

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MARIANA TEIXEIRA GONÇALVES

**IMPACTO DO BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA NA SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS**

VITÓRIA

2017

MARIANA TEIXEIRA GONÇALVES

**IMPACTO DO BIOFILME DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA NA SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Doenças Infecciosas
da Universidade Federal do Espírito
Santo, como requisito para obtenção do
Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Liliana Cruz
Spano

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Kênia Valéria
dos Santos

VITÓRIA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

A mestranda Mariana Teixeira Gonçalves apresentou a dissertação intitulada **"IMPACTO DO BIOFILME DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA NA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS"** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu (✓) **aprovar** () **reprovar** a dissertação habilitando a farmacêutica MARIANA TEIXEIRA GONÇALVES a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 27 de setembro de 2017.

Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)

Prof. Dr. Andre Luis Souza dos Santos
(Membro Externo)

Prof.ª Dr.ª Liliana Cruz Spano
(Orientadora)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)
Bibliotecário: Francisco Felipe Coelho – CRB-12 ES-000700/O

G635i Gonçalves, Mariana Teixeira, 1989 -
Impacto do biofilme de *Escherichia coli* enteroagregativa na
suscpetibilidade a antimicrobianos / Mariana Teixeira Gonçalves – 2017.
97 f. : il.

Orientador: Liliana Cruz Spano.
Coorientador: Kênia Valéria dos Santos.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. *Escherichia coli* enteroagregativa. 2. Biofilmes. 3. Susceptibilidade
antimicrobiana. 4. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 5. Concentração
mínima inibitória. 6. Ciprofloxacina. I. Spano, Liliana Cruz. II. Santos, Kênia
Valéria doss. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

*Ao meu pai Alvaro, o meu grande ídolo, sem
os seus ensinamentos nada disso seria
possível. A minha mãe, Christina, por
toda dedicação e apoio.*

*Ao meu noivo, Alcides Vieira, que de forma
especial e carinhosa, me deu apoio e
coragem para prosseguir, sendo o meu
porto seguro em todos os momentos.*

*A todos os meus familiares e amigos pelas
orações e torcida.*

Agradecimentos

A Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada e pela oportunidade de realizar e alcançar meus objetivos.

A minha orientadora, Dr^a Lílilana Cruz Spano, pela dedicação na orientação e incentivo desde a iniciação científica, que tornaram possível a conclusão deste mestrado.

A minha coorientadora, Dr^a Kênia Valéria dos Santos pela paciência nas orientações dos experimentos, principalmente nas explicações a cerca dos dados estatísticos.

Ao Dr. Moisés Palaci, por aceitar participar da banca examinadora.

Ao Dr. André Luis Souza dos Santos, por aceitar participar da banca examinadora.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas que foram tão importantes na minha vida de pós-graduanda e no desenvolvimento deste estudo.

Ao departamento de Patologia, aos servidores da UFES e aos laboratórios vizinhos do LABVIG.

As colegas de Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa, que mesmo não fazendo parte do mundo da EAEC, sempre tinham palavras amigas e encorajadoras.

A amiga Caroline, parceira de EAEC, pelo apoio e ajuda com essa bactéria mais linda.

Em especial a amiga, Débora Goldner Rossi, pelo bate-papo sempre interessante em meio as suas larvinhas e belos ratinhos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

“Queira!
Basta ser sincero e desejar profundo,
Você será capaz de sacudir o mundo, vai
Tente outra vez!”

(Raul Seixas)

RESUMO

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) é um patógeno emergente causador de diarreia aguda e persistente em todo o mundo. A formação de biofilme, um aspecto notável da sua patogenicidade, está relacionada à persistência da infecção e requer tratamento antimicrobiano, sendo sugerido o uso de ampicilina, quinolona, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclina. Como as técnicas habituais de determinação de suscetibilidade não refletem a atividade em biofilme tivemos como objetivo determinar a concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) de nove antimicrobianos de oito classes, e determinar a concentração mínima de erradicação do biofilme (MBEC), por meio do sistema Calgary (*peg-lid*), para amostras clínicas de EAEC, para as cepas protótipos EAEC 042 e EAEC 17-2 e para cepa de referência ATCC 25922. Concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada para 35 amostras por diluição em ágar e foram selecionadas 20 sensíveis aos antimicrobianos ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina e tobramicina e 19 a sulfametoxazol/trimetoprim para determinação da MBIC. Biofilme foi formado em Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco com glicose 0,4% e foram determinados o tempo de maturação do biofilme e a intensidade de formação, tanto no poço da microplaca quanto no *peg-lid*. A maturação do biofilme foi atingida com 24 h; oito e 12 amostras foram classificadas como fortes e fracas formadoras de biofilme, respectivamente. Biofilme de 24 h foi submetido a diluições dobradas dos antimicrobianos em caldo Mueller-Hinton ajustado com cátion e densidade óptica a 650 nm (DO₆₅₀) foi medida após a recuperação do biofilme por ultrassom, antes e após a incubação a 37°C por 6 horas. A MBIC revelou que os biofilmes foram: (i) 100% (20/20) resistentes à tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim e 90% (18/20) à ampicilina; (ii) 90% (18/20) com resistência intermediária à ceftriaxona e cefotaxima, (iii) 95% (19/20), sensíveis à ciprofloxacina, 80% (16/20) à cefoxitina e 75% (15/20) à tobramicina. Biofilme aumentou a concentração inibitória dos antimicrobianos em 2 vezes a até 4.266,7 vezes a CMI e amostras fortes formadoras aumentaram a MBIC de ampicilina, ceftriaxona e tobramicina mais do que as fracas formadoras ($p < 0,05$). A MBEC foi sempre superior à MBIC e à última concentração testada, com exceção de cefoxitina e cefotaxima para uma amostra. Tempo de maturação de biofilme de 48h, e 72h não interferiu na MBIC. Em conclusão, a ciprofloxacina apresentou ótima

atividade para biofilme de EAEC, seguida por cefoxitina e tobramicina e que não devem ser preconizados os antimicrobianos que se mostraram ineficazes como ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclinas para tratamento de infecção por EAEC.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteroagregativa. Biofilme. Susceptibilidade antimicrobiana. Concentração Mínima Inibitória de Biofilme.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an emerging pathogen that causes acute and persistent diarrhea worldwide. Biofilm formation, a notable aspect of its pathogenicity, is related to the persistence of infection and requires antimicrobial treatment, and the use of ampicillin, quinolone, sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracycline is suggested. As usual techniques of determination of susceptibility do not reflect biofilm activity we aimed to determine the minimum inhibitory concentration of biofilm (MBIC) of nine antimicrobials of eight classes, and to determine the minimum concentration of biofilm eradication (MBEC) by means of (peg-lid), for EAEC clinical samples, for prototype strains EAEC042 and EAEC17-2 and for reference strain ATCC 25922. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for 35 samples per agar dilution and 20 antimicrobial susceptible samples were selected for ampicillin, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, ciprofloxacin, tetracycline and tobramycin and 19 to sulfamethoxazole/trimethoprim for determination of MBIC. Biofilm was formed in Dulbecco's Modified Eagle Minimum Medium with 0.4% glucose and the biofilm maturation time and formation intensity were determined both in the microplate well and in the peg-lid. The biofilm maturation was achieved with 24 h; eight and 12 samples were classified as strong and weak biofilm forming, respectively. 24 h Biofilm was subjected to folded dilutions of the antimicrobials in Mueller-Hinton broth adjusted with cation and optical density at 650 nm (OD_{650}) was measured after ultrasonic biofilm recovery, before and after incubation at 37 ° C for 6 hours. MBIC revealed that the biofilms were: (i) 100% (20/20) resistant to tetracycline, chloramphenicol and sulfamethoxazole/trimethoprim and 90% (18/20) to ampicillin; (ii) 90% (18/20) with intermediate resistance to ceftriaxone and cefotaxime, (iii) 95% (19/20), ciprofloxacin-sensitive, 80% (16/20) to ceftiofur and 75% (15/20) to tobramycin. Biofilm increased the inhibitory concentration of the antimicrobials by 2 to 4,266.7 times the MIC and the strong forming samples increased the MBIC of ampicillin, ceftriaxone and tobramycin more than the weak formers ($p < 0.05$). The MBEC was always superior to the MBIC and to the last concentration tested, with the exception of ceftiofur and cefotaxime for a sample. Biofilm maturation time of 48h, and 72h did not interfere with MBIC. In conclusion, ciprofloxacin presented excellent activity for EAEC biofilm, followed by ceftiofur and tobramycin, and antimicrobials that were ineffective as ampicillin,

sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracyclines for the treatment of EAEC infection should not be recommended.

