

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS COM A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICA (UPEC)**

**Luísa Neukamp Diedrich**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS COM A  
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI*  
UROPATOGÊNICA (UPEC)**

**Autor: Luísa Neukamp Diedrich**

**Dissertação apresentada como requisito para a obtenção  
do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

Luísa Neukamp Diedrich

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICO COM A FORMAÇÃO  
DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÊNICA  
(UPEC)

Aprovada em 22 Mar 2017.

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Laura Beatriz Rodrigues  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Thales Quedi Furian  
Membro da Comissão

## RESUMO

*Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) constitui um importante patótipo de *Escherichia coli* (*E. coli*), sendo responsável por causar infecções em seres humanos e animais. Estudos sobre as relações filogenéticas entre isolados NMEC, UPEC e APEC enfatizam as semelhanças genéticas entre estes grupos de *E. coli*, sugerindo que as estirpes aviárias possam representar um potencial risco zoonótico. Um dos grandes problemas da infecção por UPEC é o fato de que a colonização da bexiga favorece a formação de biofilmes. Diante da grande incidência de infecções do trato urinário causadas por UPEC, este trabalho buscou avaliar a relação dos grupos filogenéticos de patogenicidade com a formação de biofilmes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas em duas diferentes temperaturas. Em estudo prévio, as cepas de *Escherichia coli*, isoladas de pacientes hospitalizados com infecção urinária, foram classificadas em grupos filogenéticos. Os grupos designados B2 e D são conhecidos por possuírem patogenicidade. B2 está associado a amostras com alta patogenicidade e D, com amostras de patogenicidade intermediária. As amostras pertencentes aos grupos A e B1 são consideradas não patogênicas ou comensais. Com base neste trabalho, todas as 215 cepas de *E. coli* uropatogênica do presente estudo são oriundas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre coletadas entre os anos de 2012 a 2014. Dentre estas 52 cepas de UPEC foram classificadas como pertencentes ao grupo filogenético A (24,2%), 21 amostras ao grupo B1 (9,8%), 69 amostras ao grupo B2 (32%) e 73 amostras ao grupo D (34%). A formação de biofilme foi testada nas temperaturas de 25°C e 37°C. Quanto a formação de biofilme em placas de poliestireno na temperatura de 25±1°C observamos que 51 (23,6%) cepas foram não produtoras de biofilme e 165 (76,4%) foram produtoras de biofilme; na temperatura de 37°C±1 encontramos apenas 18 (8,3%) isolados não formadores de biofilme e 198 (91,7%) que formaram biofilme. A análise de correlação entre a produção de biofilme *in vitro* e a classificação dos grupos filogenéticos não apresenta uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ), ou seja, a produção de biofilme em poliestireno não pode ser relacionada com a patogenicidade da bactéria em questão, conforme as condições do estudo.

Palavras chaves: *Escherichia coli*, biofilme, filogenia, trato urinário.

## ABSTRACT

*Extra intestinal Pathogenic Escherichia coli (Expectations) is an important pathotype of Escherichia coli (E. coli), being responsible for causing infections in humans and animals. Studies on the phylogenetic relationships among isolates NMEC, UPEC and APEC emphasize the genetic similarities between these groups of E. coli, suggesting that avian strains may represent a potential zoonotic risk. One of the major problems of the UPEC infection is the fact that the colonization of the bladder encourages the formation of biofilms. Given the high incidence of urinary tract infections caused by UPEC, this study sought to assess the relationship of pathogenicity phylogenetic groups with the biofilm formation of Escherichia coli samples uropatogênicas at two different temperatures. In preliminary study, E. coli strains, isolated from hospitalized patients with urinary tract infection, were classified in phylogenetic groups. The groups designated B2 and D are known to possess pathogenicity. B2 is associated with the samples with high pathogenicity and D, with samples of intermediate pathogenicity. The samples belonging to the groups A and B1 are considered non-pathogenic or Diners. Based on this work, all 215 E. coli uropatogênica strains in this study are from the Clinical Hospital Porto Alegre collected from 2012 to 2014. Among these 52 UPEC strains were classified as belonging to the phylogenetic Group (24.2%), 21 samples to group B1 (9.8%), 69 samples the Group B2 (32%) and 73 samples to Group D (34%). Biofilm formation was tested at temperatures of 25° C and 37° c. As the formation of biofilms on polystyrene plates in the temperature of 25 ± 1° C we observe that 51 (23.6%) strains were not producing biofilm and 165 (76.4%) were biofilm producers; at the temperature of 37° C ± 1 we found only 18 (8.3%) isolates not trainers of biofilm and 198 (91.7%) who formed biofilms. The analysis of correlation between in vitro biofilm production and classification of phylogenetic groups does not present a significant difference ( $p < 0.05$ ), i.e. the production of polystyrene biofilm can not be linked to the pathogenicity of the bacteria in question, as the conditions of the study.*

*Key words: Escherichia coli, biofilm, phylogeny, urinary tract.*

## LISTA DE FIGURAS

- “FIGURA 1”:** DISPOSIÇÃO DOS ANTÍGENOS K (CAPSULAR), O (LIPOPOLISSACARÍDEO), F (FIMBRIAL) E H (FLAGELAR) DE *E. COLI*. ..... 17
- “FIGURA 2”:** GRUPOS FILOGENÉTICOS DE UPEC (A, B1, B2 E D) DE ACORDO COM A PRESENÇA/AUSÊNCIA DOS GENES *CHUA* E *YJAA* E O FATOR TSP4.C2 ..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**19
- “FIGURA 3”:** ETAPAS SEQUENCIAIS ENVOLVIDAS NA FORMAÇÃO DE UM BIOFILME: FIXAÇÃO INICIAL (1), FIXAÇÃO IRREVERSÍVEL (2), DESENVOLVIMENTO DA ARQUITETURA DO BIOFILME (3), BIOFILME MADURO (4) E DISPERSÃO (5). .....23

## GRÁFICO

- GRÁFICO 1:** FREQUÊNCIA RELATIVA (%) DAS CEPAS UPEC CLASSIFICADAS COMO PRODUTORAS OU NÃO PRODUTORAS DE BIOFILME NAS TEMPERATURAS DE  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  E  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . ..... 29
- GRÁFICO 2:** FREQUÊNCIA RELATIVA (%) DAS CEPAS UPEC CLASSIFICADAS COMO NÃO PRODUTORAS, FRACAMENTE PRODUTORAS, MODERADAMENTE PRODUTORAS E FORTEMENTE PRODUTORAS DE BIOFILME NAS TEMPERATURAS DE  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  E  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . ..... 30
- GRÁFICO 3:** FREQUÊNCIA RELATIVA (%) DA CLASSIFICAÇÃO DOS GRUPOS FILOGENÉTICOS DE UPEC CONFORME A SUA PRODUÇÃO (FRACA, MODERADA E FORTE) OU NÃO PRODUÇÃO DE BIOFILME PARA AS TEMPERATURAS DE  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  E  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . ..... 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Difusamente Aderente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EMB	<i>Eosine-Methylene Blue</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extra Intestinal
ITU	Infecções do Trato Urinário
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à Meningite no Recém-Nascido
OD <sub>a</sub>	Densidade óptica
OD <sub>cn</sub>	Desvio padrão de controle
p	Probabilidade de significância
PASW	Programa Statistics Base
pH	Potencial hidrogeniônico
RS	Rio Grande do Sul
SePEC	<i>Escherichia coli</i> associada à Septicemia
STEC	<i>Escherichia coli</i> shigatoxigênica
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja sem Dextrose
UFC	Unidade formadora de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica



UTIs	Unidades de Tratamento Intensivo
<i>spp</i>	Várias espécies

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
®	Marca registrada
$\pm$	Mais ou menos
$\chi^2$	Teste Qui-quadrado
~	Aproximadamente
$\leq$	Menor ou igual que
x	Multiplicação
<	Menor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Infecção do Trato Urinário</b> .....	14
<b>2.2</b>	<i>Escherichia coli</i> .....	15
2.2.1	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica (UPEC) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2.2	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária (APEC) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2.3	Relação UPEC e APEC .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>2.3</b>	<b>Biofilme</b> .....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>3.1</b>	<b>Local de Estudo e Amostras</b> .....	27
<b>3.2</b>	<b>Interpretação dos resultados</b> .....	28
<b>3.3</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
	REFERÊNCIAS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) constitui um importante patotipo de *E. coli*, sendo responsável por causar infecções em seres humanos e animais. Dentro do grupo ExPEC, *E. coli* Uropatogênica (UPEC) é capaz de colonizar o trato urinário causando cistite e pielonefrite em humanos e animais (KAPER *et al.*, 2004). Estima-se que 130 a 175 milhões de infecções do trato urinário (ITUs) humanas ocorram anualmente no mundo, sendo cerca de 80% causadas por estirpes de *E. coli* UPEC (RUSSO; JOHNSON, 2003). O grupo de *E. coli* responsável por quadros associados à meningite do recém-nascido (NMEC) pode causar lesões neurológicas graves e levar à morte de 20 a 40% de infectados (BONACORSI; BINGEN, 2005). Cepas de NMEC são também uma das principais causas de infecções nosocomiais da corrente sanguínea em lares de idosos e hospitais (RON, 2006). Ainda, amostras ExPEC isoladas de quadros de colibacilose aviária são denominadas APEC (*E. coli* patogênica aviária), as quais estão frequentemente associadas a casos de síndrome da cabeça inchada, onfalite em pintinhos e dermatite necrótica em aves (NATARO; KAPER, 2004; JOHNSON *et al.*, 2008).

Estudos avaliando relações filogenéticas entre isolados NMEC, UPEC e APEC enfatizam semelhanças genéticas entre estes grupos de *E. coli*, sugerindo; inclusive que as estirpes aviárias possam representar um potencial risco zoonótico. Especula-se que bactérias como *E. coli* possam ser transmitidas passivamente para os seres humanos através de uma variedade de rotas, incluindo a cadeia alimentar, porém é uma possibilidade difícil de ser validada (ROTHMAN *et al.*, 2008).

Segundo Clermont *et al.* (2000), amostras de *E. coli* podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos. O grupo designado B2 tem alta patogenicidade e o D, patogenicidade intermediária. Já as amostras pertencentes aos grupos A e B1 são consideradas como não patogênicas ou comensais.

