

**HEBERT FABRICIO CULLER**

**“FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGÊNICA ATÍPICA”**

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

**Orientadora: Dra. Marcia Regina Franzolin**

**Co-orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili**

**São Paulo – SP**

**2010**

## RESUMO

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

As *Escherichia coli* enteropatogênica atípicas (EPECa) são amostras que apresentam como principal característica de patogênese a formação da lesão *attaching and effacing* (A/E) no epitélio intestinal, não transportam o plasmídeo EPEC *adherence factor* (pEAF) e ultimamente tornaram-se os agentes bacterianos mais comuns em nosso meio, como causa de diarreia infantil. A adesão em células epiteliais formando microcolônias é um passo inicial na formação de biofilme. Biofilmes microbianos são definidos como comunidades complexas formadas por microrganismos aderidos a superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos e são associados à persistência bacteriana e a resistência a antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi verificar a capacidade de formação de biofilme de 92 amostras de EPEC atípicas em superfícies abióticas e celulares (células pré-fixadas), utilizando placas de poliestireno com 24 poços. Estas amostras foram submetidas à pesquisa dos genes *bfpA*, *espA*, *perA* e *shf* através de PCR e foram realizados teste de adesão à células epiteliais e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. As 92 amostras foram analisadas através do ensaio colorimétrico com cristal violeta (CV) em superfície abiótica. Foram selecionadas 12 amostras e analisadas, em períodos de 24 h, através de contagem de UFC/cm<sup>2</sup> e microscopia confocal de fluorescência por varredura laser (CLSM). Também foram avaliadas uma amostra de EPECa de cada padrão de adesão à células HEp-2, em períodos de 24 h e 6, 12 e 18 dias de incubação a 37 °C. O gene *shf* e *bfpA* parecem não ter relação com a formação de biofilme em EPECa. Em superfície abiótica e células pré-fixadas não houve diferença significativa de formação de biofilme (UFC/cm<sup>2</sup>), mantendo-se entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. Verificou-se que de 24h para os outros 3 períodos de incubação houve diferença significativa de formação de biofilme, enquanto que não apresentou diferença entre 6 a 18 dias de incubação. As bactérias aderiram tanto às células epiteliais quanto aos espaços entre as células. Os biofilmes visualizados no aumento de 1000X revelaram-se dispersos, com apenas o desenvolvimento de muitas microcolônias, e não um biofilme denso e compacto, na amostra com padrão AL. As amostras ALL, AD, IND e AA apresentaram biofilmes mais espessos, enquanto que a amostra NA apresentou apenas adesão à lamínula e algumas bactérias aglomeradas em 12 dias sem formação de estruturas de biofilme. A metodologia de contagem de UFC/cm<sup>2</sup> e CV não devem ser empregadas isoladamente para indicar quais amostras são formadoras de biofilme, devendo-se utilizar alguma ferramenta qualitativa que permita visualizar estruturas de biofilmes como CLSM. A adesão e formação de biofilme por EPEC atípica de longo período verificadas no presente estudo pode também ser uma possível explicação para os casos de diarreia persistente, o qual poderia formar um biofilme no epitélio intestinal prolongando a sobrevivência deste patógeno, usufruindo das vantagens da resistência bacteriana à ação de antimicrobianos.

**Palavras-Chave:** *Escherichia coli*, Diarreia, EPEC atípica, Adesão, Biofilme.

## ABSTRACT

CULLER, H. F. **Biofilm formation by atypical enteropathogenic *Escherichia coli***. 120 f. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPECa) are strains that present as main pathogenic characteristic the formation of the lesion attaching and effacing (A/E) in the intestinal epithelium, they don't transport the plasmid EPEC adherence factor (pEAF) and lately they became the more common bacterial agents in our environment, as cause of infantile diarrhea. The adhesion in epithelial cells forming microcolony is an initial step in the biofilms formation. Microbial biofilms are defined as complex communities formed by microorganisms adhered to biotic or abiotics surfaces embedded in an exopolysacharidic matrix and it is associated to the bacterial persistence and the resistance to antimicrobials. The objective of this study was to verify the capacity of biofilm formation of 92 atypical EPEC strains in abiotics and cellular (pre-fixed cells) surfaces, using plates of polystyrene with 24 wells. These strains were submitted to the research of the genes *bfpA*, *espA*, *perA* and *shf* through PCR and were accomplished adhesion test to *epithelial* cells and profile of susceptibility to antimicrobials. The 92 strains were analyzed through colorimetric assay of violet crystal (CV) in surface abiotic. 12 strains were selected and analyzed, in periods of 24 h, through counting of UFC/cm<sup>2</sup> and *confocal laser scanning microscopy* (CLSM). One strain of aEPEC of each adhesion pattern to cells HEp-2 were analyzed in periods of 24 h and 6, 12 and 18 days of incubation to 37 °C. The *shf* and *bfpA* genes seem not to have relationship with the biofilm formation in aEPEC. In abiotic and pre-fixed cells surfaces there was not significant difference of biofilm formation (UFC/cm<sup>2</sup>), staying between 10<sup>6</sup> and 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. It was verified that of 24 h for the other 3 periods of incubation there was significant difference of biofilm formation, while it didn't present difference among 6 to 18 days of incubation. The bacteria adhered so much to the *epithelial* cells as for the spaces among the cells. The biofilms visualized in the increase of 1000X were revealed dispersed, with just the development of a lot of microcolonys and no a dense and compact biofilm, in the strain with pattern LA. The samples LAL, DA, IND and AA presented thicker biofilms, while the sample NA just presented adhesion to the coverslips and some bacteria agglomerated in 12 days without formation of biofilm structures. The methodology of counting of UFC/cm<sup>2</sup> and CV should not be used separately to indicate which strains are forming biofilms, should be used some qualitative tool that allows to visualize biofilms structures as CLSM. The adhesion and biofilm formation for atypical EPEC of long period verified in the present study can be also a possible explanation for the cases of persistent diarrhea, which it could form a biofilm in the intestinal epithelium prolonging the survival of this microorganisms, enjoying the advantages of the bacterial resistance to the antimicrobials action.