Keywords: Enteroaggregative *Escherichia coli*. Biofilm. Antimicrobial susceptibility. Minimum Biofilm Inhibitory Concentration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática da patogênese resumida dos seis patótipos diarreiogênicos de *Escherichia coli* (Adaptado de KAPER et al., 2004).....24
- Figura 2** - Padrão de aderência agregativa em células HEp-2, na forma de “tijolo-empilhado” (NATARO & KAPER, 1998).....25
- Figura 3** - Estágios da patogênese da EAEC. (1) Aderência ao epitélio intestinal facilitada por adesinas. (2) Hipersecreção de muco. (3a) Secreção de toxinas. (3b) Indução de resposta inflamatória (Adaptado de <http://pt.slideshare.net/Wishofnight13/master-thesis-presentation-11402753>).....28
- Figura 4** - Ilustração das fases de formação do biofilme: (1) aderência inicial; (2) aderência irreversível; (3) desenvolvimento inicial do biofilme (4) formação de microcolônias dentro do biofilme (5) dispersão de células do biofilme (Adaptado de MONROE, 2007).....30
- Figura 5** - **A complexa estrutura do biofilme bacteriano.** A. Microcolônias no biofilme bacteriano são caracterizadas por matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta de DNA extracelular, polissacarídeos, proteínas, fibras amilóides e bacteriófago. B. Ao passar do tempo, ocorre dispersão das células do biofilme, muitas células bacterianas morrem e ocorre a variação genotípica e fenotípica das células em biofilme (Adaptado de MCDOUGALD et al., 2012).....30
- Figura 6** - *Quorum-sensing* envolve dois componentes regulatórios: a proteína ativadora transcricional (Proteína R) e as moléculas autoindutoras (AI) produzidas pela autoindutora sintase. Acumulação de AI ocorre de uma maneira célula-dependente da densidade até que um nível limite seja atingido. Neste momento, o AI se liga e ativa a proteína R, que por sua vez induz expressão de genes-alvo. A proteína R consiste de dois domínios: a terminação N da proteína que interage com o AHL e terminação C que está envolvida na ligação do DNA. (Adaptado de KIEVIT, IGLEWSKI, 2000).....31
- Figura 7** - Representação das moléculas dos três principais exopolissacarídeos da matriz de biofilme de *Escherichia coli*.....32

Figura 8 - Representação de três hipóteses de mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes: 1. Em amarelo - baixa penetração – os antimicrobianos não penetram no biofilme, podendo ser inativados ou adsorvidos na superfície do biofilme; 2. Em verde – podem ocorrer alterações fenotípicas no microambiente do biofilme; 3. Em vermelho – nas zonas mais profundas do biofilme, pode ocorrer diminuição do metabolismo do microrganismo. (STEWART & CONSTERTON, 2001).....34

Figura 9 - Sistema para produção de biofilme constituído por *pegs* em tampa de poliestireno modificadas (*peg-lid*) para microplaca de 96 poços, que constitui o “Dispositivo Calgary”.....36

Figura 10: Mapa do Brasil destacando o Estado do Espírito Santo e, em verde escuro e claro, os Municípios de São Mateus e Conceição da Barra respectivamente, de onde foram obtidas as amostras clínicas de crianças de comunidades quilombolas.....40

Figura 11 - Controle do inóculo bacteriano demonstrando crescimento de repique de 10 µL de suspensão ajustada em placas de Agar Nutriente das diluições de $1,5 \times 10^7$ (A) a $1,5 \times 10^2$ (F) UFC/mL, demonstrando em F crescimento de colônias individualizadas.....54

Figura 12 - Controle da homogeneidade na formação do biofilme recuperado dos *pegs*, representado pelo repique em placas de Agar Nutriente de diluição sequencial correspondente a quatro poços contendo (a) EAEC 042 linha D e (b) EAEC 042 linha F.....54

Figura 13 - Microplaca de biofilme recuperado por sonicação, após tratamento com ceftriaxona (0,12 – 3,84 µg/mL) e incubação com TTC 0,05%. Controle de esterilidade: somente CAMHB. Controle de crescimento: bactéria com CAMHB. Diluições de antimicrobiano: bactéria e CAMHB com antimicrobiano. CAMBH: caldo Mueller Hinton-cátion ajustado.....68

Figura 14 - Placa de ágar nutriente com repique de amostra de EAEC 164A tratada com ceftriaxona para detecção de células viáveis após incubação da microplaca com TTC 0,05%.....68

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Protocolo de determinação da concentração mínima inibitória (CMI). À esquerda, esquema para determinação da CMI e à direita, esquema para preparo das placas de MH com antimicrobianos. AN: ágar nutriente; MC: ágar MacConkey; MH: Mueller Hinton; ST: solução de trabalho; MHA: Mueller Hinton Agar.....42

Fluxograma 2 - Estabelecimento e calibração do sistema *peg-lid*, demonstrando em (A) preparo do inóculo, (B) procedimento para controle do inóculo, (C) verificação da homogeneidade de formação de biofilme em todos os poços. AN: Ágar Nutriente; LB: Luria Bertani; DMEM: Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco.....46

Fluxograma 3 - Protocolo de formação de biofilme com a determinação da concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) e a determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC), conforme previamente estabelecido por HARRISON et al., 2010. DO₆₅₀, leitura densidade óptica a 650 nm; T=0, tempo=zero; T=6, tempo= 6 h.....50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores de virulência do patotipo de <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC) e respectivos mecanismos de ação.....	26
Quadro 2 - Estudos que utilizaram o sistema <i>peg-lid</i> e respectivos microrganismos.....	38
Quadro 3 - Classes e respectivos antimicrobianos utilizados com faixas de concentração testadas na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima inibitória em biofilme (MBIC).....	41
Quadro 4 - Caracterização das amostras em forte e fraca formadora de biofilme, conforme fórmula proposta por Stepanovic et al. (2007)*.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de sensibilidade, intervalo de concentração mínima inibitória das amostras de EAEC (n=35), CMI ₅₀ e CMI ₉₀ determinada pelo método de diluição em ágar.....	53
Tabela 2 - Média da densidade óptica em cristal violeta e safranina em poço de microplaca e em <i>peg-lid</i> para caracterização em forte e fraca formadoras de biofilme e mediana das médias das DOs obtidas em polos e <i>pegs</i>	56
Tabela 3 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) (µg/mL) e Concentração Mínima Inibitória de Biofilme (MBIC) (µg/mL) e relação MBIC/CMI para as amostras de EAEC produtoras de biofilme e para os protótipos EAEC 042, EAEC 17-2 e cepa de <i>E. coli</i> ATCC 25922 em sistema <i>peg-lid</i>	60
Tabela 4 - Intervalo de MBIC, MBIC ₅₀ e MBIC ₉₀ para as 20 amostras de EAEC formadoras de biofilme em sistema <i>peg-lid</i> em relação com o intervalo de CMI, CMI ₅₀ e CMI ₉₀	62
Tabela 5 - Frequência da susceptibilidade das amostras de EAEC formadoras de biofilme frente aos nove antimicrobianos.....	63
Tabela 6 - Média geométrica e Mediana do valor da CMI e do valor da MBIC das amostras de EAEC formadoras de biofilme.....	64
Tabela 7 - Distribuição de biofilme fracos e fortes por número de antimicrobianos para os quais apresentaram resistência ou resistência intermediária.....	64
Tabela 8 - Média geométrica e Mediana do valor de MBIC das amostras Forte e Fraca formadoras de biofilme.....	65
Tabela 9 - Concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) de amostras de EAEC em biofilme em diferentes tempos de crescimento (24, 48 e 72 horas).....	67
Tabela 10 - Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC) de amostras de EAEC em biofilme para alguns antimicrobianos com adição de cloreto de trifeniltetrazólio 0,05% e detecção de células viáveis.....	69

Tabela 11 - Valores de MBIC e MBEC em sistema *peg-lid* pela contagem de células viáveis de amostras de EAEC (n=13).....70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Cinética de formação do biofilme nos tempos de crescimento (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 horas) para as amostras EAEC 042, fortes formadoras de biofilme (Q255D e Q340A) e fracas formadoras de biofilme (89A e 110C).....55

