas e com estruturas que lembram microcolônias, além de apesentarem bactérias espaçadas, não colonizando totalmente a superfície. Esses dados podem ser devido ao tempo de incubação e material utilizado, o qual propiciou o aparecimento de estruturas bem estabelecidas, culminando no aparecimento de microcolônias.

Portanto, as amostras deste estudo possuem diferentes características e diferentes formações de biofilme dependendo do meio de cultivo, temperatura, substrato e expressão gênica, os quais indicaram o potencial para aderir e formar estruturas tridimensionais em períodos mais prolongados. A baixa temperatura possibilitou as amostras formarem biofilme em superfície inerte, a qual poderia ser uma estratégia de sobrevivência no ambiente e servir como reservatório contaminando crianças que vivem em áreas com deficiência em saneamento básico e higiene, assim como adultos. Devido ao fato de poucos trabalhos sobre estudo de formação de biofilme em amostras de EPECa terem sido realizados, esse estudo contribuiu para o melhor entendimento a respeito das características genotípicas e fenotípicas das amostras de EPECa, que possam influir na formação de biofilme.

6 CONCLUSÕES

- A formação de biofilme pelas amostras de EPECa foi melhor evidenciada em meio LB sem sal a 26 °C e em caldo *E. coli* a 37 °C, após 24 horas de incubação, comprovando que os meios de cultivo e as temperaturas de incubação interferem na formação de biofilme.

- A formação de anel na interface ar-líquido-vidro foi observada na maioria das amostras de EPECa incubadas a 26 ^{o}C e a 37 ^{o}C em caldo *E. coli*, enquanto que nos demais meios a formação de anel predominou apenas nas amostras incubadas a 26 ^{o}C, dessa forma apresentando-se temperatura dependente, sendo que celulose e fímbria curli podem estar envolvidas em seu desenvolvimento.

- Foram detectados genes relacionados com a formação de biofilme na maioria das amostras, caracterizando-as como potenciais amostras formadoras de biofilme. As suas expressões em algumas amostras evidenciaram uma maior formação de biofilme, aparentemente num possível processo multifatorial.

- A fímbria tipo 1 parece não ter relação com a formação de biofilme nas amostras estudadas, pois reduzido número de amostras expressou essa estrutura, apesar de apresentar o gene *fimH*. A fímbria curli e a celulose não foram expressas por muitas amostras, provavelmente devido às condições de cultivo não terem sido favoráveis, apresentando melhor desempenho a 26 °C, indicando que essas estruturas podem estar relacionadas ao ambiente externo. A motilidade parece não ter relação com formação de biofilme de EPECa nesse estudo. Outros fatores ou estruturas possam estar associados à formação de biofilme nessas amostras, de forma compensatória.

- Biofilmes formados por amostras representativas de EPECa em microplacas de fundo chato (MTP) e microplacas MBEC após 72 horas de incubação não apresentaram diferenças significativas em ensaio quantitativo, no entanto devemos levar em conta que MTP pode formar depósito/sedimento, enquanto que na segunda este artefato não se encontra presente.

- As análises microscópicas através de CLSM e MEV possibilitaram a análise qualitativa das amostras estudadas, apresentando suas estruturas e disposição do biofilme sob o substrato abiótico.

REFERÊNCIAS*

ABE, C. M.; TRABULSI, L. R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M. R.; TADDEI, C. R.; MARTINEZ, M. B.; PIAZZA, R. M. F.; ELIAS, W. P. 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.

ARNOLD, T.; GROßMANN, K.; BAUMANN, N. Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. **Anal. Bioanal. Chem.,** v. 396, p. 1641-1653, 2010.

BAI L.; SCHÜLLER S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J. B.; GOMES, T. A. T.; JIANGUO, X.; PHILLIPS, A. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic Escherichia coli O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2008.

BARNHART, M. M.; CHAPMAN, M. C. Curli biogenesis and function. **Annu. Rev. Microbiology**, v. 60, p. 131-147, 2006.