**Key Words:** *Escherichia coli*, Diarrhea, Atypical EPEC, Adhesion, Biofilm.

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 *Escherichia coli*

Foi descrita em 1885 pelo pediatra alemão Theodore Escherich e primeiramente sob a denominação de *Bacillus coli comune*. Porém após uma revisão foi renomeada para *Escherichia coli* em referência ao pesquisador que a descobriu (CHEN; FRANKEL, 2005).

A bactéria *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram-negativo facultativo, sendo um dos habitantes mais comuns do trato intestinal humano e/ou animal (HOLT, 1993). As bactérias do gênero *Escherichia* são uma das primeiras a colonizar o trato gastrointestinal humano, sendo identificada nos primeiros dias de vida e, após a colonização permanecerá como membro da nossa microbiota intestinal até o fim da nossa vida (GUARNER; MELAGELADA, 2003).

No entanto, apesar dessas bactérias serem membros da microbiota humana e/ou animal, algumas delas, devido a aquisição de fatores de virulência por transferência horizontal, podem causar doenças (NATARO; KAPER, 1998). Essas amostras capazes de causar doenças são denominadas patogênicas e podem causar infecções intestinais e extra-intestinais.

As *E. coli* que causam infecções extra-intestinais, tais como meningite, bacteremia, sepse e infecções do trato urinário são chamadas de *Escherichia coli* extra-intestinais (ExPEC), por outro lado, amostras que causam infecções intestinais são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas (ECD) (NATARO; KAPER, 1998).

## 1.2 *Escherichia coli* diarreio gênicas

A diarreia infecciosa é considerada uma das principais causas de mortalidade infantil, principalmente nos países em desenvolvimento. Inúmeros patógenos estão associados à diarreia infecciosa, dentre os agentes infecciosos mais prevalentes estão organismos como *Cryptosporidium* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e as ECD são responsáveis por inúmeros surtos de diarreia (NATARO; KAPER, 1998).

Atualmente as ECD são classificadas em 6 patótipos ou categorias, considerando seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e/ou os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. Esses patótipos de *E. coli* diarreio gênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que adere difusamente a células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). Alguns desses patótipos incluem microrganismos bastante diferentes. Sendo assim, as EAEC e EPEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir uma subcategoria de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

DAEC foi assim denominada devido ao padrão de adesão que apresenta em células epiteliais cultivadas *in vitro*, onde as bactérias mostram-se aderidas de forma difusa sobre toda a superfície celular. Duas adesinas foram identificadas em amostras dessa categoria. Entretanto, o mecanismo de patogenicidade de DAEC ainda permanece pouco elucidado (ELLIOTT; NATARO; 1995).

EAEC é definida como a categoria de *E. coli* diarreio gênica que adere a células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa e que não secreta as enterotoxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT) elaboradas por ETEC (NATARO *et al.*, 1987). As manifestações clínicas resultantes da infecção por EAEC são a diarreia aguda e persistente (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2005).

STEC são amostras que podem causar gastroenterite e colite hemorrágica, podendo ainda causar uma severa complicação renal, a síndrome hemolítico urêmica (SHU), devido à translocação da toxina de Shiga (Stx) através do intestino (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 (NATARO; KAPER, 1998).

EIEC apresenta a capacidade de invadir, de multiplicar-se em células epiteliais e de causar ceratoconjuntivite em cobaia, tal como *Shigella* spp., causando colite inflamatória e disenteria em humanos (LEVINE, 1987). O mecanismo de patogênese das EIEC consiste da invasão da mucosa intestinal, seguido de fagocitose e lise do vacúolo endocítico, multiplicação intracelular, movimentação no citoplasma e passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005).

ETEC pode aderir à mucosa intestinal através dos seus vários fatores de colonização e está associada à diarreia aguda e também implicada em casos de diarreia do viajante em adultos. Adesão à mucosa intestinal e a produção de uma ou ambas enterotoxinas ST e LT, são os fatores de virulência apresentados por essa categoria (LEVINE, 1987).

EPEC tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda na infância em países em desenvolvimento (NATARO; KAPER; 1998). Amostras de EPEC não secretam Stx e são capazes de causar o efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como A/E (KAPER, 1996). Essa lesão é caracterizada pela perda de microvilosidades e formação de pedestal com adesão íntima da bactéria à célula epitelial e rearranjo dos componentes do citoesqueleto (MOON *et al.*, 1983).