Mittal *et al.* (2015) relataram que um dos grandes problemas da infecção por UPEC é o fato de que a colonização da bexiga favorece a formação de biofilmes. Diante deste fato, é possível afirmar que os biofilmes geram forte impacto clínico e são reconhecidos como responsáveis por grande parte das infecções recorrentes, tornando de difícil tratamento as infecções do trato urinário (BJARNSHOLT *et al.*, 2013; BJARNSHOLT, 2013). Estudos relatam que cerca de 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, tal fenômeno é impulsionado pelo princípio da

sobrevivência, como mecanismo de adaptação ao estresse ambiental (DOBRINDT U., 2005). Sua estrutura evolui ao longo do tempo, permitindo a construção de uma comunidade de células com forte comunicação intercelular (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX *et al.*, 2005; APARNA; YADAV, 2008). Rijavec, *et al.* (2008) constataram que a produção de biofilme pôde ser relacionada a grupos de filogenéticos de patogenicidade em estudo avaliando isolados UPEC na Eslovênia.

Com relação ao exposto, diante da grande incidência de infecções do trato urinário causadas por UPEC, este trabalho buscou avaliar a relação dos grupos filogenéticos de patogenicidade com a formação de biofilme em amostras brasileiras. Ainda, este estudo visa dar continuidade a linha de pesquisa em *E. coli* desenvolvida pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Infecção do Trato Urinário

Em condições normais, o trato urinário é considerado um ambiente estéril em que o fluxo da urina e a presença de algumas moléculas endógenas com atividade antimicrobiana mantém o sistema livre de bactérias. Pacientes portadores de infecções no trato urinário (ITU) podem ou não apresentar sintomas, que variam de simples desconforto urinário até bacteremia ou sepse, podendo inclusive levar à morte (FOXMAN, 2000; FRENCH, 2006). Os primeiros registros de reconhecimento das infecções do trato urinário datam do século IX. Somente em 1881 foi associada a presença de bactérias na urina de pacientes com sintomas de infecção do trato urinário (HEILBERG *et al.*, 1997).

As ITUs são classificadas como não complicadas quando ocorre em pacientes com estrutura e função do trato urinário normais e são adquiridas fora de ambiente hospitalar. (SANTOS, 1999). As infecções complicadas ocorrem em indivíduos que possuem alguma anormalidade estrutural ou funcional, presença de cálculos renais, doenças com predisposição à infecção renal ou na vigência de cateterismo vesical e de procedimentos cirúrgicos do trato urinário. (OPLUSTIL, 1999).

A contaminação do indivíduo geralmente ocorre com significativa contaminação do períneo com fezes e em pacientes com cateteres. Da bexiga, a bactéria pode atingir os ureteres e ascender para os rins. Esse processo é facilitado se o patógeno possuir adesinas específicas ou se ocorrer alguma anomalia com a função peristáltica do ureter (WALSH *et al.*, 2002; CHUNG *et al.*, 2010). A obstrução do fluxo urinário é um fator chave para o aumento da susceptibilidade à ITU, comprometendo os mecanismos de defesa renal e contribuindo para o aumento da concentração de bactérias na urina, facilitando a aderência dos microrganismos (SCHAEFFER, 2001).

O exame microbiológico da urina é um dos mais frequentes e mais difíceis de ser corretamente executado por vários motivos relacionados à coleta, transporte e à manipulação do material (MOURA, 1997). A infecção é definida pela presença de bactéria na urina, tendo como limite mínimo definido a existência de 100.000 unidades formadoras de colônias bacterianas por mililitro de urina ( $\geq 10^5$  UFC/mL).

Os patógenos bacterianos mais frequentemente associados com ITU incluem bacilos gram-negativos, tais como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter*

spp., e cocos gram-positivos como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae* (estreptococo  $\beta$ -hemolítico do grupo B) (FRENCH, 2006).

Os microrganismos expressam diferentes fatores de virulência que atuam em conjunto e estes fatores podem ser modulados pela resposta do hospedeiro (WULLT B., 2011). Muitas vezes estes fatores são determinantes genéticos da patogenicidade microbiana, aumentando a aptidão do patógeno durante a infecção (CHEN S.L., 2009).

A base genética da virulência tem mostrado semelhanças entre estirpes animais e estirpes humanas, podendo ser um potencial das cepas de origem animal causar doenças nos seres humanos. Supõe-se que entre as ExPEC há alguma combinação clonal entre diferentes hospedeiros animais, sendo especulando que esta combinação possa ocorrer através do ambiente em comum (água) (EWERS *et al.*, 2012). Devido ao componente animal, as intervenções de saúde animal que visam a avaliação da patogenicidade das amostras APEC são de extrema importância podendo haver alguma conexão entre APEC e UTIs humanas. Estudos têm revelado que este potencial uropatogênico é um atributo de subpopulações bacterianas, carreadoras de propriedades específicas de virulência que caracterizam os clones patogênicos (NIMMICH W., 1997; JOHNSON J.R., 2002).

## 2.2 *Escherichia coli*

Em 1885, Theodor Escherich descreveu pela primeira vez *Escherichia coli* como *Bacterium coli commune*, isolada de fezes de recém-nascidos (TODAR, 2008). Era considerada uma bactéria comensal do intestino grosso e posteriormente, em 1935, foi demonstrado que esta seria uma bactéria potencialmente patogênica, tendo sido associada a um surto de diarreia em crianças (TODAR, 2008).

A sua denominação foi modificada para *Bacillus coli* por Castellani e Chalemers em 1919. É classificada como uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, a qual é composta por microrganismos que podem crescer aerobiamente ou anaerobicamente. Crescem em temperaturas de 18 a 44°C, sendo 37°C a temperatura ótima de crescimento (FERREIRA & KNÖBL, 2009). *E. coli* utiliza como fonte metabólica carbono simples e nitrogênio, usados para fermentar seu substrato de eleição, a glicose (EWING, 1986).

A visualização da bactéria é obtida através da microscopia óptica de esfregaços corados por Gram, onde se observam bastonetes Gram-negativos curtos, isolados ou em pares e não formando esporos. Podendo apresentar motilidade devido à presença de flagelos peritríqueos.

Quando incubadas em placas de ágar durante 24 horas a 37°C, as colônias de *E. coli* têm formato baixo, convexo, liso e incolor. No Ágar EMB (*Eosine-Methylene Blue*), estas possuem coloração verde metálica escura. Já no Ágar Tergitol, as colônias desenvolvem coloração amarela. Em Ágar Sangue, é frequente a ocorrência de hemólise por *E. coli* patogênica de mamíferos (BARNES, *et al.* 2003).

As provas bioquímicas para *E. coli* são úteis para diferenciá-la das outras espécies de *Escherichia* e de outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ANDREATTI FILHO, 2006; BARNES *et al.*, 2008; FERREIRA & KNÖBL, 2009; OLIVEIRA, 2012).

A caracterização clínica, epidemiológica e genética permite que as cepas de *E. coli* sejam agrupadas em três grandes categorias: comensais, patogênicas intestinais e patogênicas extra intestinais (NATARO & KAPER, 1998). Embora 90% das cepas sejam comensais e não patogênicas, 10% podem adquirir características de patogenicidade que as tornam capazes de causar uma variedade de doenças em humanos e em animais. A patogenicidade pode ocorrer pela aquisição de genes que codificam fatores de virulência propiciando a colonização e a ocorrência de diversos eventos que alteram a fisiologia do hospedeiro. A aquisição destes genes de virulência ocorre através da transferência horizontal (SANTOS *et al.*, 2009; MIDOLLI, 2009).

*E. coli* comensal da microbiota intestinal é considerada inofensiva para seu hospedeiro, e apenas em ocasiões especiais pode ocasionar doença, sendo desta forma considerada um patógeno oportunista. Já *E. coli* patogênica intestinal ou diarreiogênica é atualmente classificada em seis patotipos *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); Enterotoxigênica (ETEC); Shigatoxigênica (STEC) dentre está a Entero hemorrágica (EHEC); Enteroinvasiva (EIEC); Enteroagregativa (EAEC) e Difusamente Aderente (DAEC), de acordo com os mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência e adesão em culturas de células epiteliais (KAPER *et al.*, 2004).

E por último, *E. coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) são cepas caracterizadas por causarem doenças em outros sítios corporais que não o intestinal. São reunidas em *E. coli* Uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada à Meningite no Recém-Nascido (NMEC), *E. coli* associada a Septicemias (SePEC) e *E. coli* Patogênica Aviária (APEC) (RUSSO & JOHNSON, 2000; KAPER *et al.*, 2004).

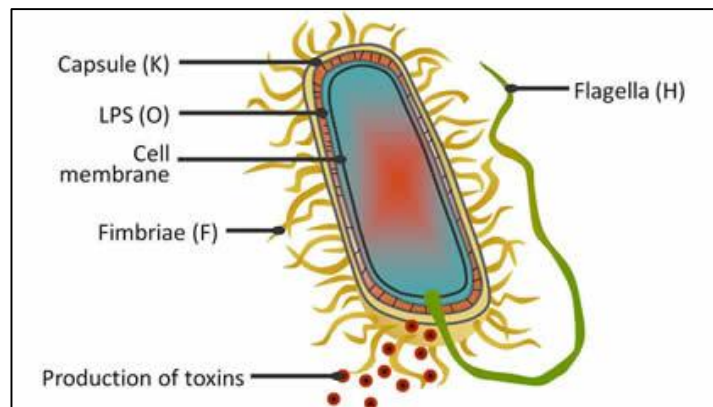
A identificação das cepas ocorre pela adoção de um critério de classificação baseado na sorotipificação em sorogrupos e sorotipos, tendo como base a composição antigênica, pois cada organismo pode expressar diferentes antígenos em sua superfície. Portanto, os antígenos analisados são o O (antígeno de lipopolissacarídeo – LPS), H



(antígeno flagelar) e o K (antígeno capsular). O primeiro antígeno citado possibilita classificar a *E. coli* em sorogrupos, sendo posteriormente combinado com o antígeno H e com o antígeno K para definição dos sorotipos. Assim, sabemos que cada combinação possui sorogrupo e sorotipo com características individuais conforme a sua atuação no hospedeiro. (ANDREATTI FILHO, 2006; BARNES *et al.*, 2008; FERREIRA & KNÖBL, 2009; OLIVEIRA, 2012).