BARRIOS, A. F.; ZUO, R.; REN, D.; WOOD, T. K. *Hha*, *YbaJ*, and *OmpA* regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. **Biotechnol Bioeng**., v. 93, p. 188-200, 2006.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Appl. Environ. Microb.**, v. 72, p. 1729-1738, 2006.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M. *Escherichia coli* biofilms. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**., v. 322, p. 249-289, 2008.

BENZIMAN, M.; HAIGLER, C. H.; JR. R. M. B.; WHITE, A. R.; COOPER, K. M. Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 11, p. 6678-6682, 1980.

BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; BEARD, S.; SCHNEIDER, J. Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. **Curr. Microbiol.**, v. 39, p. 68-72, 1999.

BIAN, Z.; BRAUNER, A.; LI, Y.; NORMARK, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* Curli fibers in human sepsis. **J. Inf. Dis.**, v. 181, p. 602-612, 2000.

BISCOLA, F. T.; ABE, C. M.; GUTH, B. E. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 2201-2208, 2011.

---

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; REIS, V. M.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hvdrophila* e *Staphylococcus aureu*s usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 886-895, 2009.

BOEHM, A.; VOGEL, J. The csgD mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. **Mol. Microbiol.**, v. 84, p. 1-5, 2012.

BOKRANZ, W.; WANG, X; TSCHÄPE, H.; RÖMLING, U. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **J. Med. Microbiol.,** v. 54, p. 1171-1182, 2005.

BRITO, B. G.; VIDOTTO, M. C.; BERBEL, M. M.; TAGLIARI, K. C. Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas –UPEC para suínos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 645-652, 2004.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K. BLACK, R. E. WHO estimates of the causes of death in children. **Lancet**, v. 365, p. 1147-1152, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; TADDEI, C. R.; SANTOS, M. F.; FRANZOLIN, M. R.; MARTINEZ, M. B.; FERRER, S. R.; BARRETO, M. L.; TRABULSI, L. R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 102, p. 839-844, 2007.

BUSTAMANTE, V. H.; SANTANA, F. J.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 664-678, 2001.

CASTONGUAY, M. H.; van der SCHAAF, S.; KOESTER, W.; KROONEMAN, J.; van der MEER, W.; HARMSEN, H.; LANDINI, P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Res. Microbiol.**, v. 157, n. 5, p. 471-478, 2006.

CERI, H; OLSON, M.; MORCK, D.; STOREY. D.; READ, R.; BURET, A.; OLSON, B. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods Enzymol.**, v. 337, p. 377-385, 2001.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 1771-1776, 1999.

CHAPMAN, M. R., ROBINSON, L. S.; PINKER J. S.; ROTH R.; HEUSER J.; HAMMAR, M.; NORMAK, S.; HULTREN, S. J. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. **Science**, v. 295, p. 851–885, 2002.

CHARACKLIS, W. G.; MCFETERS, G. A.; MARSHALL, K. C. Physiological ecology in biofilm systems. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: John Wiley and Sons, 1990. p. 341–394.

CHILCOTT, G. S.; HUGHES, K. T. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 694-708, 2010.

CLARKE, S. C.; HAIGH, R. D.; FREESTONE, P. P.; WILLIAMS, P. H. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli* a global pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 365-378, 2003.

CLEARY, J.; LAI, L.; SHAW, R. K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology,** v. 150, p. 527-538, 2004.

COLLINSON, S. K.; EMÖDY, L.; MÜLLER, K. H.; TRUST, T. J.; KAY, W. W. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 4773-4781, 1991.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **J. Cell Biology,** v. 105, p. 1473-1478, 1987.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DEBEER, D.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; JAMES, J. Biofilms, the customized microniche . **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 2137-2142, 1994.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Ver. Microbiol**., v. 41, p. 435-464, 1987.

CULLER, H. **Formação de biofilme por amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DA RE, S.; GHIGO, J. M. CsgD-Independent Pathway for Cellulose Production and Biofilm Formation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 3073-3087, 2006.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide Production Is Required for Development of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Architecture. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 12, p. 3593-3596, 2000.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 847-867, 2000.