Gráfico 2 - Médias das densidades ópticas obtidas de biofilme formado em poços de microplacas e nos *peg-lids* após coloração com cristal violeta (A) em DO_{590nm} ou safranina (B) em DO_{530nm}, referente ao controle positivo (ATCC 25922), aos controles negativos (HB101 e DH5α) e às amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa.....57

Gráfico 3 - Densidade óptica de amostras de EAEC frente aos antimicrobianos testados. Linha horizontal indica o ponto de corte (diferença de 10% da média da leitura DO₆₅₀ do controle positivo no tempo 0 e 6h) para cada antimicrobiano testado, acima da qual os biofilmes são resistentes ou de resistência intermediária (AMP= 0,008, CFO= 0,0175, CTX= 0,0083, CRO= 0,0099, CIP= 0,0113, TOB= 0,0121, TET= 0,0116, CLO= 0,0114, SXT= 0,0115). AMP- ampicilina, CFO- cefoxitina, CTX- cefotaxima, CRO-ceftriaxona, CIP- ciprofloxacina, TOB- tobramicina, TET-tetraciclina, CLO- cloranfenicol, SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.....59

Gráfico 4 – Densidade óptica da biomassa recuperada de *peg-lids* de amostras fortes e fracas formadoras de biofilmes categorizadas como sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos ($p > 0,05$) (Teste T de Student). (●) DO acima do valor máximo (valor atípico).....65

Gráfico 5 - Relação da densidade óptica entre amostras fortes e fracas formadoras de biofilme para cada antimicrobiano testado. DO significativamente superior para amostras fortes formadoras de biofilme frente a AMP, CRO e TOB (*) ($p < 0,05$ Teste T de Student). AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO-cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\bar{x}$ – Média

AA – Aderência Agregativa

AAF – *Aggregate adhesion fimbriae* (Fímbria de aderência agregativa)

aEPEC – *Enteropathogenic Escherichia coli atypical* (*E. coli* enteropatogênica atípica)

AggR – regulador transcricional

aggR – gene que codifica o regulador transcricional AggR

AMP – ampicilina

AN – Ágar nutriente

CAMHB – *Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth* (Caldo Mueller Hinton cátion ajustado)

CC – controle de crescimento

CLO - cloranfenicol

CMI – Concentração mínima inibitória

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Clínicas e Laboratório)

CIP – ciprofloxacina

CFO – cefoxitina

CRO – ceftriaxona

CTX – cefotaxima

DAEC – *Diffusely adherent E. coli* (*E. coli* de aderência difusa)

DEC – *Diareheogenic E. coli* (*E. coli* diarreiogênica)

DMEM – *Dulbecco's minimum essential medium* (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco)

DNA – *Deoxyribonucleid acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DO – Densidade óptica

EAEC – *Enter aggregative E. coli* (*Escherichia coli* enteroagregativa)

EAST 1 – EAEC *heat-stable enterotoxin* 1 (Toxina termoestável tipo 1 de EAEC)

EIEC – *Enteroinvasive E. coli* (*E. coli* enteroinvasora)

EHEC – *Enterohaemorrhagic E. coli* (*E. coli* enteroemorragica)

EPS – *Extracellular Polymeric Substances* (Substância Polimérica Extracelular)

ETEC – *Enterotoxigenic E. coli* (*E. coli* enterotoxigênica)

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

HEp-2 e/ou HeLa - Tipo de célula usada em pesquisas científicas

QS – *Quorum Sensing*

LB – Luria Bertani (caldo Luria Bertani)

MC – Ágar MacConkey

MDa – Megadalton

MH – Caldo Mueller Hinton

MHA – Ágar Mueller Hinton

MBIC – *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (Concentração mínima inibitória de Biofilme)

OMS – Organização Mundial da Saúde

pAA – *Plasmid of Aggregative Adherence* (Plasmídio de aderência agregativa)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfatosalino)

SHET 1 – *Shigella enterotoxin 1* (Enterotoxina tipo 1 de *Shigella*)

peg-lid – Tampa com pinos (para microplaca de 96 poços)

PET – *Plasmid encoded toxin* (toxina produzida pela *E. coli*)

PIC - *Protein involved in intestinal colonization* (toxina produzida pela *E. coli*)

ST – Solução de trabalho

TET – tetraciclina

tEPEC – *Enteropathogenic E. coli typical* (*E. coli* enteropatogênica típica)

TOB – tobramicina

UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i> E PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS.....	23
2.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC).....	24
2.2.1 Aspectos gerais e diagnóstico laboratorial.....	24
2.2.2 Patogênese e aspectos clínicos.....	27
2.3 BIOFILME BACTERIANO.....	29
2.3.1 Definição e formação do biofilme.....	29
2.3.2 Componentes do biofilme de <i>E.coli</i>	31
2.3.3 Intensidade de formação de biofilme.....	32
2.3.4 Implicação clínica da formação de biofilme no controle da infecção com antimicrobiano.....	33
2.4 ANTIMICROBIANOS E <i>E.coli</i> ENTEROAGREGATIVA.....	34
2.5 SISTEMAS <i>IN VITRO</i> PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	35
3 OBJETIVO.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRAS BACTERIANAS.....	40
4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)	41
4.3 ESTABELECIMENTO E CALIBRAÇÃO DO SISTEMA <i>PEG-LID</i>	43
4.3.1 Inóculo bacteriano.....	43
4.3.2 Verificação da homogeneidade de formação de biofilme entre os <i>pegs</i> da microplaca.....	44
4.4 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	47
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME EM POÇO DE MICROPLACA E <i>PEG-LID</i>	46
4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE BIOFILME (MBIC).....	49
4.6.1 Formação de biofilme em sistema <i>peg-lid</i>	49
4.6.2 Microplaca de antimicrobianos.....	49

4.6.3 Concentração Mínima Inibitória de Biofilme (MBIC).....	51
4.6.3.1 MBIC em biofilme de 24 horas.....	51
4.6.3.2 MBIC em biofilme de 48 e 72 horas.....	51
4.6.4 Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme	
(MBEC).....	51
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....	53
5.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA <i>PEG-LID</i>	53
5.3 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME.....	54
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME EM POÇO DE MICROPLACA E <i>PEG-LID</i>	55
5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MBIC) E DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILME (MBEC).....	58
5.5.1 Concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC).....	58
5.5.2 Concentração mínima de erradicação de biofilme	
(MBEC).....	67
6 DISCUSSÃO.....	71
6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7 CONCLUSÃO.....	78
8 REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A - Estudos que realizaram testes de susceptibilidade para isolados de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme e percentagem de resistência aos antimicrobianos.....	96

1 INTRODUÇÃO

A diarreia, normalmente um sintoma de infecção gastrointestinal, é definida pela Organização Mundial da Saúde como a eliminação de três ou mais fezes líquidas por dia ou de consistência reduzida, ou em número de vezes maior do que o usual. Ela pode ser classificada em aguda, quando tem duração inferior a 14 dias, ou em persistente, quando a duração é de pelo menos 14 dias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). A forma grave da doença é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre crianças, a maior parte ocorrendo em países em desenvolvimento (BLACK et al., 2010; CROXEN et al., 2013; NATARO, 2013).

Diversos são os agentes etiológicos da diarreia de natureza infecciosa, podendo ser devido a bactérias, vírus e parasitas. Dentre os agentes bacterianos, os patótipos diarreioagênicos de *Escherichia coli* (DEC) tem um papel importante e representam um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento (CROXEN et al., 2013). Existem seis patótipos de DEC e destes, a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) têm emergido como um importante patógeno de gastroenterite, relacionada tanto à diarreia aguda quanto persistente em crianças e adultos (NATARO & KAPER, 1998; NATARO, 2005; JAFARI et al., 2013).

A EAEC é um patótipo heterogêneo com uma patogênese complexa relacionada à aderência ao epitélio intestinal, à produção de um amplo repertório de enzimas e toxinas e à capacidade de produção de biofilme (CROXEN et al., 2013; JENSEN et al., 2014). Devido à sua associação com infecção persistente, desnutrição, retardo do crescimento e deficiência de vitamina A, a Organização Mundial da Saúde e o Ministério da Saúde recomendam a terapia com antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008). A seleção dos antimicrobianos a serem usados deve ser idealmente baseada em testes de susceptibilidade. Entretanto, os testes padronizados qualitativos e quantitativos usuais como de difusão do disco, diluição em ágar ou microdiluição em caldo revelam apenas as propriedades fisiológicas da bactéria em sua forma plantônica, que são diversas das do biofilme, quando as bactérias são de difícil ou impossível erradicação (HØIBY et al., 2010; TAGLIABUE et al., 2010). Devido a aspectos de estrutura bioquímica do biofilme (matriz polimérica extracelular- EPS), tempo de formação e da natureza dos antimicrobianos, a interação pode se dar de modo

diverso e a atividade antibacteriana ser ou não eficaz (COSTERTON et al., 1999; MONROE, 2007).