Os antígenos F (flimbriais) embora sejam auxiliares na locomoção bacteriana, não são utilizados com frequência na identificação antigênica e a presença de flagelo não tem sido correlacionada com patogenicidade (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Os antígenos capsulares K, por sua vez, possuem polissacarídeos capsulares que protegem a membrana externa do ataque do sistema do complemento e impedem a fagocitose (MOREIRA, 2006).

Já o antígeno somático O é constituído de uma cadeia de polissacarídeo que se projeta para o espaço extracelular e cuja composição é extremamente variável entre as bactérias da mesma espécie. Esta estrutura (Figura 1) determina a existência de vários sorogrupos (FERREIRA & KNOBL, 2009).



**“Figura 1”:** Disposição dos antígenos K (capsular), O (lipopolissacarídeo), F (fimbrial) e H (flagelar) de *E. coli*. (FONTE: [http://www.ecl-lab.com/contribute\\_images/Ecoli\\_EN.jpg](http://www.ecl-lab.com/contribute_images/Ecoli_EN.jpg))

O antígeno O é responsável pelo aparecimento de mais de 176 sorogrupos, sendo que os antígenos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 e O75 são os principais antígenos O observados em UPEC. Os antígenos K e H não sofrem uma variação muito grande em comparação com o antígeno O (WILES & KULESUS & MULVEY, 2008; TENAILLON, SKURNIK, PICARD, *et al.*, 2010). As principais linhagens de UPEC conhecidas atualmente são as CFT073, 536 e F11 que expressam o antígeno O6 e UTI89,

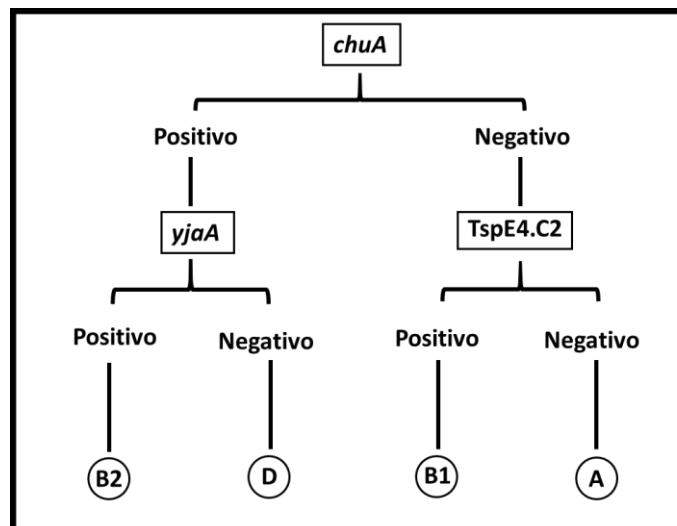
a linhagem mais bem estudada em seres humanos, que expressa o antígeno O18, e a linhagem J96 que expressa o antígeno O4 (TENAILLON, SKURNIK, PICARD, *et al.*, 2010). Entretanto, nas amostras APEC, os sorotipos mais comuns são O2, O21, O36, O50, O88, O119 e O152 (FERREIRA & KNÖBL 2000), porém atualmente já se sabe que outros sorotipos, considerados incomuns, como O6, O25, O46, O116, O111 e O143, já estão se mostrando mais prevalentes que os comumente pesquisados. Já os sorotipos O2, O6 e O25 estão mais associados ao grande grupo, as ExPEC, podendo assim ser um indicativo da capacidade de cepas humanas colonizarem aves, ou vice-versa (KNÖBL, *et al.*, 2012).

A filogenia de populações bacterianas vem sendo realizado através de métodos moleculares clássicos como a eletroforese de isoenzimas e a ribotipagem e, mais recentemente, a partir de técnicas de sequenciamento genético. Entretanto, essas metodologias são complexas, custosas e requerem tempo para ser executadas. Um método alternativo para a investigação da relação filogenética em populações de *E. coli* foi desenvolvido com base na amplificação simultânea de sequências genéticas específicas com três genes que são: *chuA* (*outer membrane hemin receptor*), *yjaA* (*uncharacterized protein yjaA genome of E. coli K-12*) e um fragmento de DNA denominado *TSPE4.C2* (*anonymus DNA fragmente*), como marcadores específicos desses grupos filogenéticos (CLERMONT *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2009).

Análises filogenéticas demonstraram que estirpes de *E. coli* são classificados em quatro grupos principais: A, B1, B2 e D; onde estirpes virulentas extra intestinais pertencem principalmente ao grupo B2 e, em menor grau, para o grupo D, ao passo que a maioria das estirpes comensais pertencem ao grupo A e B1 (CLERMONT *et al.*, 2000). Cada uma das distintas estirpes apresenta diversos fatores de virulência, com uma característica multifatorial. Estas estirpes podem ser distinguidas pela presença de marcadores de virulência específicos que são expressos de acordo com o lugar onde se encontram (DONNENBERG & WHITTAM, 2001; BEKAL *et al.*, 2003).

O gene *chuA* está presente nos grupos B2 ou D e ausente nos grupos A e B1, permitindo a distinção entre estes pares de grupos filogenéticos. O gene *yjaA* possibilita a separação entre os grupos B2 e D sendo detectado apenas no grupo B2. A presença do fragmento *TspE4.C2* caracteriza a amostra como pertencente ao grupo filogenético B1, enquanto a sua ausência está associada ao grupo filogenético A (CLERMONT, BONARCORSI, BINGEN, 2000). (Figura 2)

Em estudos efetuados verificou-se que a ITU aguda por *E. coli*, a estirpe urinária tendem a ser de estirpe fecal predominante no hospedeiro mas os isolados da ITU geralmente exibem mais fatores de virulência do que os isolados fecais dos hospedeiros saudáveis e derivam predominantemente dos grupos filogenéticos B2 e D (versus grupos A e B1 para as estirpes fecais). A estirpe da ITU é geralmente mais virulenta e mais abundante do que as estirpes fecais co-isoladas. Os clones urinários, apesar de quase sempre detectáveis na flora fecal do hospedeiro na altura da apresentação, representam um subconjunto da flora, enriquecido para os traços de virulência tradicionalmente reconhecidos e grupo filogenético B2 (MORENO E., 2008)



“Figura 2”: Grupos filogenéticos de UPEC (A, B1, B2 e D) de acordo com a presença/ausência dos genes *chuA* e *yjaA* e o fator TSP4.C2.

### 2.2.1 Relação entre UPEC e APEC

Ao alcançarem o trato urinário, as cepas UPEC enfrentam diversos mecanismos de defesa que incluem o fluxo da urina, numerosas moléculas antibacterianas e células imunes. Para superar ou evitar estas defesas e persistir na colonização das vias urinárias, as cepas desenvolveram uma série de mecanismos para aderir e invadir as mucosas do trato urinário, estimulando resposta inflamatória deletéria ao hospedeiro (GUAY, 2008; ZHAO *et al.*, 2009). Além disso, esta bactéria consegue colonizar dispositivos médicos, principalmente cateteres (SUBRAMANIAN *et al.*, 2012).

Estudos epidemiológicos mostram que a adesão bacteriana às superfícies mucosas é um fator crítico de virulência para a infecção (WULLT B., 2004). A adesão à mucosa

do trato urinário pode proteger a bactéria do fluxo urinário e por outro lado, aumentar a sua capacidade de sobreviver e invadir o tecido renal (EJRNAES, 2011).

Existem relatos que este microrganismo foi o mais frequentemente isolado em pacientes com ITU cateterizados, correspondendo a 70% dos isolados. HUNG e colaboradores (2013) demonstraram que isolados UPEC são capazes de formar biofilmes com matriz extracelular complexa.

*E. coli* patogênica aviária (APEC) é responsável por diferentes quadros infecciosos, atuando como agente primário ou secundário. A bactéria pode afetar praticamente todos os órgãos das aves, causando infecções intestinais e extra intestinais conhecidas por colibacilose (BARNES *et al.*, 2003).

As amostras avícolas mostram muitas similaridades com as humanas, sendo que a maioria dos genes de virulência possui similaridade com aquelas cepas identificadas em doenças extra intestinais em humanos (JOHNSON *et al.*, 2008a; DANZEISEN *et al.*, 2013; MORA *et al.*, 2013; MALUTA *et al.*, 2014 ). Além disso, estudos demonstram que amostras APEC podem pertencer ao mesmo clone que amostras de *E. coli* humana (MOULINSCHOLEUR *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 2007). Esta estreita relação é motivo de investigação sobre a doença, pois pode constituir risco a saúde do consumidor (ANDRADE, 2005).

As hipóteses de que a *E. coli* aviária é um reservatório de genes de virulência capaz de causar doenças transmitidas por alimentos para os seres humanos torna-se um potencial risco zoonótico. Isto se deve às características de sobreposição entre APEC e UPEC, como sorogrupos, genótipos de virulência e atribuições a grupos filogenéticos. (DOBRINDT, 2005; FOXMAN, 2014)

As cepas UPEC, assim como outras ExPEC, desenvolvem vários mecanismos para superar os desafios encontrados no organismo do hospedeiro. A patogenicidade resulta da interação de vários fatores de virulência e não apenas da ação específica de um ou outro fator. Estudos recentes têm sugerido que as carnes, particularmente as de aves, também podem ser uma fonte de transmissão das estirpes ExPEC para os seres humanos (MANGES A.R. & JOHNSON J.R., 2012).

### **2.3 Biofilme**

Inicialmente, Antonie van Leuwenhoek estudando amostras dentárias, em seu microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas do que planctônicas.

(PIZZOLITTO *et al.*, 2001; COSTERTON & WILSON, 2004 *apud* CAIXETA, 2008). A primeira publicação detalhada referente a biofilmes foi descrita por Zobell em 1943, em que o autor iniciou estudos sobre a adesão de bactérias marinhas em cascos de navios e em diferentes tipos de superfície que incluíam vidro, metal e plástico que estavam submersas (LUCCHESI, 2006; CAIXETA, 2008).

Técnicas de microscopia mais sofisticadas e efetivas foram empregadas por Costerton em 1978, o qual verificou que a maioria dos microrganismos nos ambientes naturais se encontravam fixos a suportes, e não na forma dispersa em suspensão. Aos microrganismos aderidos foi atribuído o nome de biofilme, composto por células microbianas de fisiologia distinta, chamadas sésseis. A partir de então, o significado do termo “biofilme microbiano” tem evoluído ao longo dos anos (Costerton *et al.*, 1999; Donlan, 2002; Kau *et al.*, 2005).