DECKER, E. M. The ability of direct fluorescence-based, two colour assays to detect different physiological states of oral Streptococci. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 33, p. 188-192, 2001.

DEWANTI, R.; WONG, A. C .L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* 0157:H7. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 26, p. 147-164, 1995.

DONLAN R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**. v. 7, p. 277-281, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 15, p. 167-193, 2002.

DUNNE-JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: see any good biofilm lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-166, 2002.

ELIAS, W.; PORANGABA, T.; BUERIS, V.; SIRCILI, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Prevalence of autotransporter protein genes of diarrheagenic *Escherichia coli* among coil atypical enteropathogenic *E. coli* strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF BACTERIOLOGY AND APPLIED MICROBIOLOGY, 12., Istanbul. **Abstracts...** Three Divisions of the Interntional Union of Microbiological Societies, 2008. p. 137, res. BP-211.

ELLIOTT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli.* **Rev. Med. Microbiol.,** v. 6, p. 196-206, 1995.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C, The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition **Braz. J. Medical Journal.**, v. 118, n.1, p. 21-29, 2000.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, n. 2, p. 136-169, 1997.

FIELDS, P. I.; BLOM, K.; HUGHES, H. J.; HELSEL, L. O.; FENG, P.; SWAMINATHAN, B. Molecular characterization of the gene encoding H antigen in *Escherichia coli* and development of a PCR-restriction fragment length polymorphism test for identification of *E. coli* O157:H7 and O157:NM. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1066-1070, 1997.

FLEMMING, H. C. Bioflims and environmental protection. **Water Sci. Technol.**. v. 27, p. 1-10, 1993.

FLEMMING, K.; KLINGENBERG, C.; CAVANAGH, J. P.; SLETTENG, M.; STENSEN, W.; SVENDSEN, J. S.; FLAEGSTAD, T. High *in vitro* antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms. **J. Antimicr. Chemoth.**, v. 63, p. 136-145, 2009.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Rev. Microbiol.,** v. 8, p. 623-633, 2010.

FRANKEL, G.; PHILIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiology**, v. 30, p. 911-921, 1998.

FRANZOLIN, M. R.; ALVES, R. C. B.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L. R.

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

GARMENDIA, J.; FRANKEL.; CREPIN V. F. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cell Microbiol.**, v. 6, p. 1167-1183, 2005.

GOLIM, M. A.; DEFFUNE, E.; ROSSI-FERREIRA, R.; OLIVEIRA, A. P. E.; PADOVANI, C. R.; MACHADO, P. E. A. Conjugação e validação de controle isotípico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemotr.**, v. 29, p. 361-368, 2007.

GOMES, T. A. T.; IRINO, K.; GIRÃO, D. M.; GIRÃO, V. B. C.; GUTH, B. E. C.; VAZ, T. M. I.; MOREIRA, F. C.; CHINARELLI, S. H.; VIEIRA, M. A. M. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.,** v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GOPHNA, U.; BARLEV, M.; SEIJFFERS, R.; OELSCHLAGER, T. A.; HACKER, J.; RON, E. Z. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. **Infect. Immunol.**, v. 69, p. 2659-2665, 2001.

GOMES, T. A. T.; RASSI, V.; MACDONALD, K. L.; RAMOS, S. R. T.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. M.; GUTH, B. E. C.; CANDEIAS, J. A. N.; IVEY, C.; TOLEDO, M. R. F.; BLAKE, P. A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, **Brazil. J. Infec. Dis**., v. 164, p. 331–337, 1991.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 361, p. 512-519, 2003.

GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; SOUSA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E.; TROWBRIDGE, F. L.; HUGHESSS, J. M. Prospective study of diarrheal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **J. Infect. Dis.**, v. 148, p. 986-997, 1983.

HANCOCK, V.; WITSØ, I. L.; KLEMM, P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **Int. J. Med. Microbiol**., v. 301, p. 570-576, 2011.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 95-108, 2004.