### **1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica**

Amostras de EPEC são capazes de causar a lesão A/E, a qual é caracterizada pela perda das microvilosidades das células intestinais e formação de um pedestal com adesão íntima da bactéria aos enterócitos, além do acúmulo de actina polimerizada e rearranjo de outros componentes do citoesqueleto (MOON *et al.*, 1983; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), tais como vinculina, talina, cortactina, ezrina entre outros (HUANG *et al.*, 2002). Os genes responsáveis por essa lesão são codificados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A região LEE contém genes para produção de uma adesina de superfície, a intimina, codificada pelo gene *eae*, bem como seu receptor denominado translocated intimin receptor (Tir), codificado pelo gene *tir*. Outros genes desta região incluem genes que codificam um sistema de secreção tipo III e genes que codificam proteínas secretadas conhecidas como *E. coli secreted proteins* (Esp) (CLEARY *et al.*, 2004). Cada uma das proteínas codificadas pelos genes da região LEE possuem função específica. A proteína EspA, por exemplo, está envolvida na adesão inicial da bactéria ao epitélio intestinal e com a formação de um tubo de translocação (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O plasmídeo *Escherichia coli enteropatogenic adherence factor* (EAF) 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 seqüência genética referente ao fragmento sonda EAF (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Ainda em relação ao plasmídeo EAF, este codifica o regulador dos genes de virulência de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002), chamado *Plasmid encoded regulator* (Per), o qual consiste em três *Open Reading Frames* (ORFs): *perA*, *perB* e *perC*. PerA é um homólogo de AraC e ativa a expressão do operon *bundle forming pilus* (*bfp*) e do LEE encoded regulator (*ler*), que por sua vez é um regulador da região LEE, especificamente através da ativação de LEE1 (MELLIES *et al.*, 1999).

AraC é uma família de reguladores que inclui mais de 100 proteínas, a maioria das quais são positivas ativadoras transcricionais, que regulam o metabolismo de carbono, resposta a stress, ou virulência. Membros desta família envolvidos com síntese de fatores de virulência são encontrados principalmente em bactérias que colonizam superfícies de mucosa, onde estimulam a síntese de proteínas envolvidas na adesão, invasão, síntese de capsula, ou captação de ferro (FINLAY; FALKOW, 1997).

Outro nível de regulação de EPEC é através do *quorum sensing*, um tipo de regulação densidade dependente que está relacionado com o controle da transcrição de diferentes genes (SIRCILI *et al.*, 2004) inclusive genes envolvidos com formação de biofilme em EPEC (MOREIRA *et al.*, 2006).

Os sorotipos de EPEC típica (EPECt) são muito homogêneos em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela região LEE e pelo plasmídio EAF (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

#### 1.4 EPEC atípica

O termo EPEC atípica foi criado em 1995 para denominar amostras de *E. coli* que diferiam das EPEC típicas por não transportarem o plasmídio *EPEC adherence factor* (pEAF) e das EHEC, por não produzirem a toxina de Shiga (KAPER, 1996) já que ambas possuem a região LEE. Uma nova visão da definição 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, presente no plasmídio EAF, seriam consideradas EPEC atípicas.

Em estudo recente realizado por Nara *et al.* (2009) foi desenvolvido um ensaio de colony immunoblot para diferenciar EPECt de EPECa pela detecção da expressão da fímbria BFP. Sabe-se que algumas amostras podem possuir o gene *bfpA*, mas estas não expressam a fímbria, ou ainda, algumas amostras podem ser negativas para a sonda EAF e expressar a fímbria BFP (GOMES *et al.*, 2004). Com base nesses dados os autores desenvolveram uma técnica rápida e de baixo custo que permite a análise de um número maior de amostras em menos tempo (NARA *et al.*, 2009).

Os sorotipos de EPEC atípica não são tão homogêneos quanto os sorotipos de EPEC típica e são constituídos de amostras com fatores de virulência codificados pela região LEE e de amostras que além desses fatores expressam outros como enterotoxinas, citotoxinas e adesinas responsáveis pelos padrões de adesão diversos (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as EPEC compreendem 12 diferentes sorogrupos O clássicos: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158 (WHO, 1987). Atualmente sabe-se que esses sorogrupos compreendem amostras de EPEC típicas e atípicas, assim como outros patótipos de DEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Porém uma grande diversidade de



sorotipos não pertencentes aos sorogrupos clássicos é freqüentemente detectada em amostras de EPEC atípicas (DULGUER *et al.*, 2003).

De acordo com Smith *et al.* (1996) e Trabulsi *et al.* (1996), as EPECa são encontradas em associação com diarreia da criança. Além da associação com diarreia endêmica, surtos de diarreia e casos de diarreia persistente causadas por esse grupo de EPEC já foram descritos (HEDBERG *et al.*, 1997; YATSUYANAGI *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2006). Os estudos realizados no Brasil também têm demonstrado associação com diarreia endêmica da criança (SCALETSKY *et al.*, 1999; BUERIS *et al.*, 2007; MORENO *et al.*, 2008).

As EPEC atípicas já estão entre um dos principais agentes de diarreia em nosso meio e em outros países (SMITH *et al.*, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007; OCHOA *et al.*, 2008). Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado um aumento do número de EPECa em relação às EPECT em números de casos (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003; AFSET *et al.*, 2004; FRANZOLIN *et al.*, 2005; BUERIS *et al.*, 2007) indicando as EPECa como patógenos emergentes.

## 1.5 Biofilme

A formação de biofilme em bactérias foi identificada muito antes de 1970, mas somente a partir desta década é que vários estudos tem se preocupado em identificar e entender sua formação, principalmente com a utilização de novas técnicas moleculares (COSTERTON *et al.*, 1987; COSTERTON *et al.*, 1999).

Em ambientes naturais, grande parte da biomassa bacteriana sobrevive aderida a superfícies, inseridas na estrutura de biofilmes. Biofilmes microbianos são definidos como comunidades complexas formadas por microrganismos aderidos a superfícies sólidas ou semi-sólidas envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Vários fatores estão implicados no desenvolvimento de um biofilme, tais como: temperatura, presença de agentes antimicrobianos, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, disponibilidade de

nutrientes e oxigênio, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos (NAVES *et al.*, 2008).