Neste sentido, o conhecimento da susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias em biofilme é necessário para a indicação adequada da terapia antibacteriana. Porém, pelo menos dois desafios são interpostos. Primeiro, embora a *E. coli* seja facilmente identificada em diagnóstico laboratorial de rotina, a caracterização do patotipo EAEC requer a realização de aderência em cultura de células, considerada padrão ouro, ou de métodos moleculares, o que somente são realizados em laboratórios especializados de pesquisa (NATARO et al., 1987; TOKUDA et al., 2010). Segundo, os testes para determinação da concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC), como propostos a partir do final da década de 90 em poços de microplacas de poliestireno ou *pegs* de tampas de microplacas modificadas (*peg lid*) (CERI et al., 1999; MOSKOVITZ et al., 2004; HARRISON et al., 2010; MACIÁ et al., 2014), são procedimentos extremamente laboriosos para serem implantados na rotina laboratorial e ainda, não padronizados por agências reguladoras como *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) ou *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Cabe destacar ainda que, até o momento, não existe na literatura estudos realizados que determinem a MBIC para EAEC e somente poucos estudos foram realizados para essas bactérias em sua forma plantônica (Anexo 1). O tratamento empírico com ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina e quinolonas é sugerido para infecção por EAEC (KONG et al., 2015), mas não sabemos se efetivamente esses antimicrobianos apresentariam atividade em biofilme.

Neste sentido, propusemos analisar o impacto do biofilme na susceptibilidade de amostras de EAEC a oito classes de antimicrobianos, incluindo as quatro classes sugeridas para tratamento, a fim de evidenciar aqueles que teriam ou não eficácia no tratamento empírico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *ESCHERICHIA COLI* E PATOTIPOS DIARREIOGÊNICOS

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo que pode ser imóvel ou móvel, com flagelos peritríquios. Coloniza o intestino de vertebrados e invertebrados e faz parte da microbiota normal de humanos a partir das primeiras horas após o nascimento (KAPER et al., 2004; TRABULSI, ALTERTHUM, 2005). O nicho de *E. coli* comensal é a camada mucosa do cólon de mamíferos, sendo um competidor altamente bem sucedido neste local e o anaeróbio facultativo mais abundante da microbiota intestinal humana (NATARO & KAPER, 1998).

E. coli é uma bactéria altamente versátil e, evolutivamente, várias estirpes adquiriram fatores de virulência específicos, gerando patotipos capazes de se adaptar a novos nichos e de causar um amplo espectro de doenças (KAPER et al., 2004). Estes patotipos podem causar desde infecções extraintestinais, como do trato urinário, sepse e meningite, a infecções intestinais, sendo estes denominados patotipos diarreiogênicos de *E.coli* (DEC) e implicados na diarreia em todo o mundo (NATARO & KAPER, 1998; OKEKE, NATARO, 2001; HUANG et al., 2006, 2007). Assim, grandes grupos de genes de virulência, ilhas de patogenicidade, podem ser encontrados em plasmídios ou integrados no cromossomo das *E. coli* patogênicas, mas não nas não patogênicas (CROXEN & FINLAY, 2010; CROXEN et al., 2013; TRUNG et al., 2016).

Seis patotipos de DEC têm sido definidos baseando-se nos mecanismos de virulência, patogênese e manifestações clínicas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (KAPER et al., 2004) (Figura 1). Destes, a EAEC, considerada um patotipo emergente, é o objeto deste estudo e será caracterizada a seguir.

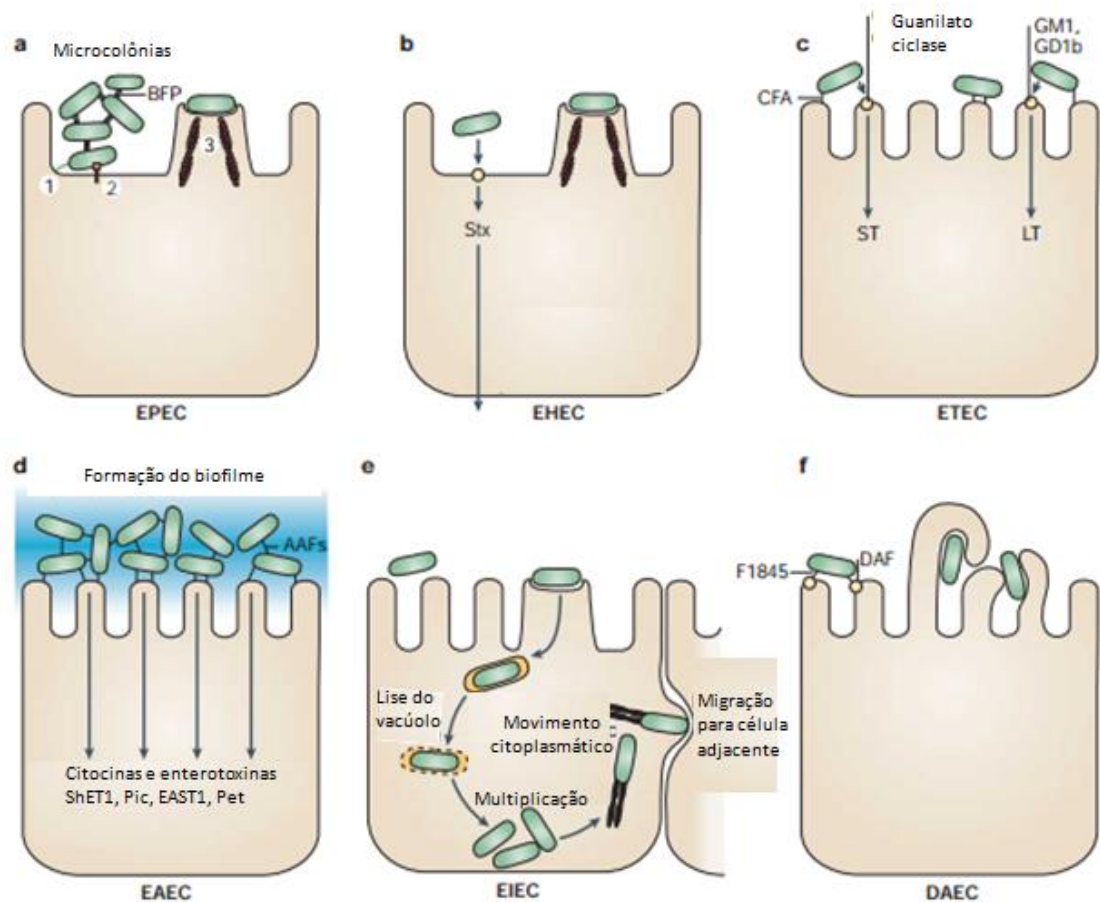


Figura 1 – Representação esquemática da patogênese resumida dos seis patotipos diarreioagênicos de *Escherichia coli* (Adaptado de KAPER et al., 2004). EPEC (*E. coli* enteropatogênica): possui o pili BFP (EPEC típica) responsável por aderência bactéria-bactéria e bactéria a células epiteliais e causa lesão A/E (Attaching/Effacing) (EPEC típica e atípica). EHEC (*E. coli* enterohemorrágica): produz a toxina Stx e causa lesão A/E. ETEC (*E. coli* enterotoxigênica): adere por meio de fator de colonização (CFA) ao enterócito e produz enterotoxinas termo lábil (LT) e/ou termo estável (ST). EAEC (*E. coli* enteroagregativa): adere por meio de fímbrias de aderência agregativa (AAFs) dentre outras, produz biofilme e enterotoxinas. EIEC (*E. coli* enteroinvasora): invade células epiteliais disseminando lateralmente por meio de polimerização polar de actina. DAEC (*E. coli* de aderência difusa): induz a formação de projeções longas e finas da superfície celular, que envolve a bactéria e a protege da ação de antimicrobianos. BFP: *Bundle-forming pilus*. Stx: toxina Shiga-like. ShET1: Enterotoxina tipo 1 de *Shigella*. Pic: toxina autotransportadora. EAST1: Toxina termoestável tipo 1 de EAEC. Pet: *plasmid encoded toxin*.