Um biofilme pode ser atualmente dividido em dois grupos. No primeiro grupo fazem parte os biofilmes monoespécie, quando é formado por apenas um tipo de microrganismo, ocorrendo mais em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, em consequência de processos infecciosos. No segundo grupo há os biofilmes multiespécie, quando é encontrada mais de uma espécie na comunidade microbiana (BOARI, 2008), ocorrendo geralmente no ramo alimentício, onde se utilizam outras superfícies. As células aderidas são designadas de sésseis, enquanto aquelas livres e dispersas na fase aquosa são denominadas de planctônicas (O'TOOLE *et al.*, 2000 *apud* BOARI, 2008).

Os biofilmes microbianos podem ser definidos como um sistema biológico formado por comunidades de células agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas produzidas pelas próprias células, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (DONLAN & COSTERTON, 2002; BJARNSHOLT, 2013).

Em ambientes naturais, 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento. Em ambientes inóspitos e em condições adversas, como estratégia de sobrevivência, é fundamental os microrganismos terem a capacidade para formar biofilme (SREY *et al.*, 2013). Isso pode ter causado a alta diversidade bacteriana encontradas nesses ambientes. Inclui habitats que são criados diretamente por certas bactérias e a heterogeneidade das espécies que é determinada pela presença dos microrganismos originários (FOXMAN, 2014)

Durante os processos de infecção, bactérias danificam a superfície para invadir uma área estéril do corpo, podendo induzir dano ou causar inflamação do tecido invadido. As bactérias patogênicas ou oportunistas precisam estar no lugar e no momento certo para estabelecer uma infecção evitando o sistema de defesa do hospedeiro.

Nos biofilmes de colonização encontrados em seres humanos, uma mudança no pH ou estado nutricional pode produzir novos nichos que permitem que potenciais patógenos tenham sucesso e levem à patogenicidade (COOK R.J., 1995; SPADDEN GARDENER B.B. & WELLER D.M., 2001; WELLER D.M., 2002).

Existem muitas variáveis que capacitam uma bactéria a formar biofilme, não apenas entre espécies, mas também entre diferentes estirpes pertencentes a uma mesma espécie. Vários fatores ambientais interferem no desenvolvimento do biofilme, como: temperatura, variação de pH, composição do meio, pressão, oxigênio, presença de agentes antimicrobianos, osmolaridade, disponibilidade de nutrientes, quantidade do inóculo, concentração dos metabólitos microbianos (JEFFERSON K.K., 2004).

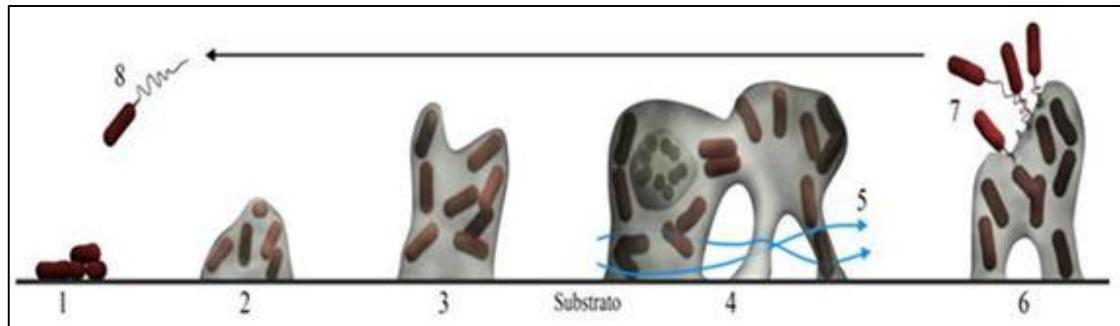
As propriedades da superfície celular, em particular a presença de apêndices extracelulares, as interações envolvidas na comunicação célula-célula e a produção de substância polimérica extracelular (EPS) são importantes fatores para a formação e desenvolvimento de um biofilme (SIMÕES *et al.*, 2010).

Uma grande variedade de microrganismos é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, incluindo lentes de contato, cascos de navios, encanamento em indústrias de alimentos e petróleo, pedras em cursos d'água e sílica, aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos e em uma variedade de implantes e aparelhos transcutâneos (RESENDE, 2005).

As características macroscópicas e, particularmente, as microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (ANDRADE, 2004). A microtopografia da superfície pode dificultar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar as células (CAIXETA, 2008). A boa qualidade dos polímeros e superfície são muito importantes para prevenir a formação de biofilmes (HAUN, 2004).

A formação de um biofilme compreende uma sequência de passos graduais e dinâmicos, que consistem na (1) fixação inicial, (2) fixação irreversível, (3) rápido

desenvolvimento da arquitetura de um biofilme, (4) maturação, (5) dispersão (TAN *et al.*, 2014, SREY *et al.*, 2013) (Figura 3).



“**Figura 3**”: Etapas sequenciais envolvidas na formação de um biofilme: fixação inicial (1), fixação irreversível (2), desenvolvimento da arquitetura do biofilme (3), biofilme maduro (4) e dispersão (5). (Fonte: PEREIRA, 2000)

### (1) Fixação inicial

Ocorre a fase de fixação inicial à superfície, a qual pode levar apenas alguns segundos ou minutos para sua ativação. É provável que sua indução ocorra através de sinais ambientais, que incluem alterações nos nutrientes e concentrações de nutrientes, temperatura, pH, concentração de oxigênio e ferro. As superfícies ásperas parecem ser mais suscetíveis à formação de biofilme e isto se deve provavelmente à redução das forças de cisalhamento (cortar ou causar deformação) e maior área de superfície de contato. Alguns estudos indicam que os biofilmes também têm uma tendência a se formarem com maior facilidade em materiais hidrofóbicos, como teflon e plásticos, do que no vidro e metal.

Nesta fase a ligação das células com a superfície é reversível e durante esta fase as células bacterianas apresentam uma taxa de crescimento logarítmica. Cabe destacar que esta adesão inicial a superfícies pode ser ativa ou passiva, dependendo da mobilidade das células. A adesão passiva depende da gravidade, da difusão e da dinâmica do fluido. Na adesão ativa, há a participação de flagelos, que facilitam o movimento da célula bacteriana a um sítio específico. Além disso, a síntese de adesinas, pili, polissacarídeos e a formação de agregados também podem influenciar o processo de fixação inicial a um substrato (CHMIELESWSKI & FRANK, 2003; APARNA & YADAV, 2008).

Ainda não são percebidas alterações fenotípicas, assim como na transição de genes, embora os genes para a produção de exopolissacarídeos sejam ativados após 15 minutos de contato entre célula e superfície. Esta adesão é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. As principais

forças deste evento são as pontes de hidrogênio, Van der Waals, ácido-base de Lewis e hidrofobicidade (BOARI, 2008; FORSYTHE, 2002);

## **(2) Ligação Irreversível**

Após o primeiro estágio, as bactérias devem manter o contato com a superfície. Porém, para que desenvolvam um biofilme maduro, é necessário que a adesão se torne irreversível. Para tal, precisam se multiplicar e ancorar seus apêndices, o que caracteriza a ligação irreversível.

Depois da aderência irreversível à superfície, as bactérias emitem sinais químicos que auxiliam na comunicação entre as células bacterianas. Uma vez que a intensidade do sinal excede um determinado nível de limiar, os mecanismos genéticos subjacentes para produção de exopolissacarídeos são ativados. Com isso, durante essa etapa são formados agregados celulares e a motilidade é diminuída quando os mesmos formam camadas com espessura superior a cerca de 10 µm (APARNA & YADAV, 2008).

Após a fixação irreversível apenas fortes forças de cisalhamento ou a quebra química das forças de fixação por enzimas, detergentes, desinfetantes e/ou calor podem ser capazes de remover/destacar o biofilme (SREY *et al.*, 2013). Vários estudos indicam que a ligação irreversível pode ter duração de 20 minutos a 4 horas, a temperaturas entre 4 e 20 °C (CHMIELEWSKI & FRANK; 2003). É quase sempre realizada pelos polímeros extracelulares; depois do contato com a superfície e a instalação microbiana, as fases de crescimento e divisão celular acontecem. Com isso, se dá a formação de material extracelular (biofilme) fortalecendo as ligações entre as células e a superfície.

## **(3) Rápido desenvolvimento da arquitetura de um biofilme (Formação de micro colônias)**

Também conhecido como maturação I, resulta na produção de matriz exopolimérica e consequente formação de micro colônias (STOODLEY *et al.*, 2002; APARNA & YADAV, 2008) que ajuda a fortalecer a ligação entre a bactéria e a superfície e estabiliza a colônia perante qualquer estresse ambiental (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). A presença de flagelos e a expressão de pili parecem ser importantes até esta fase da formação em biofilme de *Escherichia coli* (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Os exopolímeros que compõem a matriz dos biofilmes microbianos consistem geralmente de polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas, lipídios, flagelos e/ou pili.



Estes componentes dão estrutura para que as bactérias se agreguem e formem micro colônias. Contudo, estudos vêm demonstrando que a composição da substância polimérica extracelular dos biofilmes é bastante heterogênea entre as espécies (BJARNSHOLT, 2013). Por exemplo, a matriz extracelular do biofilme formado por *P. aeruginosa* é rica em alginato, já a produzida por cepas de *E. coli* é rica em ácido colânico conforme estudo demonstrado por DAVEY & O´TOOLE em 2000.

Estudos sobre espécies bacterianas em sistemas naturais mostraram que a formação de micro colônias resulta do recrutamento de células planctônicas do meio envolvente, através da comunicação (*signaling*) célula-célula (*quorum sensing*) (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014). A associação das bactérias em micro colônias traz muitas vantagens, uma vez que proporcionam a troca de substrato entre espécies e/ou a remoção do produto final das bactérias (SREY *et al.*, 2013).