HANNIG, C.; FOLLO, M.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Visualization of adherent microorganisms using different techniques. **J. Med. Microbiol**., v. 59, p. 1-7, 2010.

HASMAN, H.; CHAKRABORTY, T.; KLEMM, P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 16, p. 4834-4841, 1999.

HAMMAR, M.; ARNQVIST, A.; BIAN, Z.; OLSÉN, A.; NORMARK, S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 661-670, 1995.

HEDBERG, C. W.; SAVARINO, S. J.; BESSER, J. M.; PAULUS, C. J.; THELEN, V. M.; MYERS, L. J.; CAMERON, D. N.; BARRETT, T. J.; KAPER, J. B.; OSTERHOLM, M. T. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **J. Infect. Dis.,** v. 176, p. 1625-1628, 1997.

HERNANDES, R. T.; DE LA CRUZ, M. A.; YAMAMOTO, D.; GIRÓN, J. A.; GOMES, T. A. T. Dissection of the role of pili and the type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.,** 2013. In press.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A.; GOMES, T. A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli.* **FEMS Microbiol Lett**., v. 297, p. 137-149, 2009.

HERNANDES, R. T.; VELSKO, I.; SAMPAIO, S. C.; ELIAS, W. P.; ROBINS-BROWNE, R. M.; GOMES, T. A.; GIRÓN, J. A. Fimbrial Adhesins Produced by Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 8391-8399, 2011.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. USA: Lippincott, 1993.

HOUDT, R. V.; MICHIELS, C. R. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res. Microbiol.,** v. 156, p. 626-633, 2005.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicr. Agents**, v. 35, p. 322-332, 2010.

HUANG, L.; MITTLA, B.; SANGER, J. W.; SANGER J. M. Host focal adhesion protein domains that bind to the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Cell Motil. Cytoskel.**, v. 52, p. 255-265, 2002.

ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; KAWATA, K.; OKABE, S. Increased Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Mature Biofilms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 4093-4100, 2009.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 236, p. 163-173, 2004.

JESUS, M. C. de; URBAN, A. A.; MARASIGAN, M. E.; BARNETT FOSTER, D. E. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 1430-1440, 2005.

JOHNSON, L.; HORSMAN, S. R.; CHARRON-MAZENOD, L.; TURNBULL, A. L.; MULCAHY, H.; SURETTE, M. G.; LEWENZA, S. Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiol.**, v. 24, n. 13, p. 115, 2013.

JONAS, K.; TOMENIUS, H.; KADER, A.; NORMAK, S.; RÖMLING, U.; BELOVA, L.M.; MELEFORS, Ö. Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. **BMC Microbiol.**, v. 24, p. 70-79, 2007.

KAPER, J. B. Defining enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.,** v. 27, p. 130-133, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-138, 2004.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes, bacterial biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 7376-7382, 2008.

KNUTTON, S. Electron microscopical methods in adhesion. **Methods Enzymol**., v. 253, p. 145-518, 1995.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLEN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KORHONEN, T. K. Yeast cell agglutination by purified enterobacterial pili. **FEMS Microbiology Letters**, n. 6, p. 421-425, 1979.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int. J. Food Microbiol.,** v. 42, p. 9-27, 1998.

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; HOYLE, B. D.; COSTERTON, J. W.; CALDWELL, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6558-6567, 1991.

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. Microscale analyses of the formation and nature of microbial biofilm communities in river systems. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v. 2, p. 85-97, 2003.

LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R.; SWERHONE, G. D. W. Application of multiple parameter imaging for the quantification of algal, bacterial and exopolymer components of microbial biofilms. **J. Microbiol. Methods,** v. 32, p. 253-261, 1998.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBERL, L.; BREEUWER, P.; DEIP, B.; STEPHAN, R. Biofilm Formation, Extracellular Polysaccharide Production, and Cell-to-Cell Signaling in Various *Enterobacter sakazakii* Strains: Aspects Promoting Environmental Persistence. **J. Food. Protec.,** v. 68, p. 2287-2294, 2005.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, p. 353-362, 2003.