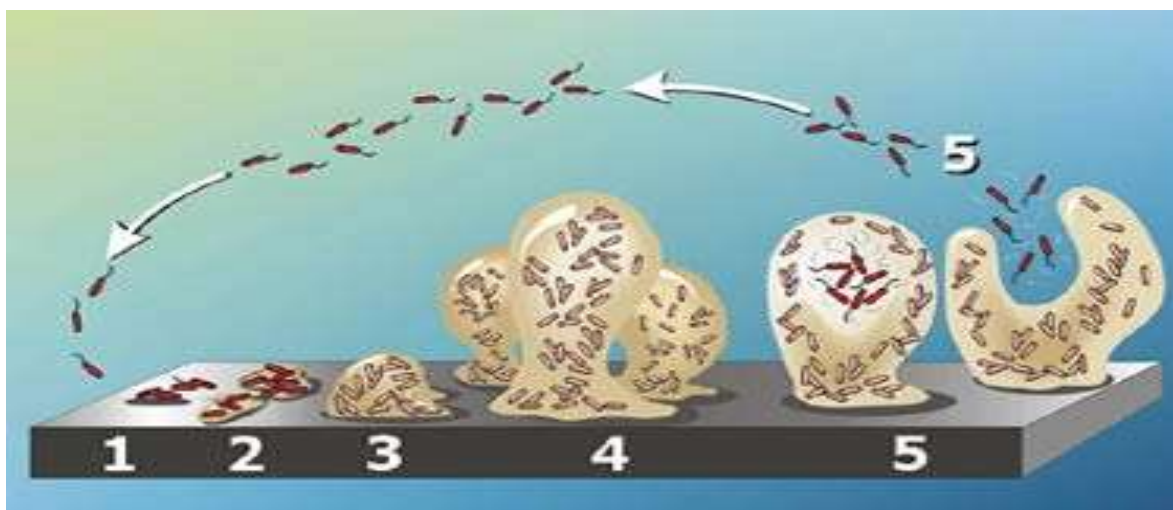
Várias espécies bacterianas são capazes de formar biofilmes (COSTERTON *et al.*, 1995). Os biofilmes geralmente são compostos por uma comunidade de microrganismos e podem ter a capacidade de aderir em superfícies abióticas como vidro, poliestireno, fibra de aço e até mesmo em superfícies bióticas como células e tecidos, podendo inclusive ser formado na superfície de água (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Os biofilmes podem apresentar estruturas de centenas de micrômetros em profundidade e exibir complexidade tanto estrutural quanto funcional (LAWRENCE *et al.*, 1991; COSTERTON *et al.*, 1994).

Um dos microrganismos mais bem estudado quanto à formação de biofilme é a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e esta tem sido extensivamente utilizada como modelo para o estudo de biofilme e a estrutura assumida por essa bactéria é geralmente mostrada como típica para o biofilme microbiano maduro (COSTERTON *et al.*, 1999).

A forma característica de biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa* apresenta um formato de cogumelo, que por sua vez são estabilizados por moléculas de EPS. Já foi verificado que amostras de *Pseudomonas aeruginosa* usam o sistema de *quorum sensing* desempenhando um papel crítico na formação de estruturas maduras e diferenciadas do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002). É também evidenciado o envolvimento desse sistema na formação de microcolônias, adesão em cultura de células epiteliais e regulação da expressão de antígeno 43, fímbria tipo I e flagelo em amostras de EPEC (SIRCILI *et al.*, 2004), sendo confirmada por Moreira *et al.* (2006) a influência positiva de LuxS na formação de biofilme na amostra de EPEC típica E2348/69.

O modelo comum para a formação, diferenciação e constituição do biofilme maduro é geralmente dividido em cinco estágios (Figura 1), que compreendem: 1 - as bactérias livres, ou também conhecidas como planctônicas, estão dispersas no meio e começam a se aproximar de superfícies sólidas através da sua motilidade ou através de fluidos, e tem que superar as forças de repulsão entre a célula e a superfície. Durante esta etapa a célula bacteriana pode facilmente se mover na superfície e as forças de interação que influenciam a reversibilidade do processo de adesão são a força de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas (KUMAR; ANAND, 1998); 2 – transição da fase reversível para a fase

irreversível da aderência a partir da produção de polímeros extracelulares e/ou pela produção de adesinas específicas na superfície das bactérias como flagelos e fímbrias, que interagem com a superfície, dessa forma esses organismos tornam-se imobilizados ao substrato iniciando sua multiplicação na superfície de contato e a formação de uma monocamada (KUMAR; ANAND, 1998); 3 – início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; 4 - Nesta etapa as bactérias começam a formar agrupamentos conhecidos como microcolônias no biofilme maduro. Durante este estágio as substâncias poliméricas extracelulares servem como uma matriz adesiva e possibilitam o acesso aos nutrientes. Forma-se também nesta etapa uma complexa arquitetura com estrutura composta por pilares de bactéria rodeados por canais de água que permitem os nutrientes e oxigênio alcançarem o interior do biofilme e permite metabólitos excretados difundirem-se para fora do mesmo. As bactérias desenvolvem padrões específicos de crescimento e diferenciação fisiológica e metabólica em relação as células planctônicas; 5 – Nesta fase ocorre a dispersão das bactérias do biofilme para o ambiente ao seu redor e o ciclo se reinicia (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN; COSTERTON, 2002, DUNNE, 2002, STOODLEY *et al.*, 2002).



**FIGURA 1.** Etapas de desenvolvimento do biofilme.

Fonte: Stoodley *et al.* (2002).

A matriz protege as células do biofilme contra a ação de biocidas e de produtos tóxicos e garante a coesão das células no interior do biofilme e também podem permitir a associação com outros microrganismos (COSTERTON *et al.*, 1994).