2.2 *ESCHERICHIA COLI* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

2.2.1 Aspectos gerais e diagnóstico laboratorial

A EAEC é um dos últimos patotipos descritos, que foi identificada em crianças chilenas com diarreia persistente por meio da observação de um novo padrão de

aderência em cultura de células humanas HEp-2 e/ou HeLa (NATARO et al., 1987). Este padrão de aderência foi denominado de aderência agregativa (AA) por aderirem numa configuração semelhante a “tijolo empilhado” à superfície das células, sobre a lamínula livre de células, ou até mesmo umas às outras (Figura 2) (NATARO et al., 1987). Esse fenótipo AA é codificado em plasmídios de 60-65 MDa, denominados de pAA (*plasmid Aggregative Adherence*) (VIAL et al., 1988).

A EAEC é classificada em típica (tEAEC) ou atípica (aEAEC) conforme a presença ou ausência do *regulon* AggR, respectivamente, que é definido como a presença do gene *aggR* que codifica o regulador transcricional AggR e dos genes que codificam as fímbrias de aderência agregativa (AAF), o gene *aap*, que codifica a proteína de superfície dispersina e o gene *aat*, que codifica o sistema de secreção para o transporte da dispersina na superfície bacteriana que são por ele regulados (HARRINGTON et al., 2005; MORIN et al., 2013).

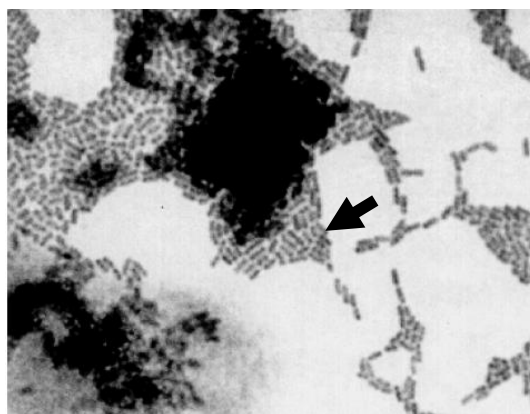


Figura 2 – Padrão de aderência agregativa em células HEp-2, na forma de “tijolo-empilhado” (seta) (NATARO & KAPER, 1998).

Este patotipo é caracterizado pela grande heterogeneidade entre os isolados quanto aos seus potenciais fatores de virulência (SCHMDIT et al., 1995; HUANG et al., 2006; CROXEN & FINLAY, 2010; ALI et al., 2014). Adesinas e toxinas e vários outros fatores de virulência tem sido descritos em isolados de EAEC, codificados por genes plasmidiais e cromossômicos (NATARO & KAPER, 1998) (Quadro 1).

A heterogeneidade da EAEC quanto aos prováveis fatores de virulência, torna a sua identificação um desafio para o diagnóstico laboratorial por não apresentar um marcador que seja comum a todas as amostras (HUANG et al., 2006; CROXEN &

FINLAY, 2010). Por este motivo, o padrão-ouro de identificação se mantém a aderência em cultura de células (NATARO et al., 1987; BANGAR & MAMATHA, 2008; JENKINS et al., 2006).

Quadro 1 - Fatores de virulência do patotipo de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e respectivos mecanismos de ação

Fatores de Virulência	Mecanismo de ação	Referências
Adesinas fimbriais AAF/I – V	Fimbrias de aderência agregativa que viabilizam a aderência inicial no epitélio intestinal. Todas são reguladas pelo regulador transcricional AggR e presentes no plasmídeo AA.	JONSSON et al., 2015
Adesinas afimbriais	Adesinas que auxiliam na aderência agregativa. Codificadas no plasmídeo AA.	CROXEN et al., 2013
Dispersina	Induz alterações na superfície eletrostática lipopolissacarídea das bactérias, importante para as propriedades de aderência e de dispersão na mucosa intestinal da EAEC.	OKHUYSEN & DUPONT, 2010
Toxinas EAST-1	Enterotoxina termoestável que ativa adenilato ciclase induzindo aumento dos níveis de GMP cíclico. Está associada à diarreia aquosa.	SAVARINO et al., 1991
ShET1	Enterotoxina, identificada primeiramente em <i>Shigella flexneri</i> , provoca aumento de fluidos, sendo associada com diarreia secretória.	JENSEN et al., 2014
Pet	Serinoprotease autotransportadora que cliva espectrina no citoesqueleto epitelial e está associada a fezes mucóides.	NAVARRO-GARCIA et al., 1998
Pic	Mucinase que pode interferir na integridade da membrana mucosa e induzir hemaglutinação.	DURAND et al., 2016
AggR	Regulador transcricional presente no plasmídeo pAA, que controla a expressão de vários fatores de virulência e de grupos de genes relacionados à patogenicidade tanto plasmidiais quanto cromossômicos.	JENSEN et al., 2014

Técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para detectar EAEC como métodos de hibridização do DNA, por meio da sonda para o plasmídeo da cepa EAEC 17-2 (pCVD432 ou pAA) ou métodos de PCR para amplificar alguns genes de virulência (BAULDRY et al., 1990; CERNA et al., 2003; GOMES et al., 2016). No entanto, devido à heterogeneidade e ao fato da virulência de EAEC resultar da combinação de múltiplos fatores, torna-se um desafio diferenciar as estirpes patogênicas das não patogênicas pelos métodos moleculares utilizados atualmente.

2.2.2 Patogênese e aspectos clínicos

A EAEC é relatada como causa de diarreia aguda e persistente (≥ 14 dias de duração) em crianças e adultos de países desenvolvidos e em desenvolvimento, de diarreia dos viajantes, de surtos, além de ser um patógeno oportunista associado à diarreia em pacientes imunodeficientes (HIV positivos) e crianças desnutridas (OKEKE e NATARO, 2001; HUANG, OKHUYSEN, et al., 2004; HUANG et al., 2006; HILL & BEECHING, 2010; NAVARRO-GARCIA & ELIAS, 2011). No Brasil, a EAEC é descrita em diversos estudos, inclusive sendo um dos patótipos mais frequentemente isolados (GOMES, BLAKE, TRABULSI, 1989; SCALETISKY et al., 2002; ARAÚJO et al., 2007; SPANO, SADOVSKY, SEGUI et al., 2008; IKUMAPAYI, et al., 2017).

A transmissão da EAEC ocorre pela via fecal-oral, por meio de ingestão de alimentos e água contaminados (OKEKE & NATARO, 2001; KOO et al., 2008; VIGIL et al., 2009; OKHUYSEN & DUPONT, 2010; ALI et al., 2014). Os fatores de risco para infecção incluem higiene precária, viagem a países em desenvolvimento e susceptibilidade do hospedeiro (SMITH et al., 1997; HUANG, MOHANTY, DUPONT, 2006; OUNDO et al., 2008).

Embora a patogênese da EAEC seja muito complexa (STEINER et al., 1998; ELIAS et al., 2002; BASU et al., 2004; HARRINGTON et al., 2005), Nataro e Kaper (1998) propuseram um modelo constituído por três etapas: (i) adesão inicial à mucosa intestinal; (ii) produção de biofilme, o que favorece uma colonização persistente e má-absorção de nutrientes; e (iii) produção de toxinas e indução de processo inflamatório, que resulta em danos à mucosa e secreção intestinal, com desencadeamento da diarreia (Figura 3).