LU, T. K.; COLLINS, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 1197-1202, 2007.

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. **Annu. Rev. Genetics**, v. 26, p. 129-156, 1992.

MAIRENA, E. C.; NEVES, B. C.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Curr. Microbiol.,** v. 48, p. 412-418, 2004.

MAMPEL, J.; SPIRIG, T.; WEBER, S. S.; HAAGENSEN, J. A. J.; MOLIN, S.; HILBI, H. Planktonic replication is essential for bioflim formation by *Legionella pneurnophila* in a complex medium under static and dynamic flow conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 2885, 2006.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm Formation in the Industry: a review. **Food Ver. Int.**, v. 8, 573-603, 1992.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Dis.,** v. 42, p. 106-118, 1998.

MCCLAINE, J. W.; FORD, R. M. Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 78, n. 2, p. 179-189, 2002.

MCCLUSKEY, C.; QUINN, J. P.; MCGRATH, J. W. An evaluation of three newgeneration tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. **Microb. Ecol.,** v. 49, p. 379-387, 2005.

MELLIES, J. L.; ELLIOT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE) encoded regulator (Ler). **Mol. Microbiol.,** v. 33, p. 296-306, 1999.

MOL, O.; OUDEGA, B. Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli.* **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 25-52, 1996.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORAES, L. R.; CANCIO, J. A.; CAIRNCROS, S.; HUTTLY, S. Impact of drainage and sewerage on diarrhoea in poor urban areas in Salvador, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, p. 153-158, 2003.

MOREIRA, C. G.; CARNEIRO, S. M.; NATARO, J. P.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P. Role of type 1 fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative Escherichia coli. **FEMS Microbiol. Lett.**, n. 226, p. 79-85, 2003.

MOREIRA, C. G.; PALMER, K.; WHITELEY, M.; SIRCILI, M. P.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V.; CASTRO, A. F. P.; SPERANDIO, V. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by Enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 3952-3961, 2006.

MORENO, A. C. R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T. A. T.; RAMOS, S. T. S.; MONTEMOR, L. P. G.; TAVARES, V. C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, p. 50-57, 2010.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 7399-408, 2009.

NARA, J. M.; CIANCIARULLO, A. M.; CULLER, H. F.; BUERIS, V.; HORTON, D. S. P. Q.; MENEZES, M. A.; FRANZOLIN, M. R.; ELIAS, W. P.; PIAZZA, R. M. F. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J. App. Microbiol.**, v. 109, p. 35-43, 2009.

NATARO, J. P.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; BRAVO, N.; LEVINE, M. M. Detection of an adherence factor of Enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli.* **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M; RUIZ, V.; BLANCO, J; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial. Pathog.,** v. 45, p. 86-91, 2008.

NAVES, P.; PRADO, G.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Differences in the in vitro susceptibility of planktonic and biofilm-associated *Escherichia coli* strains to antimicrobial agents. **J. Chemoth.**, v. 22, p. 312-317, 2010.

NETER, E. Symposium on Enterobacteriaceae of medical significance: isolation, identification, and pathogenic potentialities. In:_____. **Fifty-sixty general meeting of the Society of American Bacteriologists**. Houston, Texa, 1955.

NEUT, D.; HENDRIKS, J. G.; VAN HORN, JR.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and slime excretion on antibiotic-loaded bone cement. **Acta Orthop.**, v. 76, p. 109-114, 2005.

NEU, T. R.; WOELFL, S.; LAWRENCE, J. R. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, p. 161-172, 2004.

NGUYEN, R. N.; TAYLOR, L. S.; TAUSCHEK, M.; ROBINS-BROWNE, R. M. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12**,** p. 597-603, 2006.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm-"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, p. 125-138, 2007.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 519-523, 2007.

OCHOA, T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.,** v. 102, p. 852-856, 2008.