Além dessa proteção, as bactérias que estão crescendo dentro de um biofilme desenvolvem diferenças fenotípicas, bioquímicas e morfológicas comparado àquelas planctônicas. Com frequência, bactérias de uma mesma comunidade de um biofilme bacteriano possuem diferentes doses inibitórias mínimas a antibióticos e isso confere diferentes índices de resistência à ação de antibióticos dentro de uma mesma comunidade bacteriana, oferecendo capacidade a patógenos oportunistas permanecer como agentes infectantes por longo tempo (ITO *et al.*, 2009). Essa resistência tem sido amplamente observada e é atribuída a mudanças fisiológicas como a redução da taxa de crescimento e a produção de enzimas degradantes de substâncias antimicrobianas (KUMAR; ANAND, 1998).

Devido às essas características conferidas pelo biofilme em situações adversas, bactérias como *E. coli* podem viver por um certo tempo fora do hospedeiro (PAWAR; ROSSMAN; CHEN, 2005). Essa estratégia não é somente utilizada por *E. coli*, mas também por outras bactérias, geralmente formando microcolônias ou biofilmes para maximizar o baixo metabolismo e as condições de estresse (OTTO; HERMANSSON, 2004).

Os biofilmes apresentam provavelmente os melhores mecanismos de colonização e fixação na natureza. Diversas espécies bacterianas vêm sendo estudadas e tendo seu biofilme bem caracterizado quanto às etapas de sua formação, importância do biofilme formado, além de estarem elucidados e caracterizados os genes responsáveis pelo estabelecimento do mesmo, bem como o mecanismo responsável pela comunicação (*quorum sensing*), entre indivíduos da comunidade (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Dentre as espécies bacterianas mais estudadas quando se trata de biofilme estão, *Vibrio cholerae* (WATNICK; KOLTER, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* (O'TOOLE; KOLTER, 1998), *Staphylococcus epidermidis* (VUONG; OTTO, 2002) e *Staphylococcus aureus* (CUCARELLA *et al.*, 2001). Com relação às *E. coli* diarreio gênicas, já foi demonstrado que as amostras de *E. coli* que apresentam o padrão de adesão agregativa (EAEC) produzem biofilme regularmente (SHEIK *et al.*, 2001) e que este é usualmente relacionado com infecções persistentes, às vezes, com duração maior que 14 dias (CRAVIOTO *et al.*, 1991).

A formação de biofilme em DEC também já foi descrita em amostras de ETEC (SHERLOCK; VEJBORG; KLEMM, 2005), DAEC (SHERLOCK *et al.*, 2004) e de EHEC (RYU; BEUCHAT, 2004). A capacidade de formação de biofilme também foi

evidenciada em *Escherichia coli* comensal (*E. coli* K-12), onde as fímbrias tipo I, flagelos e fímbria curli são responsáveis pela adesão inicial e pela motilidade, importantes para o estabelecimento do biofilme em superfícies abióticas (HOUDT; MICHIELS, 2005; PRATT; KOLTER, 1998; REISNER *et al.*, 2006).

Em outros estudos realizados recentemente também foi verificado que amostras de STEC formam biofilmes em diversas superfícies como aço inoxidável, vidro, borracha, poliestireno e em superfícies de contato de alimento (KUMAR; ANAND, 1998; RYU; BECHAUT, 2004; PAWAR; ROSSMAN; CHEN, 2005; BISCOLA, 2009).

Moreira *et al.* (2006) demonstraram que EPEC forma biofilme em superfícies abióticas, vidro e poliestireno, e em superfícies celulares pré-fixadas. Mais recentemente Weiss-Muszkat *et al.* (2010) evidenciaram que amostras de EPECa do sorotipo O55:H7 formaram biofilmes em temperaturas de 26 °C, mas não em 37 °C.

Sabemos que as amostras de EPECa infectam diversos animais podendo estes servirem de reservatório para essas amostras sendo fonte de infecção para humanos (MOURA *et al.*, 2009), mas que pouco se conhece sobre a formação de biofilme e sobre sua sobrevivência fora do hospedeiro, e que estas ainda são capazes de formar biofilmes a 26 °C em condições estáticas (WEISS-MUSZKAT *et al.*, 2010). Logo, estes fatos sugerem que a formação de biofilme por EPECa em superfícies inertes e vivas podem ser uma estratégia para infectar seres humanos e talvez até animais, vivendo em áreas com deficiência em saneamento básico, higiene e alimentação, podendo ser também a explicação para os casos de diarreia persistentes e recorrentes registrados causados por EPECa.

Sabendo ainda que os biofilmes são relacionados com infecções persistentes, conferindo proteção contra antibióticos e outras adversidades, que em estudo realizado em EPECt por Moreira *et al.* (2006) seus mutantes isogênicos em *bfpA* e em *espA* formaram melhores biofilmes em relação à amostra selvagem E2348/69, e mais recentemente Weiss-Muszkat *et al.* (2010) verificaram que amostras do sorotipo O55:H7 formaram biofilme em superfície de poliestireno, espera-se que EPECa possa aderir formando biofilme em superfícies abióticas ou celulares, talvez mais desenvolvidos, visto que não possuem o plasmídeo EAF que agrega o gene *bfpA*.

## 1.6 Testes utilizados para verificar a formação de biofilme

Durante as últimas décadas, muitos modelos foram descritos para o estudo de formação e desenvolvimento de biofilme *in vitro*. Na maioria destes modelos, a quantificação de biomassa de biofilme é feita por plaqueamento convencional que é cansativo e lento (DONLAN; COSTERTON 2002). Durante os últimos anos, foram descritos diversos ensaios para quantificação de biofilme em placas de microtitulações (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Estes podem ser classificados em ensaios de biomassa de biofilme (baseado na quantificação de matriz, células vivas e mortas), ensaios de viabilidade (baseado na quantificação de células viáveis) e ensaios de quantificação de matriz (baseado na coloração específica de componentes de matriz).