#### **(4) Maturação**

Se inicia quando o biofilme alcança sua espessura final. Durante esta etapa, o biofilme adquire arquitetura complexa com canais e poros, formando uma estrutura tridimensional organizada (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2014), a qual pode ser bem espessa e visível a olho nu. Assim, torna-se possível caracterizá-lo morfológicamente, observando-se propriedades como espessura, densidade e forma que pode ser plana, ter forma de cogumelo ou seguir o modelo mosaico heterogêneo, dependendo da fonte de nutrientes que está a ser utilizada (STOODLEY *et al.*, 2002). O tempo necessário para atingir a maturação estrutural é muito variável (de um dia a várias semanas), dependendo dos microrganismos envolvidos e das condições ambientais (SREY *et al.*, 2013).

Quando o padrão de expressão gênica é investigado durante a fase de maturação do biofilme, nota-se que as células bacterianas se assemelham principalmente às bactérias planctônicas durante a fase estacionária de crescimento, exibindo pouca atividade metabólica. Além disso, existe uma regulação positiva de genes que são necessários para o crescimento anaeróbio.

Análises realizadas com microeletrodos mostraram que a parte inferior de um biofilme é anaeróbia, ocorrendo pouco crescimento bacteriano tendo atividade metabólica nesta região. Entretanto, na superfície do biofilme as condições são aeróbicas, permitindo a multiplicação celular e aumentando o metabolismo (HOIBY *et al.*, 2011).

A maturidade acontece, por meio do aumento da densidade populacional e, também, pela pronunciada produção e deposição de EPS, aumentando com isso a

espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra flutuações do ambiente. O aumento da população de um biofilme acontece tanto pela divisão celular, quanto pela redistribuição de células entre as micro colônias e pela adesão de novas células planctônicas (FORSYTHE, 2002);

### **(5) Dispersão**

Caracteriza-se pela dispersão celular e fechamento do ciclo. A dispersão é o termo geralmente utilizado para descrever o destacamento de células (individuais ou em grupos) de um biofilme. O destacamento ativo é um evento fisiologicamente regulado e está relacionado com a transição para o fenótipo planctônico das células bacterianas que estão deixando o biofilme. Em geral, é a última etapa do ciclo de formação de um biofilme, e permite que as células possam voltar à sua forma planctônica (WINKELSTROTTER *et al.*, 2013).

Alterações externas, como aumento da força de cisalhamento de fluidos, assim como processos internos que ocorrem no biofilme, tais como a degradação enzimática endógena, a liberação de EPS ou de proteínas de ligação à superfície, são todas causas possíveis para que esta última etapa se concretize. A dispersão parece ser um processo ativo que permite a colonização de novos locais. Além disso, o esgotamento da fonte de nutrientes também é considerada como uma razão para que o desprendimento ocorra, permitindo às bactérias encontrem um meio ambiente com maior disponibilidade de nutrientes (SREY *et al.*, 2013).

A partir daí, dentro de algum tempo (dias a meses), a adesão de outros microrganismos é facilitada, e ocorre a liberação de novos colonizadores que se desprendem do biofilme maduro. Os microrganismos liberados formarão biofilmes novos, caracterizando assim, um ciclo de contaminações (CHRISTENSEN & CHARACKLIS, 1990 *apud* CAPELLETTI, 2006).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de Estudo e Amostras

O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA/UFRGS). Foram utilizadas 215 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com quadro clínico compatível com infecção do trato urinário (contagem maior que  $10^5$  UFC/mL). Estes pacientes deram entrada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, Brasil, entre os anos de 2012 a 2014. Em estudo prévio, as cepas de *E. coli* foram classificadas em grupos filogenéticos conforme a árvore dicotômica elaborada por Clermont *et al.* (2000) (ROCHA, 2017 - dados não publicados). Com base neste trabalho, 52 cepas de UPEC foram classificadas como pertencentes ao grupo filogenético A (24,2%), 21 amostras ao grupo B1 (9,8%), 69 amostras ao grupo B2 (32%) e 73 amostras ao grupo D (34%).

#### 3.2 Formação de Biofilme de UPEC

Os ensaios de formação de biofilme seguiram a metodologia proposta por Stepanovick *et al.* (2007) com algumas adaptações. As amostras encontravam-se estocadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  em solução contendo 800  $\mu\text{L}$  de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e 200  $\mu\text{L}$  de glicerol. Cada amostra foi repicada para tubos com 3mL de BHI, incubadas por 24 horas  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  e em condições aeróbias sem agitação. Após turbidez do meio líquido, o inóculo foi semeado em placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) por 24 horas  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Buscaram-se colônias isoladas com morfologia idêntica para suspensão em tubos com 5mL de Solução Salina 0,85%, ajustado para obter uma turbidez compatível ao padrão 0,5 da escala de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  CFU / ml).

Posteriormente, foi testada a produção de biofilme em placas de microtitulação de poliestireno estéreis com fundo chato de 96 poços. Para tanto, pipetou-se 180  $\mu\text{L}$  de Caldo Triptona de Soja sem Dextrose (TSB) e foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de cada inóculo previamente preparado. Seguiu-se com a incubação das placas sob condições de aerobiose nas temperaturas de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) e a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  (temperatura normal do corpo humano) por 24 horas. Em cada placa, as amostras foram testadas em triplicata, utilizando-se uma amostra de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) como controle positivo, uma amostra APEC como controle negativo não formador e como controle

branco utilizou-se caldo TSB sem inóculo. Cada ensaio foi repetido três vezes, totalizando nove poços avaliados por isolado.

Após decorrido o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado. Cada poço foi lavado três vezes com 250  $\mu$ L de Solução Salina 0,85%, para remoção das células não aderidas, seguido de secagem. O próximo passo consistiu na fixação do biofilme através da adição de 200  $\mu$ L de metanol em cada poço por 20 minutos. Após o tempo de contato, o metanol foi descartado e realizada a secagem da placa. Em seguida, os poços foram corados com 200  $\mu$ L de Cristal Violeta de Hucker 2% por 15 minutos. Posteriormente as placas foram lavadas com água destilada para retirada do excesso de corante e realizada novamente a secagem. Por fim, adicionaram-se 200  $\mu$ L de Ácido Acético Glacial 33% por uma hora. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 550 nm.

### **3.2 Interpretação dos resultados**

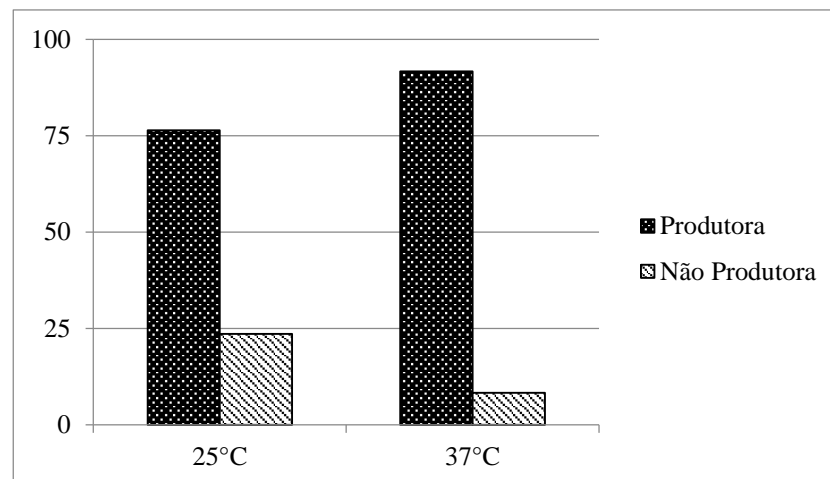
A densidade ótica ( $OD_a$ ) de cada amostra foi obtida pela média das absorbâncias dos nove poços de amostra inoculada. Com esse valor comparou-se a média das absorbâncias do controle branco somada a três vezes o desvio padrão do controle branco ( $OD_{cn}$ ). A determinação da produção de biofilme deu-se pela seguinte classificação: não produtora de biofilme ( $OD_a \leq OD_{cn}$ ), fraca produtora de biofilme ( $OD_{cn} < OD_a \leq 2 \times OD_{cn}$ ), moderada produtora de biofilme ( $2 \times OD_{cn} < OD_a \leq 4 \times OD_{cn}$ ) e forte produtora de biofilme ( $4 \times OD_{cn} < OD_a$ ).

### **3.3 Análise Estatística**

A estatística descritiva foi empregada para a determinação da frequência absoluta e relativa das amostras, classificadas conforme a capacidade de produção de biofilme nas temperaturas de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Os testes não paramétricos do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o Teste Exato de Fisher foram utilizados para análise da distribuição das amostras conforme as temperaturas analisadas, e para determinar se existe associação da produção de biofilme, conforme a classificação dos grupos filogenéticos. O programa Statistics Base® (PASW) foi utilizado para as análises estatísticas, adotando-se como referencial o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4 RESULTADOS

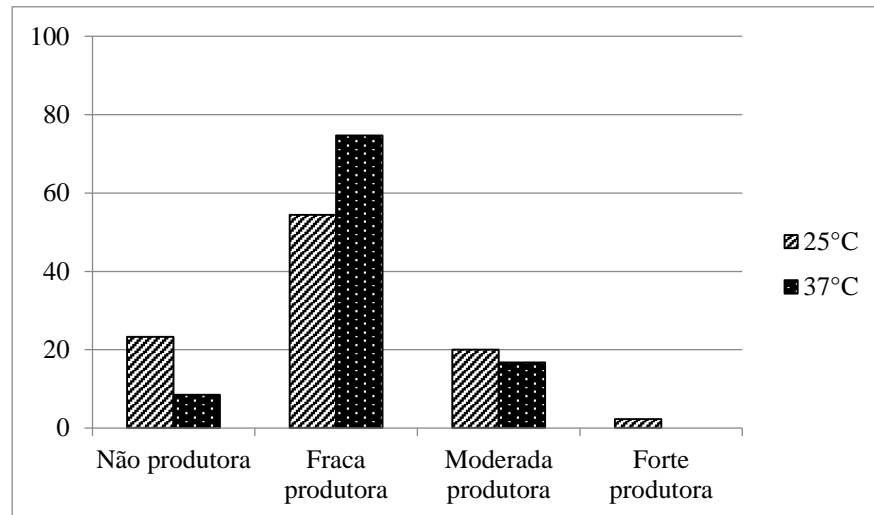
De acordo com os resultados apresentados no gráfico 1, as cepas UPEC foram capazes de formar biofilme em ambas as temperaturas avaliadas. Observou-se que a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 76,4% das amostras (165/215) formou biofilme, e 23,6% (54/215) foram classificadas como não sendo produtoras. Na temperatura de  $37\pm 1^\circ\text{C}$  foi constatado que 91,7% (197/215) das amostras produziram biofilme, e apenas 8,3% (18/215) foram classificadas como não aderentes. Entre as 215 amostras testadas, 160 (74%) formaram biofilme em ambas temperaturas. Ao analisarmos estatisticamente estes resultados, pode-se afirmar que a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  houve maior produção de biofilme em relação à temperatura ambiente de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ).