OFEK, I.; DOYLE, R. J. Bacterial adhesion to cells and tissues. In: OFEK, I.; DOYLE, R. J. (Ed.). New York: Chapman and Hall, 1994.

OH, Y. J.; JO, W.; YANG, Y.; PARK, S. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, v. 107, p. 869-874, 2007.

OLD, D. C.; DUGUID, J. P. Selective outrgrowth of fimbriate bacteria in static liquid medium. **J. Bacteriol.**, v. 103, n. 2, p. 447-456, 1970.

OLSÉN, A.; HERWALD, H.; WIKSTRÖM, M.; PERSSON, K.; MATTSON, E.; BJÖRCK, L. Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 227, n. 37, p. 34568-34572, 2002.

OLSÉN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v. 388, p. 652-655, 1989.

PAMP, S. J.; STERNBERG, C.; TOLKER-NIELSEN, T. Insight into the microbial multicellular lifestyle via flow-cell technology and confocal microscopy. **Cytometry,** v. 75, p. 90-103, 2009.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **J. Microbiol. Meth.**, v. 72, p. 157-165, 2007.

PETTIT, R. K.; WEBER, C. A.; KEAN, M. J.; HOFFMANN, H.; PETTIT, G. R.; TAN, R.; FRANKS, K. S.; HORTON, M. L. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 49, p. 2612-2617, 2005.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 285-293, 1998.

PRINGENT-COMBARET, C.; BROMBACHER, E.; VIDAL, O.; AMBERT, A.; LEJEUNE, P.; LANDINI, P.; DOREL, C. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 24, p. 7213-7233, 2001.

PRINGENT-COMBARET, C.; PRENSIER, G.; LE THI, T. T.; VIDAL, O.; LEJEUNE, P.; DOREL, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environ. Microbiol.**, v. 2, p. 450-464, 2000.

PROUTY, A. M.; SCHWESINGER, W. H.; GUNN JS. Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. **Infec. Immun.**, v. 70, p. 2640-2649, 2002.

REISNER. A. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 442-445, 2003.

REISNER, A.; KROGFELT, K. A.; KLEIN, B. M.; ZECHNER, E. L.; MOLIN, S. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 3572-3581, 2006.

RICHARDS J. J.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **Chembiochemistry**, v. 10, p. 2287-2294, 2009.

ROBBE-SAULE, V.; CARREIRA, I.; KOLB, A.; NOREL, F. Crl activates transcription initiation of RpoS-regulated genes involved in the multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 4453-4459, 2008.

ROBINS-BROWNE, R. M.; BORDUN, A. M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V. R.; RUSSELL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N. A.; BETTELHEIM, K. A.; FAIRLEY, C. K.; SINCLAIR, M. I.; HELLARD, M. E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 797-805, 2004.

ROCHA, S. P. D.; ABE, C. M.; SPERANDIO, V.; BANDO, S. Y.; ELIAS, W. P. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* that contains functional locus of enterocyte effacement genes can be attaching-and-effacing negative in cultured epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 1833–1841, 2011.

RÖMLING, U.; BOKRANZ, W.; RABSCH, W.; ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; TSCHÄPE, H. Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, p. 273-285, 2003.

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.

RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 247-254, 2004.

SALDAÑA, Z.; XICOHTENCATT-CORTES, J.; AVELINO, F.; PHILLIPS, A. D.; KAPER, J. B.; PUENTE, J. L.; GIRÓN, J. A. Synergistic role of curli and cellulose in celll adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. **Environ. Microbiol.**, v. 11, p. 992-1006, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCALETSKY, I. C.; FABBRICOTTI, S. H.; CARVALHO, R. L.; NUNES, C. R.; MARANHÃO, H. S.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 645-648, 2002.

SCHEMBRI, M. A.; BLOM, J.; KROGFELT, K. A.; KLEMM, P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SEPANDJ, F.; CERI, H.; GIBB, A.; READ, R.; OLSON, M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. **Perit. Dial. Int**., v. 24, p.65-67, 2004.