O procedimento mais comum usado para mensurar a formação de biofilme é o procedimento de contagem de viabilidade em placas, ou seja, contagem de UFC/cm<sup>2</sup> (DONLAN; COSTERTON, 2002). Outra técnica muito utilizada, principalmente em trabalhos com *Escherichia coli* é a técnica através de medidas da densidade óptica.

Ambos os teste possuem vantagens e desvantagens (NEUT *et al.*, 2005; HANNIG *et al.*, 2010; HANNIG *et al.*, 2007; MOREIRA *et al.*, 2006; MOREIRA, 2005; PEETERS; NELIS; COENYE, 2007; SULE *et al.*, 2009) (Tabela 1 e 2), sendo portanto necessário uma outra técnica que permita uma visualização qualitativa desses biofilmes.

Tabela 1: Vantagens e desvantagens do método da contagem de células viáveis

Vantagens	Desvantagens
Células inviáveis, fragmentos de células mortas e material difundido no meio de cultura não interferem na obtenção de resultados	Detecta somente as células viáveis e que se repliquem, ou seja, aquelas capazes de formarem colônias; muitos indivíduos viáveis podem não se replicar, prejudicando o cálculo
Pode-se estabelecer comparações do padrão de crescimento sob diferentes condições ambientais	Se as células da bactéria estudada mantêm-se agrupadas após a divisão celular (cada colônia em meio sólido seria formada por mais de uma célula)
Pode-se estabelecer comparações do padrão de crescimento de diferentes populações bacterianas	Se as diluições não forem homogeneizadas adequadamente
Permite uma estimativa do número de células viáveis/ml da população	Se um número muito pequeno ou muito grande de colônias for usado na contagem
	Se o operador não fizer o espalhamento rapidamente e de forma adequada.
	A cada diluição um erro experimental é introduzido pela instrumentação e pelo experimentador
	Este método detecta apenas um número muito reduzido de células, o que prejudica a estimativa
	A grande quantidade de material utilizado
	O resultado do experimento é só conhecido após o crescimento das colônias isoladas nas placas de Petri

Tabela 2. Vantagens e desvantagens do método de medidas da densidade óptica

Vantagens	Desvantagens
Simplicidade da metodologia	Não é possível a estimativa do número de células/ml da população
Medidas prontamente obtidas: o resultado do experimento é conhecido ao seu final	Células inviáveis, fragmentos de células mortas e material difundido no meio de cultura interferem na obtenção de resultados
Possibilita o reconhecimento do padrão de crescimento da população bacteriana em estudo (as diferentes fases do crescimento bacteriano podem ser visualizadas em gráfico)	Não diferencia entre bactérias viáveis e inviáveis
Pode-se estabelecer comparações do padrão de crescimento de diferentes populações bacterianas;	
Pode-se estabelecer comparações do padrão de crescimento sob diferentes condições ambientais;	
Células bacterianas agrupadas após a divisão celular não prejudicam os resultados	
Reduzida quantidade de material utilizado a introdução de erros experimentais pelo operador é menor;	
O experimento não é cansativo, reduzindo a introdução de erros experimentais por parte do operador;	

O desenvolvimento da microscopia confocal de fluorescência por varredura laser (CLSM) nos anos 80 forneceu aos pesquisadores a habilidade para examinar biofilmes *in situ* sem as limitações encontradas com o microscópio eletrônico de varredura, embora com menores ampliações. No entanto, a habilidade de examinar a matriz do biofilme permanece inalterada e intacta. (DONLAN; COSTERTON, 2002).

CLSM se baseia na ligação a componentes celulares, ou constituintes do biofilme, por uso de corantes fluorescentes (conjugados ou não a proteínas) e visualização destes por uso de um apropriado comprimento de onda (ARNOLD; GROßMANN; BAUMANN, 2009). CLSM é extensamente usada pra investigar biofilmes devido sua natureza não invasiva e sua capacidade de resolução em três



dimensões (3D) (MCLEAN *et al.*, 2008; ARNOLD; GROßMANN; BAUMANN, 2009). 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).

Ao contrário da microscopia eletrônica de varredura, a preparação das amostras para CLSM é rápida e não requer desidratação das amostras. Além disso, CLSM é não destrutiva, capacitando análises de amostras biológicas vivas até mesmo se esta for muito espessa. Por movimentos da amostras no eixo Z, cortes de secções ópticas podem ser geradas para localizar estruturas diferenciadas em três dimensões (3D) (NEUT *et al.*, 2005).

Dentre alguns corantes muito usados em CLSM está o corante Syto9, usado para estudar qual é a composição e morfologia de biofilmes (LAWRENCE; NEU; SWERHONE, 1998; STRATHMANN; WINGENDER; FLEMMING, 2002). O corante fluorogênico Syto9 é um corante de ácido nucléico, o qual se difunde passivamente através das membranas celulares e fitas a DNA de células viáveis e mortas. Como DNA é também uma parte significativa da matriz extracelular, esta coloração proverá informação sobre biomassa total do biofilme (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007).

Para diferenciação entre células vivas e mortas, técnicas de quantificação baseadas na atividade metabólica de células viáveis estão disponíveis. Vários corantes de viabilidade envolvem o uso de sais de tetrazólio, incluindo 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). As principais desvantagens destes dois últimos corantes é que são muito caros. Para coloração de bactérias mortas pode-se utilizar o corante iodeto de propídio (IP) que penetra apenas em células danificadas (DECKER, 2001). Além disso, o iodeto de propídio tem baixa carga e, portanto uma alta afinidade por DNA (HANNIG *et al.*, 2010).