“Gráfico 1”: Frequência relativa (%) das cepas de UPEC classificadas como produtoras ou não produtoras de biofilme nas temperaturas de  $25^\circ\text{C}\pm 1$  e  $37^\circ\text{C}\pm 1$ .

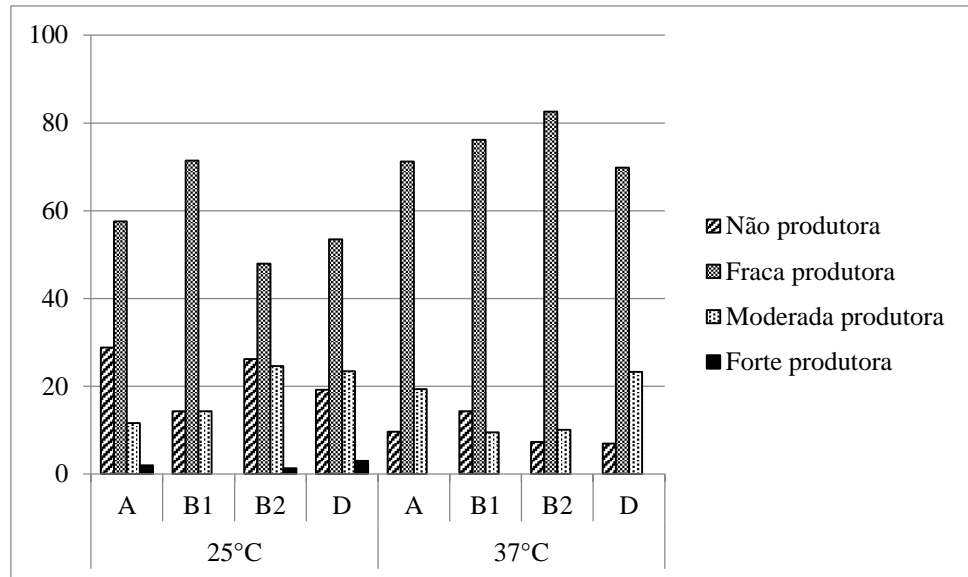
Avaliando os isolados conforme a intensidade de produção de biofilme (Gráfico 2), observou-se que 23,3% (50/215), 54,4% (117/215), 20% (43/215) e 2,3% (5/215) foram classificados como sendo não produtores, fracamente produtores, moderadamente produtores e fortemente produtores, respectivamente a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Na temperatura de  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 8,5% (18/215) das amostras foram classificadas como não formadoras de biofilme, 74,7% (160/215) apresentaram fraca adesão e 16,8% (36/215) foram moderadas. Estatisticamente, o número de cepas classificadas como fracamente produtoras a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  foi significativamente maior do que a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) e o número de amostras avaliadas como moderadamente aderentes foi maior a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas amostras com o mais forte grau de produção de biofilme a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ,

apenas a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Com relação aos isolados não produtores de biofilme, observou-se uma maior frequência a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  do que a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ).



**“Gráfico 2”:** Frequência relativa (%) das cepas de UPEC classificadas como não produtoras, fracamente produtoras, moderadamente produtoras e fortemente produtoras de biofilme nas temperaturas de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e  $37\pm 1^\circ\text{C}$ .

O gráfico 2 demonstra as diferentes categorias de produção de biofilme dentro dos grupos filogenéticos. Pode-se observar que, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , 57,6% (30/52), 71,4% (15/21), 47,9% (33/69) e 53,5% (39/73) das amostras foram fracamente aderentes nos grupos A, B1, B2 e D, respectivamente. Observou-se também que, nesta mesma temperatura, 57,6% (15/52) das amostras do grupo A, 14,3% (3/21) do grupo B1, 26,2% (18/69) do grupo B2 e 19,2% (14/73) do grupo D foram não aderentes. Ainda, 11,6% (6/52) das amostras do grupo A, 14,3% (3/21) do grupo B1, 24,6% (17/69) do grupo B2 e 23,4% (17/73) do grupo D foram moderadamente formadoras a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . 2% dos isolados fortemente aderentes a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  estiveram presentes no grupo A (1/52), 1,3% em B2 (1/69) e 3% no grupo D (3/73) e foram ausentes no grupo B1. Os resultados obtidos a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  demonstraram que 71,2% (37/52), 76,2% (15/21), 82,6% (57/69) e 69,8% (51/73) dos isolados foram fracamente aderentes nos grupos A, B1, B2 e D, respectivamente. Ainda, a  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , 19,3% (10/52) das amostras foram classificadas como moderadamente formadoras no grupo filogenético A, 9,5% (2/21) no grupo B1, 10,1% (7/69) no grupo B2 e 23,3% (17/73) no grupo D. As cepas não produtoras de biofilme foram 9,6% (5/52) do total no grupo A, 14,3% (3/21) no B1, 7,3% (5/69) no B2 e 6,9% (5/73) no D.



**“Gráfico 3”:** Frequência relativa (%) da classificação dos grupos filogenéticos de UPEC conforme a sua produção (fraca, moderada e forte) ou não produção de biofilme para as temperaturas de  $25\pm 1^\circ\text{C}$  e  $37\pm 1^\circ\text{C}$ .

Ao avaliar-se a associação entre os grupos filogenéticos e a produção ou não de biofilme, constatou-se que não há relação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis ( $p > 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

A metodologia proposta por Stepanovic *et al.* (2007) mostrou-se adequada para avaliação da capacidade de formar biofilmes em amostras UPEC. O método da placa de microtitulação amplamente utilizado por outros pesquisadores (STURGILL *et al.* 2004; SKYBERG *et al.* 2006 e RIJAVEC *et al.* 2008). Apesar de satisfatório, Pompermayer e Gaylarde (2000) relatam que uma limitação deste método é o fato de que culturas monoespécie podem não se comportar como a população mista encontrada no ambiente natural.

Baseado nos resultados encontrados, verificou-se que a 37°C houve uma maior produção de biofilme quando comparado à temperatura ambiente. A habilidade de formar biofilme a 37°C também foi observada por Fattahi *et al.* (2015), os quais utilizando metodologia semelhante à descrita neste estudo, relataram que 92% dos isolados de UPEC testados produziram biofilme. Da mesma forma, Rijavec *et al.* (2008) obtiveram 56% de positividade para formação de biofilme nesta mesma temperatura. A característica de adesão a 37°C também foi elucidada em outro subgrupo de ExPEC por Skyberg *et al.* (2006), os quais constataram que aproximadamente 55% das cepas APEC analisadas foram classificadas como moderadamente ou fortemente formadoras. Grande parte dos trabalhos da literatura avalia a produção de biofilme de UPEC apenas a 37°C, justificando ser esta a temperatura normal do corpo humano (GUYTON; HALL, 2011). Contudo, na temperatura de 25°C, a qual foi abordada no presente estudo, observou-se uma expressiva formação de biofilme (76,4%). Segundo Martí *et al.* (2011), o estudo de biofilme a 25°C mostra-se importante em se tratando da persistência da bactéria no ambiente, principalmente no meio hospitalar abiótico, facilitando a disseminação do patógeno.

Estatisticamente, não se observou associação entre os grupos filogenéticos de patogenicidade e a formação de biofilme das amostras UPEC, independente da temperatura. Este resultado foi semelhante ao obtido por outros trabalhos que vem sendo desenvolvidos no CDPA/UFRGS, em estudo comparativo de patogenicidade de APEC estabelecida por inoculação em pintinhos com a habilidade de formação de biofilme a 25°C, não obteve relação entre estas duas variáveis. Da mesma forma, também não obtiveram associação entre a formação de biofilme e patogenicidade para cepas de *Salmonella* sp. e *Pasteurella multocida* isoladas de suínos e aves, respectivamente. No



que diz respeito à UPEC e APEC, a ausência de associação entre as duas variáveis acima observada neste estudo e no de RODRIGUES (2017 – dados não publicados), pode ser consequência da similaridade genética entre os dois subgrupos de ExPEC (RODRIGUEZ - SIEK *et al.* 2005; JOHNSON *et al.* 2008; BELANGER *et al.* 2011; DANZEISEN *et al.* 2013). Esta característica pode resultar em um comportamento fenotípico semelhante, ou seja, amostras mais patogênicas não são necessariamente produtoras de biofilme, bem como a característica apatogênica de um isolado não indica incapacidade para formar biofilme. Estes dois eventos podem ocorrer de forma independente, sendo resultado de outros fatores relacionados ao microrganismo e ambiente, os quais não foram elucidados no presente trabalho. Rijavec *et al.* (2008), ao avaliar cepas UPEC para a produção de biofilme e relacionar a determinantes de virulência, também constataram que não houve associação estatística, inclusive para isolados do grupo B2, o qual é considerado altamente virulento. Entretanto, este mesmo autor relatou que para os grupos B1 e D houve associação. Este resultado pode ter relação com a variação individual entre cepas, além disso a metodologia empregada difere da utilizada neste trabalho.

Neste contexto, o estudo do biofilme, apesar não estar ligado ao grau de patogenicidade UPEC nas amostras testadas, pode ser ainda utilizado como uma importante ferramenta no âmbito hospitalar, tanto do ponto de vista do paciente quanto do ambiente. A literatura vem relatando que amostras UPEC com a capacidade de formação de biofilme são mais resistentes a antibióticos, dificultando o tratamento de afecções do trato urinário e facilitando recidivas (HANNA *et al.*, 2003; COSTERTON 1999; DONLAN e COSTERTON 2002; DUNNE, 2002). Da mesma forma, a presença de biofilmes em superfícies abióticas favorece a permanência do agente no meio, já que torna a bactéria menos susceptível a ação de desinfetantes (BRIDIER *et al.* 2001; SANCHEZ – VIZUETI *et al.*, 2015). Considerando que num ambiente hospitalar a carga microbiana é extremamente alta, há uma maior facilitação para a formação de biofilmes mistos, tanto no paciente quanto no ambiente (FERREIRA *et al.*, 2013). Um dos grandes problemas de biofilmes multiespécie é o favorecimento de trocas de material genético, principalmente via plasmídial, incluindo genes de virulência, com os de resistência antimicrobiana (MADSEN *et al.*, 2012).

