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

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.

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.

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.