SERRA, D. O.; RICHTER, A. M.; HENGGE, R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. **J. Bacteriol**., 2013. In press.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL´AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 983-997, 2001.

SHERLOCK, O.; SCHEMBRI, M.A.; REISNER, A.; KLEMM, P. Novel Roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 8058–8065, 2004.

SHERLOCK, O.; VEJBORG, R. M.; KLEMM, P. The TibA Adhesin/Invasin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 1954-1963, 2005.

SHIMADA, T.; KATAYAMA, Y.; KAWAKITA, S; OGASAWARA, H.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, K.; ISHIHAMA, A. A novel regulator RcdA of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. **Microbiologyopen**, v. 1, n. 4, p. 381-394, 2012.

SIRCILI, M. P.; WALTERS, M.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2329-2337, 2004.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45-49, 1996.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 793-808, 2002.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S., KAPER, J. B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v. 96, p. 15196-15201, 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bacteria-host communication: the language of hormones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 100, p. 8951-8956, 2003.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; KAPER, J. B. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 3, p. 809-821, 2002.

STEINENBERG, R. E.; HOLDEN, P. A. Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source. **Bioflims**, v. 1, p. 37-47, 2004.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Meth.**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z.; BOYLE, J. D.; LAPPIN-SCOTT, H. M. The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. **Environ. Microbiol.**, v. 1, p. 447-455, 1999.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 56, p. 187-209, 2002.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Microbiol. Methods.,** v. 50, p. 237-248, 2002.

SUNDE, M.; BLAKE, C. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. **Adv. Protein Chem.**, v. 50, p. 123–159, 1997.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

UDE, S.; ARNOLD, D. L.; MOON, C. D.; TIMMS-WILSON, T.; SPIERS, A. J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental Pseudomonas isolates. **Environ. Microbiol.**, v. 8, p. 1997-2011, 2006.

UHLICH, G. A.; COOKE, P. H.; SOLOMON, E. B. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. **Appl. Environ. Microb.**, v. 72, p. 2564–2572, 2006.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, p. 406-414, 2009.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J. M.; YAO, Y.; FISCHER E. R.; DeLEO, F. R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881-54886, 2004.

WALKER, J. T.; MACKERNESS, C. W.; MALLON, D.; MAKIN, T.; WILLIETS, T.; KEEVIL, C. W. Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water-system by chlorine dioxide. **J. Ind. Microbiol.**, v. 15, p. 384-390, 1995.

WARDLAW, T.; SALAMA, P.; BROCKLEHURST, C.; CHOPRA, M.; MASON, E. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **Lancet**, n. 375, p. 870-872, 2010.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Mol. Microbiol.**, v. 34, p. 586-595, 1999.

WEISS-MUSZKAT, M.; SHAKH, D.; ZHOU, Y.; PINTO, P; BELAUSOV, E.; CHAPMAN, M.R.; SELA, S. Biofilm formation and multicellular behavior in *Escherichia coli* O55:H7 an atypical enteropathogenic strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 1545-1554, 2010.

WILSON, M. Bacterial biofilms and human disease. **Science progress.**, v. 84, p. 235-254, 2001.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, p. 661-667, 2000.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 3687-3694, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Program for control of diarrhoeal diseases (CDD/83.3 Rev1). In: _____. **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections**. Genebra, 1987. p. 113.

WOOD, T. K.; BARRIOS, A. F. G.; HERZBERG, M.; LEE, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 361-367, 2006.

YATSUYANAGI, J.; SAITO, S.; MIYAJIMA, Y.; AMANO, KEN-ICHI.; ENOMOTO, K. Characterization of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Harboring the *astA* Gene That Were Associated with a Waterborne Outbreak of Diarrhea in Japan. **J. Clin. Microbial.**, v. 41, p. 2033-2039, 2003.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infect. Immun.,** v. 71, p. 4151-4158, 2003.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of Salmonella typhimurium and Escherichia coli produce cellulose as the second

component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1452-1463, 2001.