A equipe do CDPA vem trabalhando em linhas de pesquisa de relevância tanto em medicina veterinária com enfoque na patologia aviária, quanto em medicina humana, com estudos em UPEC. As pesquisas desenvolvidas vem demonstrando variações na patogenicidade de algumas bactérias através do desenvolvimento de método próprio para

isso. Além da *E. coli*, *Samonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* e *Pasteurella multocida* revelaram, índices de patogenicidades (IP) que variam de 0 a 10 com a metodologia em questão (SOUZA *et al.*, 2016; PILATTI *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2016). Desta forma, o conhecimento das flutuações nos IPs é de fundamental importância para relacionar com fenômenos ocorridos em um lapso de tempo. Sem esta possibilidade, fica impossível associar aumento ou diminuição da patogenicidade com práticas ocorridas anteriormente, por exemplo, com o uso de vacinas geneticamente modificadas na avicultura. Nestes produtos, embora um ou dois genes sejam alterados, todos os demais permanecem originais constituindo-se em abundante material genético despejado artificialmente em um ambiente limitado à disposição de mutação naturais incontroláveis. Seguindo com o exemplo apresentado, nos dias de hoje, sem um indicador de variação nos IPs, é impossível suspeitar que o surgimento de uma bactéria, no caso *E. coli*, repentinamente apresente patogenicidade fora do esperado, e que está relacionado à vacina geneticamente modificada usada anteriormente. Em relação ao exposto, pode-se afirmar que a característica de formação de biofilmes nas amostras de *E. coli* UPEC não poderá ser usada como indicadora de modificações na patogenicidade associada aos grupos filogenéticos, pois não houve qualquer relação entre estas duas variáveis.

## 6 CONCLUSÃO

Conforme o presente trabalho concluímos que não há relação entre a capacidade de formação de biofilmes pelas amostras de *Escherichia coli* (UPEC) estudadas e os grupos filogenéticos aos quais elas pertencem.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J. **Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios.** In: Workshop Sobre Desenvolvimento No Setor De Leite, Viçosa: UFV, p. 14, 2005.
- ANDRADE, N. J. **Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios.** In: Workshop Sobre Desenvolvimento No Setor De Leite, Viçosa: UFV, p. 14, 2004.
- ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças.** São Paulo: Editora Roca, p. 314, 2006.
- APARNA, M.S.D.; YADAV, S. **Biofilms: Microbes and Disease.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.12, n.6: p. 526-530, 2008.
- BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J.P. **Colibacilosis.** In: SAIF, Y. (Ed.). Diseases of poultry. 12th. Ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, p. 691-737, 2008.
- BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. **Colibacilosis,** in: Saif Y.M.(Ed.), Diseases in poultry. Iowa State University Press, Ames, pp. 631-652, 2003.
- BELANGER, L.; GARENAUX, A.; HAREL, J.; BOULIANNE, M.; NADEAU, E.; DOZOIS, C. M. ***Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. v. 62, p. 1–10, 2011.
- BJARNSHOLT, T. **The role of bacterial biofilms in chronic infections.** APMIS, v. 121, suppl.136, p.1-54, 2013.
- BOARI, Cleube Andrade. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo...** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. f. 80, 2008.
- BONACORSI, S.; BINGEN, E. **Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis.** Int. J. Med.Microbiol. v. 295, p. 373–381, 2005.
- BRIDIER, A.; DUBOIS-BRISSONNET, F.; BOUBETRA, A.; THOMAS, V.; BRIANDET, R. **The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using high through put CLSM method.** J. Microbiol Methods, v. 82, p.64-70, 2010.
- CAIXETA, Danila Soares. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. f. 75, 2008.
- CAPELLETTI, Raquel Vannucci. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. f 81, 2006.

CHEN, S.L.; et.al. **Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding.** Proc. Natl. Acad. Sci.USA, v.103, p. 12884-12884, 2009.

CHMIELEWSKI RAN; FRANK, J.F. **Biofilm formation and control on food processing facilities,** Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety ed. 2, p. 22-32, 2003.

CHUNG, A.; ARIANAYAGAM, M.; RACHID, P. **Bacterial cystitis in women.** Australian Family Physician; v. 39, p. 295-298, 2010.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. **Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group.** Applied and Environmental Microbiology, p. 4555–4558, Oct. 2000.

COOK, R.J.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; *et al.* **Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease.** Proc Natl Acad Sci USA, v. 92, p. 4197–201, 1995.

COSTERTON, J. W.; P. S. STEWART AND E. P. GREENBERG. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science v. 284, n. 1318–1322, 1999.

COSTERTON, J.W. **Introduction to biofilm.** Int J Antimicrob Agents, 1999.

DANZEISEN, J. L.; WANNEMUEHLER. Y.; NOLAN, L. K.; JOHNSON, T. J. **Comparison of multilocus sequence analysis and virulence genotyping of *Escherichia coli* from live birds, retail poultry meat, and human extraintestinal infection.** Avian Dis. v. 57, p. 104–108, 2013.

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

DOBRINDT U. (Patho-) **Genomics of *Escherichia coli*.** Int J Med Microbiol.Oct, v. 295, n. 6-7, p. 357–371, 2005.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms,** Clin. Microbiol., Rev.; v. 15(2), p.167–193, 2002.

DUNNE JR., W.M. **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** Clinical Microbiology Reviews, v. 15, p. 155-166, 2002.

EJRNAES, K. **Bacterial Characteristics of Importance for Recurrent Urinary Tract Infections Caused by *Escherichia coli*.** Dan Med Bull, v. 58, p. B4187, 2011.

EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTAO, E. M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BOHNKE, U.; STEINRUCK, H.; PHILIPP, H. C.; WIELER, L. H. **Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis- causing *Escherichia coli*: how closely related are they?** Int. J. Med. Microbiol. v. 297, p.163–176, 2007.

EWING, W.H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.** New York: Elsevier, 1986.

FATTAHI, S.; KAFIL, H. S.; NAHAI, M. R.; ASGHARZADEH, M.; NORI, R.; AGHAZADEH, M. **Relationship of biofilm formation and different virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Northwest Iran.** GMS Hygiene and Infection Control, v. 10, ISSN 2196-5226, 2015.

FERREIRA, A.J.P.; KNOBL, T. **Colibacilose aviária.** In: BERCHIERI, J.R. A; SILVA, E.N., DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, M.A. Doenças das Aves, 2a. Ed.Campinas: FACTA. p. 1102, 2009.

FERREIRA, E.; GIMENEZ, R.; AGUILERA, L.; GUZMAN, K.; AGUILAR, J.; BADIA, J.; BALDOMA, L. **Protein interaction studies point to new functions for *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** Research in Microbiology, v. 164, p. 145e154, 2013.

FORSYTHE, Stephen J.; **Microbiologia da segurança alimentar**, 1ed. Porto Alegre: Artmed, p. 151-153, 2002.

FOXMAN, B. **Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs.** American Journal of Medicine, v.113, p.5S-13S, 2002.

FOXMAN B. **Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden.** Infect. Dis. Clin. North Am, v. 28, n. 1-13, p. 10, 2014.

FRENCH, L.; **Urinary tract infection in woman.** Women's Health. v.6, p. 24-29, 2006.

FUX, C.A., COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., STOODLEY, P., **Survival strategies of infectious biofilms.** Trends in Microbiology, v.13, p. 34-40, 2005.

GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and Human origin: link between phylogenetic relationship and common virulence patterns.** J. Clin. Microbiol. v. 45, n. 10, p. 3366-3376, 2007.

GUYTON & HALL; **Tratado de Fisiologia Medica**, Rio de Janeiro, 12 ed., Elsevier, p.1551, 2011.

HANNA, A.; BERG, M.; STOUT, V.; RAZATOS, A. **Role of capsular colanic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli*.** *Appl Environ Microbiol*, v. 69, p. 4474-4481, 2003.

HAUN, Marcela Andréa Duran. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens*.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, f.71, 2002.

HEILBERG, I.P.; SCHOR, N. **Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário- itu.** SP. Revista da associação médica brasileira, v. 52, p.141 -64, 1995.

HOIBY, N. *et al.* **The clinical impact of bacterial biofilms.** International Journal of Oral Sciences, v. 3, p. 55-65, 2011.

HUNG, C.; ZHOU, Y.; PINKNER, J.S.; DODSON, K.W.; CROWLEY, J.R.; *et al.* **Escherichia coli Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure.** MBio 4, 2013.

JAKOBSEN, L.; SPANGHOLM, D.J.; PEDERSEN, K.; JENSEN, L.B.; EMBORG, H.D.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; HAMMERUM, A.M.; FRIMODT-MOLLER, N. **Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and ITU patients.** Int: J Food Microbiol; v.142, p. 264–272, 2010.

JEFFERSON, K.K. **What drives bacteria to produce a biofilm?** FEMS Microbiol Lett; v. 236, p. 163–73, 2004.

JOHNSON, J.R.; MANGES, A.R.; O'BRYAN, T.T.; RILEY, L.W. **A disseminated multidrug resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis.** The Lancet, v. 359, p. 2249-2251, 2002.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E. coli*”**, J. Lab. Clin. Med., 139(3), p. 155-62, 2002.

JOHNSON, T.J.; KARIYAWASAM, S.; WANNEMUEHLER, Y.; MANGIAMELE, P.; JOHNSON, S.J.; DOETKOTT, C.; SKYBERG, J.A.; LYNNE, A.M.; JOHNSON, J.R.; NOLAN, L.K. **The Genome Sequence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Strain OI:KI :H7 Shares Strong Similarities with Human Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Genomes.** J. Bacteriol. p. 3228-3236, 2007.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y., JOHNSON, S. J.; STELL, A. L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J. R.; KIM, K. S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L. K. **Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens.** Appl. Environ. Microbiol., v. 74, p. 7043–7050. 2008.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, S.J.; STELL, A.L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J.R.; KIM, K.S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L.K. **Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens.** Appl Environ Microbiol, v.74, p. 7043–7050. 2008b.