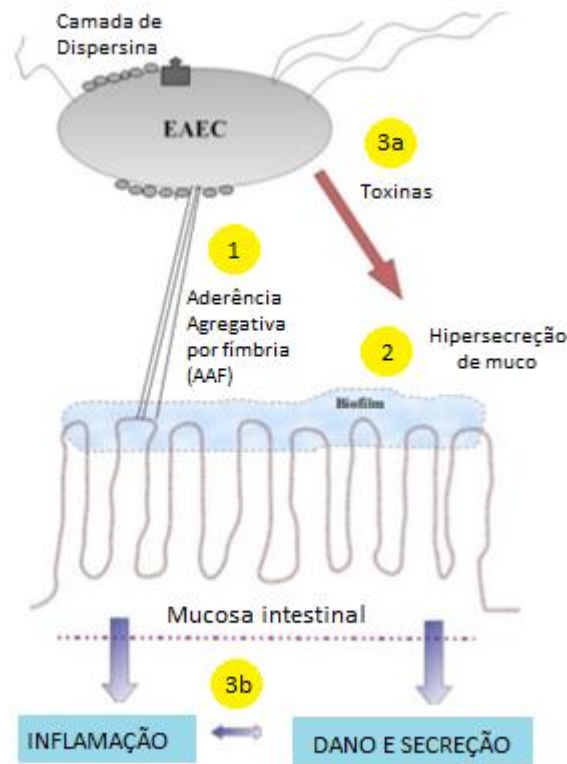


Figura 3 – Estágios da patogênese da EAEC. (1) Aderência ao epitélio intestinal facilitada por adesinas. (2) Hipersecreção de muco. (3a) Secreção de toxinas. (3b) Indução de resposta inflamatória (Adaptado de <https://pt.slideshare.net/Wishofnight13/master-thesis-presentation-11402753>).

O padrão agregativo dessas bactérias parece contribuir para a ligação à superfície celular e autoagregação (JENSEN et al., 2014). A aderência inicial ao epitélio intestinal é facilitada por adesinas fimbriais, as denominadas fímbrias de aderência agregativa (AAF), e afimbriais, sendo o primeiro passo da colonização bacteriana no intestino (NATARO et al., 1992; HUANG, MOHANTY, DUPONT, 2006; ESTRADA-GARCIA, NAVARRO-GARCIA, 2012; CROXEN et al., 2013) (Figura 3, Quadro 1). A fímbria se liga aos componentes da matriz extracelular das células epiteliais intestinais como laminina, colágeno tipo IV e fibronectina (IZQUIERDO et al., 2014).

A indução da hipersecreção de muco pelo estímulo das células caliciformes e formação do biofilme que ocorrem após a colonização são aspectos marcantes da infecção pela EAEC (STEINER et al., 1998; MONDAL et al., 2009; NAVARRO-GARCIA et al., 2010; JENSEN et al., 2014). O biofilme contribui para a infecção persistente, pois permite que as bactérias escapem do sistema imunológico local e confere limitação à ação dos agentes antimicrobianos (VAN HOUDT et al., 2004; OKHUYSEN & DUPONT, 2010; JENSEN et al., 2014; MITTAL et al., 2015). Consequentemente ocorrem mais danos ao epitélio intestinal causados pela liberação de toxinas bacterianas que desempenham um papel importante na diarreia secretora, típica manifestação clínica da infecção por EAEC (JENSEN et al., 2014).

As manifestações clínicas de EAEC mais comumente reportadas são diarreia aquosa com ou sem sangue ou muco, dores abdominais, náuseas, vômitos e febre (STEINER et al., 1998; NATARO et al., 2006; HUANG et al., 2007; MENDEZ-ARANCIBIA et al., 2008; FLORES e OKHUUSEN, 2009; OKEKE et al., 2011). O comprometimento crônico no funcionamento do intestino causado pela infecção persistente tem sido associado à desnutrição e ao baixo desenvolvimento físico e intelectual em crianças (NATARO et al., 1998; OPINTAN et al., 2010; OKHUUSEN & DUPONT, 2010). Ainda, a presença de marcadores fecais inflamatórios, como lactoferrina fecal e interleucinas (IL-8 e IL-1), foi associada à dificuldade de ganho de peso e de estatura de crianças com enterite causada por EAEC (LIMA et al., 1992).

2.3 BIOFILME BACTERIANO

2.3.1 Definição e formação do biofilme

Biofilme bacteriano é caracterizado por ser uma comunidade complexa de microrganismos envoltos em material polissacarídico extracelular aderido a superfícies bióticas e abióticas (COSTERTON et al., 1995; COSTERTON et al., 1999; VAN HOUTDT et al., 2004; HOIBY et al., 2010; LEMBRE et al., 2012). Os microrganismos em biofilme são beneficiados devido ao ambiente polimicrobiano envolto por uma matriz polimérica, que confere proteção contra os antimicrobianos e contra a resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro (VAN HOUTDT et al., 2004).

A formação do biofilme é um processo de múltiplas etapas que envolvem: (i) aderência inicial e reversível das bactérias plantônicas a superfícies; (ii) transição da aderência reversível para a irreversível, mediada por adesinas e/ou por produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) pela bactéria; (iii) desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme; (iv) formação de microcolônias dentro do biofilme maduro e; (v) dispersão de células do biofilme para o ambiente ao redor, com retorno ao estado plantônico e possibilidade de colonização de novo ambiente (Figura 4) (MONROE, 2007; CHENG et al., 2010).

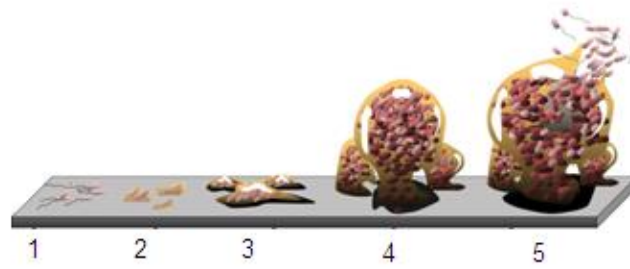


Figura 4 – Ilustração das fases de formação do biofilme: (1) aderência inicial; (2) aderência irreversível; (3) desenvolvimento inicial do biofilme (4) formação de microcolônias dentro do biofilme (5) dispersão de células do biofilme (Adaptado de MONROE, 2007).

O crescimento tridimensional que ocorre com a maturação do biofilme gera um ambiente físico-químico heterogêneo contendo, além do EPS, uma variedade de macromoléculas incluindo proteínas, lipídios, polissacarídeos e DNA (BELOIN et al., 2010) (Figura 5). As EPS são reconhecidas como elementos essenciais para dar forma e porte estrutural ao biofilme (SUTHERLAND, 2001; LEMBRE et al., 2012). Estas substâncias são diversificadas e estão frequentemente envolvidas no estabelecimento do contato célula-célula (BRANDA et al., 2005; SIMM et al., 2005).

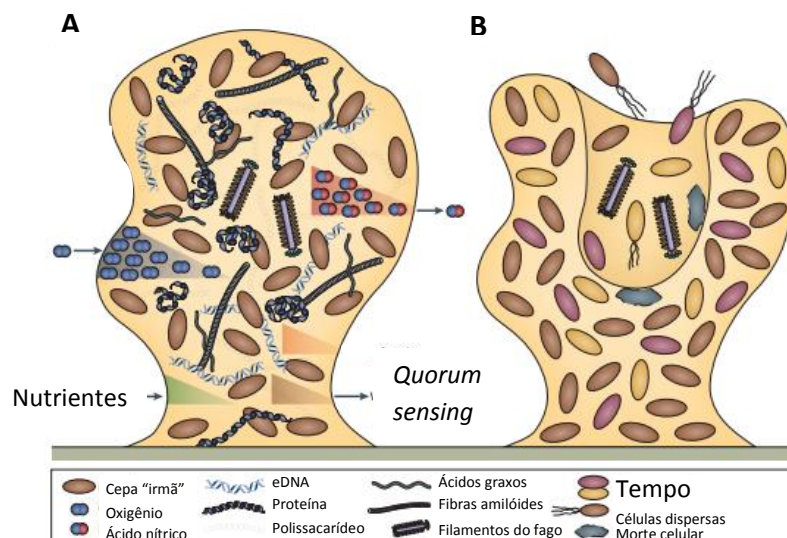


Figura 5 – A complexa estrutura do biofilme bacteriano. A. Microcolônias no biofilme bacteriano são caracterizadas por matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta de DNA extracelular, polissacarídeos, proteínas, fibras amilóides e bacteriófago. B. Ao passar do tempo, ocorre dispersão das células do biofilme, muitas células bacterianas morrem e ocorre a variação genotípica e fenotípica das células em biofilme (Adaptado de MCDUGALD et al., 2012).

Neste ambiente, a bactéria difere dos seus homólogos plantônicos onde, em adição à síntese de EPS, os microrganismos estabelecem um sistema denominado *quorum sensing* (QS), em que produzem e secretam pequenas moléculas difusíveis

sinalizadoras (autoindutoras), relacionadas à comunicação intercelular dependente da densidade bacteriana, que são detectadas por receptores de outra bactéria (VAN HOUTT et al., 2004; BRITO et al., 2013) (Figuras 5 e 6).