Dentre alguns corantes que podem ser conjugados a proteínas está o corante isoticianato de fluoresceína (FITC). FITC é 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 alteram sua polimerização

naturalmente. A faloidina tem sido usada amplamente para estudar o papel da actina em processos biológicos e como modelos para proteínas ligantes de actina. Derivados fluorescentes de faloidinas tem sido extremamente úteis para localização de filamentos de actina em células vivas e fixadas e visualização individual de filamentos de actina (COOPER, 1987).

Atualmente existe uma grande variedade de corantes que podem ser empregados para diversos fins em associação com CLSM. Em nosso estudo resolvemos utilizar os corantes, iodeto de propídio e FITC conjugado a faloidina (FITC-faloidina).

## 6 CONCLUSÕES

- O ensaio de coloração com cristal violeta é uma metodologia presuntiva para verificar a formação de biofilme, enquanto que a metodologia de contagem de UFC/cm<sup>2</sup> deve ser utilizada apenas para inferir o número de bactérias viáveis dentro de um biofilme e não deve ser utilizada para indicar quais amostras são formadoras de biofilme.
- A avaliação das amostras através de microscópio confocal de fluorescência se faz necessária para inferir qualitativamente a formação de biofilme, podendo realmente indicar quais amostras possuem a capacidade de formar biofilmes, além de permitir a visualização em que estágio de desenvolvimento se encontra o biofilme.
- A análise das amostras em relação aos padrões de adesão, perfis de resistência aos antibióticos e sorogrupo mostraram uma grande heterogeneidade das amostras de EPEC atípicas e que não há relação específica destes com a formação de biofilme nestas amostras.
- O gene *shf* parece não ter relação com formação de biofilme em EPEC atípica.
- EPEC atípica é capaz de formar biofilmes em períodos prolongados, ao menos nas condições testadas neste trabalho, mas esta capacidade não é uma característica de todas as amostras, talvez pelo fato da grande heterogeneidade das amostras deste patótipo.
- O ausência do gene *bfpA* parece não ter relação com formação de biofilme, pois algumas amostras de EPECa foram capazes de formar biofilmes e outras não tiveram essa capacidade.

## 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.

AFSET, J. E.; ANDERSSSEN, E.; BRUANT, G.; HAREL, J.; WIELER, L.; BERGH, K. Phylogenetic background and virulence profile of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from a case control study using multilocus sequence typing and DNA microarray. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p. 2280-2290, 2008.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoe. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p.1015-1019, 2003.

AFSET, J. E.; BEVANGER, L.; ROMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.

ARNOLD, T.; GROßMANN, K.; BAUMANN, N. Uranium speciation in biofilms studied by laser fluorescence techniques. **Anal. Bioanal. Chem.**, 2009. In press. doi: 10.1007/s00216-009-3296-5.

BAUER, A. W.; KIRKY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-6, 1966.

BISCOLA, F., T. **Pesquisa da formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga**. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

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. 839-44, 2007.

---

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

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.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravels pathogenesis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 83-98, 2005.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 996-1006, 1985.

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. **Microbiol.**, v. 150, p. 527-538, 2004.

CONTRERAS, C. A.; OCHOA, T. J.; LACHER, D. W.; DEBROY, C.; NAVARRO, A.; TALLEDO, M.; DONNENBERG, M. S.; ECKER, L.; GIL, A. I.; LANATA, C. F.; CLEARY, T. G. Allele variability of critical virulence genes (*eeae*, *bfpA* and *perA*) in typical and atypical EPEC in Peruvian children. **J. Med. Microbiol.**, 2009. in Press. doi: 10.1099/jmm.0.013706-0.

COOPER, J. A. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. **J. Cell Biology**, v. 105, p. 1473-1478, 1987.

CORTHESEY-THEULAZ, I.; PORTA, N.; PRINGAULT, E.; RACINE, L.; BOGDANOVA, A.; KRAEHENBUHL, J. P.; BLUM, A. L.; MICHETTI, P. Adhesion of *Helicobacter pylori* to polarized T84 human intestinal cell monolayers is pH dependent. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 3827-32, 1996.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 11, p. 217-221, 1999.

COSTERTON, J. W. A short history of the development of the biofilm concept. In: O'TOOLE, G. A. (Ed. 1). **Microbial Biofilms**. Washington: ASM Press, 2004. p. 4-19.

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. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435-64, 1987.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual 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. 2137-42, 1994.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFÁN, H.; URIBE, F.; ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**, v. 337, p. 262-264, 1991.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 2888-2896, 2001.

CZECZULIN, J. R.; WHITTAM, T. S.; HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; NATARO, J. P. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 2692-2699, 1999.

DANESE, P.; PRATT, L. A.; KOLTER, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. **J. Bacteriol.**, v. 182, 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, twocolour 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* O157:H7. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 26, p. 147-164, 1995.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167-193, 2002.

DULGUER, M. V.; FABBRICOTTI, S. H.; BANDO, S. Y.; MOREIRA-FILHO, C. A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypical and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

DUNNE JR., W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-166, 2002.

ELIAS, W. P.; UBER, A. P.; TOMITA, S. K.; TRABULSI, L. R.; GOMES, T. A. T. Combinations of putative virulence markers in typical and variant *enteroaggregative Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 129, p. 49-55, 2002.

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

FERRIERES, L.; CLARKE, D. J.; The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. **Mol. Microbiol.**, v. 50, p. 1665-82, 2003.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 61, p. 136-169, 1997.