APÊNDICE A – Constituintes dos meios de cultivo empregados

Caldo Luria Bertani (LB)

Peptona	10 g	
Extrato de levedura	5 g	
Cloreto de sódio	10 g	
q. s. p.	1000 mL	pH = 7,2

Caldo Luria Bertani sem sal (LB sem sal)

Peptona	10 g	
Extrato de levedura	5 g	
q. s. p.	1000 mL	pH = 7,2

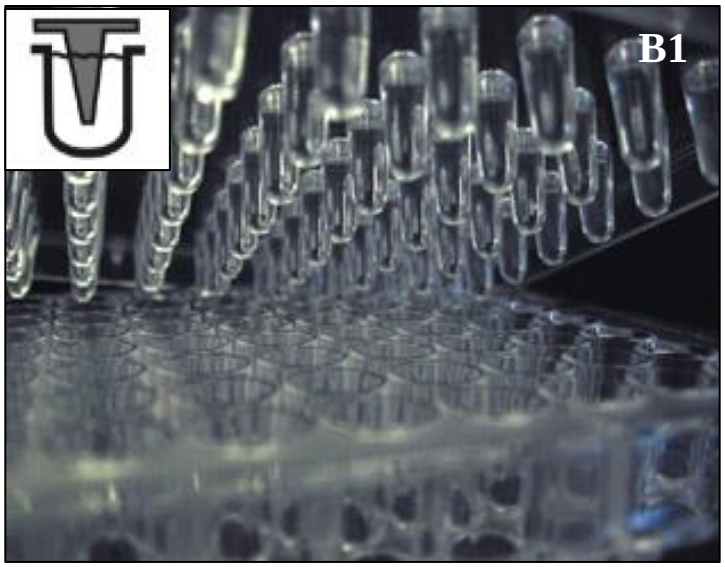
Meio Mínimo M9

Sulfato de magnésio	2 mL	
Glicose	20 mL	
Fosfato dibásico de sódio	6 g	
Fosfato monobásico de potássio	3 g	
Cloreto de sódio	0,5 g	
Cloreto de amônio	1 g	
q. s. p.	1000 mL	pH = 7,1

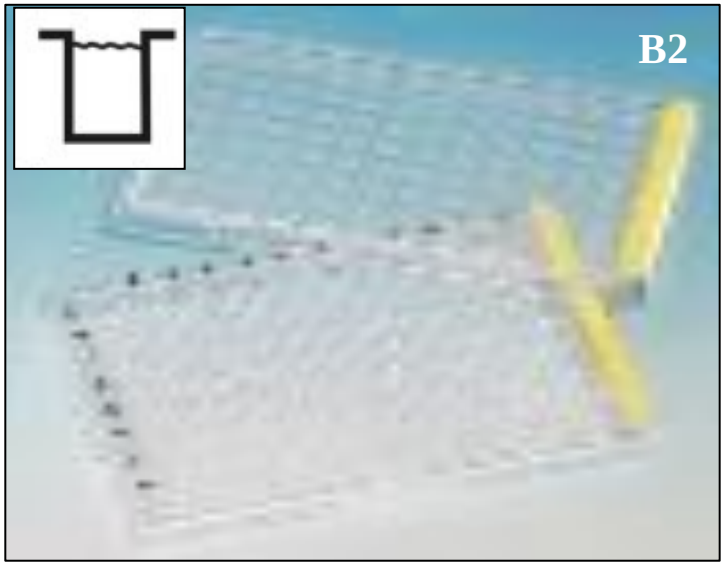
Caldo *E. coli*

Caseína enzimática hidrolisada	20 g	
Lactose	5 g	
Mistura de sais bileares	1,5 g	
Fosfato monobásico de potássio	1,5 g	
Fosfato dibásico de sódio	4 g	
Cloreto de sódio	5 g	
q. s. p.	1000 mL	pH = 7,0

APÊNDICE B – Placas utilizadas nos ensaios de formação de biofilme (MBEC e MTP)



MBEC



MTP