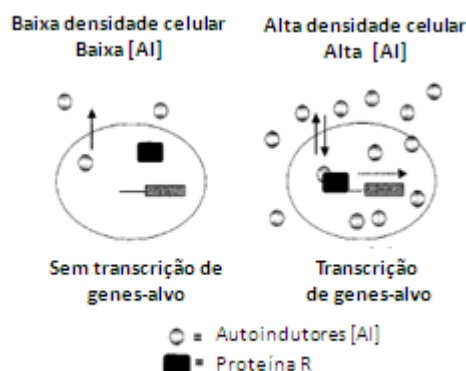


Figura 6 - *Quorum-sensing* envolve dois componentes regulatórios: a proteína ativadora transcricional (Proteína R) e as moléculas autoindutoras (AI) produzidas pela autoindutora sintase. Acumulação de AI ocorre de uma maneira célula-dependente da densidade até que um nível limite seja atingido. Neste momento, o AI se liga e ativa a proteína R, que por sua vez induz expressão de genes-alvo. A proteína R consiste de dois domínios: a terminação N da proteína que interage com o AHL e terminação C que está envolvida na ligação do DNA (Adaptado de KIEVIT & IGLEWSKI, 2000).

As moléculas de sinalização podem desempenhar papéis no biofilme, tais como o desencadeamento de um biofilme específico mediante estresse e resistência a biocidas (VAN HOUTT et al., 2006). Como biofilmes são comunidades mistas, a resistência pode ser desencadeada em membros da comunidade do biofilme nos quais não foram produzidas moléculas sinalizadoras (VAN HOUTT et al., 2004). Além de utilizar a detecção de QS como meio de comunicação para a formação e desenvolvimento de biofilmes, estas moléculas sinalizadoras regulam a produção de fatores de virulência, como no estudo com *Pseudomonas aeruginosa* (proteases, Exotoxina A e piocianina) e tem sido implicada na resistência aos antimicrobianos (WAGNER et al., 2003).

2.3.2 Componentes do biofilme de *E. coli*

Três exopolissacarídeos têm sido mostrados como importantes na constituição do biofilme de *E. coli*: (i) polímero de β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina (PGA), (ii) ácido colânico e (iii) celulose (HANNA et al., 2003; SCHEMBRI et al., 2004; AGLADZE et al., 2005) (Figura 7). O PGA está envolvido tanto na adesão célula-célula quanto a

superfícies (WANG et al., 2004; AGLADZE et al., 2005). A celulose, um homopolissacarídeo componente de parede celular vegetal, está associada com rigidez do biofilme na interface ar-líquido, característica esta que varia entre estirpes e é altamente dependente das condições ambientais (CZAJA et al., 2006). O ácido colânico é um polímero carregado negativamente de glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, que forma uma matriz protetora ao redor da célula bacteriana (BELOIN et al., 2010). Foi demonstrado que o ácido colânico é induzido por antimicrobianos β -lactâmicos em concentrações quase letais, podendo exacerbar a formação e a persistência do biofilme (SAILER et al., 2003).

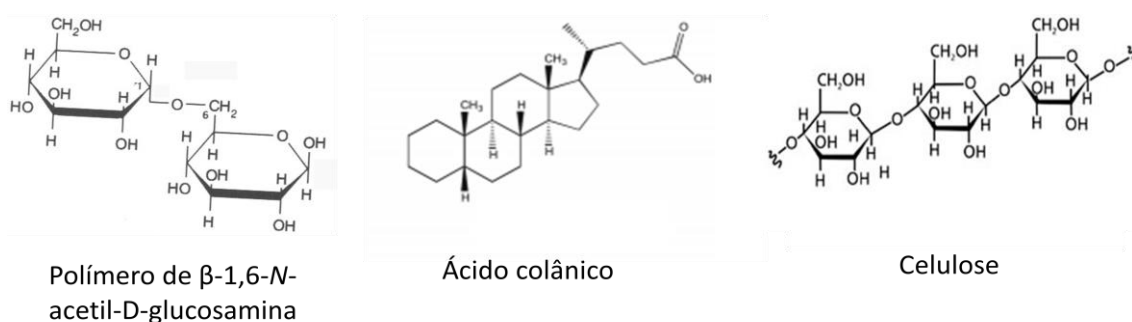


Figura 7: Representação das moléculas dos três principais exopolissacarídeos da matriz de biofilme de *Escherichia coli*.

2.3.3 Intensidade de formação de biofilme

Os microrganismos são classificados como formadores ou não de biofilme e, sendo formadores, classificados quanto à espessura da matriz de exopolissacarídeo como forte ou fracos formadores de biofilme, por meio do ensaio de quantificação de biofilme (CHRISTENSEN et al., 1985). O método comumente utilizado para corar o biofilme é a coloração com cristal violeta (CHRISTENSEN et al., 1985; LI et al., 2003; PITTS et al., 2003; PEETERS et al., 2008; STEPANOVIC et al., 2007; XU et al., 2016), mas outros estudos utilizam a safranina para corar o biofilme (HEILMANN et al., 1996; CRAMTON et al., 2001; DEIGHTON et al., 2001; MORETRO et al., 2003; TORMO et al., 2005). O cristal violeta é um corante básico que cora moléculas de superfície carregadas negativamente de proteínas, matriz extracelular de exopolissacarídeo, células mortas e vivas, ou seja, cora a biomassa total do biofilme (LI et al., 2003). A safranina é um corante básico que cora a matriz de exopolissacarídeo. O corante solubilizado do biofilme é então submetido à leitura da

densidade óptica (DO) e apartir da média da DO e do desvio padrão do controle negativo (não formador de biofilme), a bactéria é classificada como forte ou fraca formadora se maior ou menor do que $2 \times \bar{x} DO_{CN} + 3 \times DP_{CN}$, respectivamente (STEPANOVIC et al., 2007).

2.3.4 Implicação clínica da formação de biofilme no controle da infecção com antimicrobiano

Tem sido estimado que 90% das infecções microbianas estão associadas com a formação de biofilme, o que contribui para a cronicidade de muitas delas (BARSOUMIAN et al., 2015). Em biofilme, as bactérias podem ser de 100 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células plantônicas, sendo um problema crucial para tratamento de infecções crônicas (HOYLE, ALCANTARA, COSTERTON, 1992; COSTERTON, STEWART, GREENBERG, 1999; MAH & O'TOOLE, 2001; DONLAN, COSTERTON, 2002; MONROE, 2007; ITO et al., 2009; HØIBY et al., 2010; BRACKMAN & COENYE, 2014; JENSEN et al., 2014).

Alguns mecanismos que justificariam a resistência aos agentes antimicrobianos pelas bactérias em biofilme tem sido descritos, como: (i) falha da penetração do antimicrobiano visto que as substâncias poliméricas que constituem a matriz do biofilme retardariam a difusão dos antimicrobianos, agindo como uma barreira e impedindo a ação dos antimicrobianos; (ii) adesão física do antimicrobiano aos componentes da matriz do biofilme após a penetração; (iii) limitação de água, nutrientes e oxigênio em zonas mais profundas do biofilme, o que faz com as bactérias entrem em um estado de crescimento lento ou de não crescimento; (iv) indução de um fenótipo de resistência em uma subpopulação bacteriana que resulta na expressão de mecanismos ativos, como alterações na permeabilidade da membrana e expressão de bombas de efluxo; (v) acúmulo de resíduos ácidos ocasionando em redução do pH e inativação da ação do antimicrobiano; (vi) capacidade das bactérias em acumular enzimas que degradam antimicrobianos, como beta-lactamases; (vii) aumento da frequência de mutação e intercâmbio genético horizontal que proporcionam uma alta densidade do número de bactérias resistentes (viii) Aumento da biomassa do biofilme, que com o aumento do número de células na matriz do biofilme dificulta a ação do antimicrobiano (COSTERTON,

STEWART, GREENBERG, 1999; MAH & O'TOOLE, 2001; STEWART & CONSTERTON, 2001; LEWIS, 2008; LAZĂR & CHIFIRIUC, 2010; JOLIVET-GOUGEON & BONNAURE-MALLET, 2014). A Figura 8 ilustra alguns mecanismos relacionados à resistência antimicrobiana de biofilme, conforme apresentado por Stewart & Costerton (2001).