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

KAU, A. L.; HUNSTAD, D. A.; HULTGREN, S. J. **Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium.** Current Opinium in Microbiology. n. 8, p. 54-59, 2005.

KLUYTMANS, J. A.; OVERDEVEST, I. T.; WILLEMSSEN, I.; KLUYTMANS-VAN DEN BERGH, M. F.; VAN DER ZWALUW, K.; HECK, M. *et al.* **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors.** Clin. Infect. Dis. n. 56, p. 478–487, 2013.

LIMA, D.A.; FURIAN, T.Q.; PILLATI, R.M.; SILVA, G.L.; MORGAM, R.B.; BORGES, K.A.; FORTES, F.B.B.; MORAES, H.L.S.; BRITO, B.G.; BRITO, K.C.T.;

SALLE, C.T.P. **Establishment of a pathogenicity index in *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains inoculated in one-day-old broiler chicks;** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.68, n.2, p.257-264, 2016.

LUCCHESI, Eliane Gama. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. f. 77, 2006.

MADSEN, J.S. *et al.* **The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, v. 65, p. 183-195, 2012.

MALUTA, R. P.; LOGUE, C. M.; CASAS, M. R.; MENG, T.; GUASTALLI, E. A.; ROJAS T. C.; *et al.* **Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil.** PLoS ONE 9:e105016. 10.1371/journal.pone.0105016, 2014.

MARTI, R.; MIESZKIN, S.; SOLECKI, O.; POURCHER, A. M.; HERVIO-HEATH, D.; GOURMELON, M. **Effect of oxygen and temperature on the dynamic of the dominant bacterial populations of pig manure and on the persistence of pig-associated genetic markers, assessed in river water microcosms.** Journal of Applied Microbiology, n. 111, p.1159–1175, 2011.

MIDOLLI, M. A. V. **Islas de patogenicidad;** O Mundo da Saúde, São Paulo, v.33, n. 4, p. 406-414, 2009.

MILLÁNA, Y.; HERNÁNDEZA, E.B.C.; MILLÁNA, B. Y ARAQUEA, M. **Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela,** Rev. Argent Microbiol., v. 46, n. 3, p. 175-181, 2014.

MITTAL, S.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. **Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*.** W. S. Pathogens and Global Health. v. 109, n. 1, 2015.

MORA, A.; VISO, S.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M.P.; GARCÍA-GARROTE, F.; DABHI, G.; MAMANI, R.; HERRERA, A.; MARZOA, J.; BLANCO, J.E.; MOULIN-SCHOULEUR, M.; SCHOULEUR, C.; BLANCO, J. **Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1:H7-B2-ST95 in humans.** Veterinary Microbiology, v.167, n.3-4, p. 506-512, 2013.

MOREIRA, P. **Infecções Urinárias de Repetição do Adulto.** Acta Urol., 23(2), p. 85–92, 2006.

MOULIN-SCHOULER, M.; REPERANT, M.; LAURENT, S.; BREE, A.; MIGNON-MOURA, R.A. **Técnicas de laboratório,** 3 ed., São Paulo: Atheneu, 1997.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. **Patogenic *Escherichia coli*.** Nature Reviews Microbiology. v. 2, p. 123-140, 2004.

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



NIMMICH, W.; VOIGT, W.; SELTMANN, G. **Characterization of urinary *Escherichia coli* O75 strains.** Journal of Clinical Microbiology, v. 35, p. 1112-1117, 1997.

NORDSTROM, L.; LIU, C.M.; PRICE, L.B. **Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness.** Frontiers in Microbiology, v.4, n.29, p.1-6, 2013.

OLIVEIRA, A. F.; CARDOSO, S. A.; ALMEIDA, F. B. R.; OLIVEIRA, L. L.; PITONDO-SILVA, A., SOARES, S. G.; HANNA, E. S. **Oral immunization with attenuated *Salmonella* vaccine expressing *Escherichia coli* O157:H7 intimin gamma triggers both systemic and mucosal humoral immunity in mice.** Microbiol Immunol. v. 56, p. 513–522, 2012.

OLIVEIRA, P.; GONÇALVES, A. **Tratamento e Profilaxia da Cistite Recorrente na Mulher Não Grávida.** Acta Urol., v.30, n. 2, p. 30–8, 2013.

OPLUSTIL, P.C.; ZOCCOLI, M.C.; TABOUTI, R.N.; SINTO, I.S. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica.** ed. Sarvier, 1999.

PEREIRA, Olívia Baptista de Oliveira. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, f. 221, 2001.

PILATTI, R.M.I.; FURIAN, T.Q.I.; LIMA, D.A.I.; FINKLER, F.; BRITO, B.G.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. **Establishment of a Pathogenicity Index for One-dayold Broilers to *Pasteurella multocida* Strains Isolated from Clinical Cases in Poultry and Swine.** Brazilian Journal of Poultry Science; ISSN 1516-635X / v.18 / n.2 / 255-260, 2016.

PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L. **Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope.** Braz. J. Microbiol., v.32, p.340-344, 2001.

POMPERMAYER, D. M. C.; GAYLARDE, C. C. **The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene.** Food Microbiology, v. 17, n. 4, p. 361-365, 2000.

RESENDE, J. G. O. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas* spp. e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, f. 85, 2005.

RIJAVEC, M.; MÜLLER-PREMRU, M.; ZAKOTNIK, B.; ZGUR-BERTOK, D. **Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin.** J. Med. Microbiol. v. 57, p. 1329–1334, 2008.

RIJAVEC, M.; MÜLLER-PREMRU, M.; ZAKOTNIK, B.; ŽGUR-BERTOK, D. **Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing**

**bacteraemia of urinary tract origin**, Journal of Medical Microbiology, n.57, p. 1329, 2008b.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; NOLAN, L. K. **Characterizing the APEC pathotype**. Vet. Res., v. 36, p. 241–256, 2005.

RON, E.Z. **Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens**. Curr. Opin. Microbiol. v. 9, p. 28–32, 2006.

ROTHMAN, K. J.; GREENLAND, S.; LASH, T. L. Modern Epidemiology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

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.

RUSSO, T. A.; MCFADDEN, C. D.; CARLINO-MACDONALD, U. B.; BEANAN, J. M.; BARNARD, T. J.; JOHNSON, J. R. **IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli***. Infection and Immunity, v. 70(12), p. 7156-7160, 2002.

SANCHEZ-VIZUETE, P.; ORGAZ, B.; AYMERICH, S.; LE COQ, D.; BRIANDET, R. **Proteção de agentes patogênicos contra a ação de desinfetantes em biofilmes multiespecíficos**. Microbiol frontal, v. 6, p. 705, 2015.

SANTOS, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; SILVA, M. R.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C. **A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra intestinal (ExPEC) com relação a idade e sexo do hospedeiro**. O mundo da saúde. v.33, p. 392-400, 2009.

SANTOS, S.R.; AMADO, C.A.B.; ASSEF, S.M.C. **Infecções urinárias**. Arq Ciênc Saúde Unipar, v. 3, n. 1, p. 43-50, 1999.

SCHAEFFER, A. J. **What do we about the urinary tract infection- prone individual?** Journal of Infection Diseases. v. 183, p. S66-9, 2001.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. **“A review of current and emergent biofilm control strategies”** LWT - Food Science and Technology, v. 43, p. 573-583, 2010.

SKYBERG, J.A.; JOHNSON, T.J.; JOHNSON, J.R.; CLABOTS, C.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. **Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney**. Infect Immun, v. 74, p. 6287–6292, 2006.

SMITH, Y. C.; RASMUSSEN, S. B.; GRANDE, K. K.; CONRAN, R. M.; O’BRIEN, A. D. **Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation in mice**. Infection and Immunity, v. 74(7), p. 2978-2990, 2008.

SOUZA, G. F.; ROCHA, S. L. S.; FURIAN, T. Q.; BORGES, K. A.; SALLE, F. O.; MORAES, L. B.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P. **Classification of Avian**

**Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model**; Acta Scientiae Veterinariae, 44: Pub. 1347, ISSN 1679-9216, 2016.

SPADDEN GARDENER, B.B.; WELLER, D.M. **Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat**. Appl Environ Microbiol, v. 67, p. 4414–25, 2001.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. **“Biofilm formation in food industries: A food safety concern”**, Food Control 31, p. 572-585, 2013.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRCOVIC, I.; RUZICKA, F. **Quantification of biofilm in microtitre plates, overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci**. APMIS., v. 115, n. 8, p. 899, 2007.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; CONSTERTON, J. W. **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu. Rev. Microbiol., v.56, p. 187-209, 2009.  
STURGILL, G.; TOUTAIN, C.M.; KOMPERDA, J.; O'TOOLE, G.A. **Papel da CysE na produção de uma molécula de sinalização extracelular em *Providencia stuartii* e *Escherichia coli*: a perda de CysE aumenta a formação de biofilme em *Escherichia coli***. v. 186, n. 22, p. 7610-7, Nov, 2004.

SUBRAMANIAN, P.; SHANMUGAM, N.; SIVARAMAN, U.; KUMAR, S.; SELVARAJ, A. **Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India**. Australas Med J., v.5, n.7, p. 344-348, 2012.

TAN, S.Y.E.; CHEW, S.C.; TAN, S.Y.Y.; GIVSKOV, M.; YANG, L. **“Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilmes”** Current Opinion in Biotechnology, v. 26, p.1-6, 2014.

TODAR, K.; **Pathogenic *E. coli***. Science Magazine- June- v. 304, p. 1421, 2008.

WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; VAUGAN, E. D.; WEIN, A. J. **Campbell’s Urology**, 8 ed., v. 1, p. 513-590, 2002.

WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M.; GARDENER, B.B.; THOMASHOW, L.S. **Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens**, Annu Rev Phytopathol, v. 40, p. 309–48, 2002;

WINKELSTRÖTER, L.K.; TEIXEIRA, F.B.; SILVA, E.P.; ALVES, V.F.; DE MARTINIS, E.C. **“Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology”**, Microbial Ecology, v. 68, p. 35–46, 2014.

WULLT, B.; BERGSTEN, G.; FISHER, H. **Application of Laboratory Research in UTI**, EAU Update Series, v. 2, p. 116-124, 2004.