FRANK, J. F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 43, p. 319-369, 2001.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, 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, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 359-63, 2005.

FUJIYAMA, R.; NISHI, J.; IMUTA, N.; TOKUDA, K.; MANAGO, K.; KAWANO, Y. The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of Enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation. **Curr. Microbiol.**, v. 56, p. 474-80, 2008.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, v. 254, p. 710-713, 1991.

GOLIM, M. A.; DEFFUNE, E.; ROSSI-FERREIRA, R.; OLIVEIRA, A. P. E.; PADOVANI, C. R.; MACHADO, P. E. A. Conjugação e validação de controle isotópico 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.

GOMEZ-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded regulator region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1767-1776, 1995.

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.; HUGHES, 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.

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

HANNIG, C.; HANNIG, M.; REHMER, O.; BRAUN, G.; HELLWIG, E.; AL-AHMAD, A. Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, p. 1048-1056, 2007.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2005.



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

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

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.

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. Cytoskeleton**, 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. **App. 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.

JENKINS, C.; SMITH, H. R.; LAWSON, A. J.; WILLSHAW, G. A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J. G.; TOMPKINS D. S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 25, p. 19-24, 2006.

KAPER, J. B. Defining enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130-3, 1996.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-38, 2004.

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.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

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

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. 412-8, 2004.

MARCOS, L. A.; DUPONT, H. L. Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. **J. Infect.**, v. 55, p. 385-393, 2007.

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

MCLEAN, J. S.; MAJORS, P. D.; REARDON, C. L.; BILSKIS, C. L.; REED, S. B.; ROMINE, M. F.; FREDRICKSON, J. K. Investigations of structure and metabolism within *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. **J. Microbiol. Methods**, v. 74, p. 47-56, 2008.

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

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.

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.; CAIRNCROSS, 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. **Formação de biofilme em *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. 2005. 109 f. Dissertação. (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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. 3952-61, 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. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, 2008. In press. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017.

MOURA, R. A.; SIRCILI, M. P.; LEOMIL, L.; X MATTÉ, M. H.; TRABULSI, L. R.; ELIAS, W. P.; IRINO, K.; CASTRO, A. F. P. Clonal relationship among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from different animal species and humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2009. In press. doi: 10.1128/AEM.00636-09.

NARA, J. M. **Padronização de um ensaio imunossorológico para a detecção de bundle-forming pilus (BFP) de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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.**, 2009. In press. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04625.x.

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.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P. A.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 16, p. 829-831, 1987.

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.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S14, Wayne, PA: **National Committee of Clinical Laboratory Standards**, v. 24, n. 1, 2004.

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

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

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.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 54, p. 49-79, 2000.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development Kolter. **Mol. Microbiol.**, v. 30, p. 295-304, 1998.

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.

OCHOA, T. J.; SALAZAR-LINDO, E.; CLEARY, T. G. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 229-236, 2004.

OTTO, K.; HERMANSSON, M. Inactivation of ompX Causes Increased Interactions of Type 1 Fimbriated *Escherichia coli* with Abiotic Surfaces. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 226-234, 2004.

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

PAWAR, D. M.; ROSSMAN, M. L.; CHEN, J. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. **J. App. Microbiol.**, v. 99, p. 418-425, 2005.

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.

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. 285-93, 1998.

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.

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. **App. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 247-254, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCALETSKY, I. C. A.; ARANDA, K. R. S.; SOUZA, T. B.; SILVA, N. P. Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains expressing the localized adherence-like pattern in HEP-2 cells. **J. Clin. Microbiol.**, 2009. In press. doi: 10.1128/JCM.01980-09.

SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C. A. G.; CARVALHO, R. L. B.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410-3415, 1999.

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. 983-97, 2001.

SHERLOCK, O.; SCHEMBRI, M. A.; REISNER, A.; KLEMM, P. Novel roles for the AIDA adhesion 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.

SIRCILI, M. P.; WALTERS, L. R.; TRABULSI, L. R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) 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.

STEWART, P. S.; COSTERTON, W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p. 135-8, 2001.

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.

SULE, P.; WADHAWAN, T.; CARR, N. J.; HORNE, S. M.; WOLFE, A. J.; PRÜB. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. **Let. App. Microbiol.**, 2009. In press. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02659.x.

TRABULSI, L. R.; CAMPOS, L. C.; WHITTAM, T. S.; GOMES, T. A. T.; RODRIGUES, J.; GONÇALVES, A. G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 1-6, 1996.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infec. Dis.**, v. 8, p. 508-513, 2002.

VIEIRA, M. A. M.; ANDRADE, J. R. C.; TRABULSI, L. R.; ROSA, A. C. P.; DIAS, A. M. G.; RAMOS, S. R. T. S.; ET AL. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non- enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroups that carry *eae* and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-72, 2001.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 503-511, 2005.

VUONG, C.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 481-489, 2002.

WATNICK, P. I.; KOLTER, R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. **Mol. Microbiol.**, v. 34, p. 586-95, 1999.

WEISS-MUSZKAT, M.; SHAKH, D.; ZHOU, Y.; PINTO, R.; BELAUSOV, E.; CHAPMAN, M. R.; SELA, S. Biofilm formation and multicellular behavior in *E. coli* O55:H7 an atypical enteropathogenic strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2010. In press. doi: 10.1128/AEM.01395-09.

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. Geneva, **World Health organization**, p. 113, 1987.

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. Microbiol.**, v. 41, p. 2033-2039, 2003.

ZEPEDA-LOPEZ, H. M.; GONZÁLES-LUGO, G. M. *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with prefixed cells. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1414-1417, 1995.