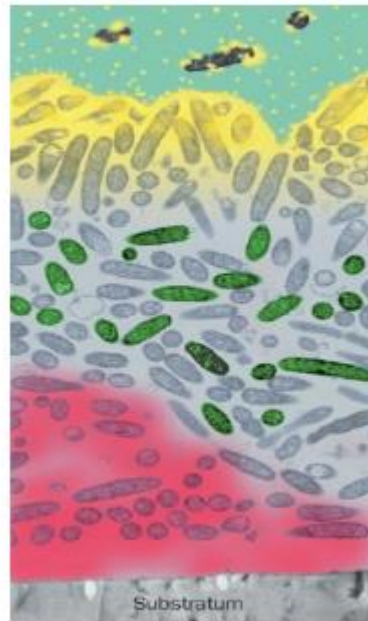


Figura 8 – Representação de três hipóteses de mecanismos de resistência a antimicrobianos em biofilmes: 1. Em amarelo - baixa penetração – os antimicrobianos não penetram no biofilme, podendo ser inativados ou adsorvidos na superfície do biofilme; 2. Em verde – podem ocorrer alterações fenotípicas no microambiente do biofilme; 3. Em vermelho – nas zonas mais profundas do biofilme, pode ocorrer diminuição do metabolismo do microrganismo (STEWART & CONSTERTON, 2001).

2.4 ANTIMICROBIANOS E *E.coli* ENTEROAGREGATIVA

As infecções por EAEC são usualmente autolimitadas e a decisão para utilizar a terapia antimicrobiana deve ser feita individualmente (HUANG et al., 2004; KAUR et al., 2010). Porém, a fim de garantir a resolução e evitar os casos graves e persistentes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde do Brasil indicam reidratação oral nos quadros de diarreia aguda e antibioticoterapia nos casos de diarreia persistente (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

De acordo com Kong et al. (2015), ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina e quinolonas, são os antimicrobianos considerados de primeira linha

para tratamento de infecção por EAEC devido à disponibilidade e baixo custo. Entretanto, a resistência descrita para amostras de EAEC isoladas em alguns países do mundo, conforme apresentado no Anexo A, variaram de 32,4-100% para ampicilina, 20-97% para tetraciclina, 23,8-100% para sulfametoxazol/trimetoprim e de 0-100% para ciprofloxacina, mas com medianas de resistência de 81% para ampicilina, de 70% para tetraciclina, 72,4% para sulfametoxazol/trimetoprim e de somente 1,1% para ciprofloxacina. Logo, esses dados são preocupantes, pois observamos alta resistência a três dos quatro antimicrobianos preconizados ou mais comumente utilizados.

O uso inadequado do antimicrobiano pode acarretar em insucesso terapêutico, persistência da infecção e agravamento da situação clínica do paciente. A seleção dos antimicrobianos deve ser baseada em testes de susceptibilidade. Entretanto, os testes usuais revelam apenas as propriedades fisiológicas da bactéria em sua forma plantônica, que são diversas das do biofilme (TAGLIABUE et al., 2010). Sendo assim, os resultados não refletirão o aumento possível da resistência da bactéria em biofilme. Tendo em vista que o tratamento com antimicrobianos é recomendado em casos de infecções persistentes e os estudos de susceptibilidade para amostras de EAEC são escassos na literatura e somente foram realizados para forma plantônica da bactéria (ANEXO A), é necessária a utilização de métodos apropriados que indiquem o comportamento bacteriano em biofilme para definir aqueles que poderiam apresentar eficácia no tratamento da infecção intestinal.

2.5 SISTEMAS *IN VITRO* PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Sistemas *in vitro* vem sendo desenvolvidos para inferir o comportamento das bactérias em biofilme, como para estudos de QS e da ação de antimicrobianos (COSTERTON et al., 1999; STEWART & COSTERTON, 2001; COSTERTON et al., 2003; COENYE & NELIS, 2010).

Os sistemas para a geração de biofilme utilizados em laboratório são: fluxo de células, gotejamento de fluxo, reatores de disco e reatores de tubo. Estes modelos apresentam diversas vantagens, incluindo o crescimento de biofilmes com altas densidades populacionais, rendimentos elevados de biomassa, condições de cultura

contínua e dinâmica de fluidos controlados (MACIÀ et al., 2014). No entanto, estes sistemas não possuem capacidade para produzir mais do que algumas amostras de biofilme de uma só vez. Além disso, uma vez que estes reatores dependem de fluxo contínuo, requerem grandes volumes de meio de cultura e são propensos à contaminação (HARRISON et al., 2010).

Para permitir abordagens experimentais com pequenos volumes e com um número maior de amostras, dois métodos de cultura têm sido utilizados: o cultivo de biofilmes diretamente em poços de microplacas e em *peg-lids* para microplacas de 96 poços (CHRISTENSEN et al., 1985; CERI et al., 1999). O cultivo de biofilmes em microplacas é o método mais frequentemente utilizado (CHRISTENSEN et al., 1985; AMORENA et al., 1999; SHEIKH et al., 2001; PITTS et al., 2003; CERCA et al., 2005; PETTIT et al., 2005) pois é uma técnica relativamente barata, uma vez que pequenos volumes de reagentes são necessários, permitindo a realização de um grande número de ensaios simultaneamente (COENYE & NELIS, 2010).

Ceri et al. (1999) desenvolveram a técnica para a triagem rápida e reprodutível de análise da susceptibilidade aos antimicrobianos em biofilme em um sistema de “*pegs*” em tampa de poliestireno modificadas (sistema *peg-lid*) (Figura 9) para microplaca de 96 poços, que foi denominado “dispositivo Calgary” (CERI et al., 1999). Embora os *peg-lids* sejam um substrato mais caro para o cultivo de biofilme do que as microplacas, esta técnica possui a vantagem de eliminar a preocupação de que a agregação possa estar ligada à sedimentação dos microrganismos nos poços da microplaca. Além disso, os *pegs* possuem menor propensão à contaminação (HARRISON et al., 2010; KWIECIŃSKA-PIRÓG et al., 2013).



Figura 9 - Sistema para produção de biofilme constituído por *pegs* em tampa de poliestireno modificadas (*peg-lid*) para microplaca de 96 poços, que constitui o “dispositivo Calgary”.

A partir desta técnica, é possível determinar a MBIC, ou seja, a menor concentração do antimicrobiano que impede o crescimento bacteriano no biofilme entre um tempo inicial e seis horas após a incubação, além de determinar a concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC) (MOSKOWITZ et al., 2004). A MBIC é uma medida de resistência, que é definida pela habilidade do microrganismo em continuar o crescimento na presença do antimicrobiano enquanto a MBEC é uma medida de tolerância, definida pela habilidade do microrganismo em sobreviver, mas não crescer na presença de antimicrobianos, ou seja, que impede o crescimento visível no meio de recuperação utilizado para verificar as células viáveis do biofilme (HARRISON et al., 2010). Até o momento, de nosso conhecimento, poucos estudos utilizaram o sistema *peg-lid* para determinação da MBIC ou MBEC para bactérias gram positivas, gram negativas e fungos (Quadro 2).

Quadro 2 - Estudos que utilizaram o sistema *peg-lid* e respectivos microrganismos

Microrganismos	Amostra Clínica	Nº Amostras	Biocidas / antimicrobianos testados	Objetivo geral	Autor/Ano
<i>Mycobacterium phlei</i>	Sim	8	Biocidas (fenol, glutaraldeído, hipoclorito de sódio 5,25%, peróxido de hidrogênio 30% e nitrato de prata)	Determinar a erradicação do biofilme	BARDOUNIOTIS et al., 2001
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Sim	12	Ampicilina, tetraciclina, gentamicina, eritromicina e sulfa-trimetoprim	Determinar a MBIC	OLSON et al., 2002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim	94	Ciprofloxacina, tobramicina, cefoxitina, cloranfenicol e sulfa-trimetoprim	Determinar a MBIC	MOSKOVITZ et al., 2004
<i>Burkholderia spp</i>	Sim	8	Cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, meropenem e tobramicina	Determinar a MBEC para mutantes de <i>quorum sensing</i>	TOMLIN et al., 2005
<i>Candida tropicalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Sim	12	Nenhum	Caracterizar a estrutura do biofilme	HARRISON et al. 2006
<i>Candida spp</i>	Não	5 (padrão)	Carboidratos (glicose, frutose, lactose, maltose e sacarose)	Avaliar o efeito de carboidratos na formação de biofilme de <i>Candida spp</i>	PARAHITIYAWA et al., 2006
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim	57	Ciprofloxacina, ceftazidima, imipenem, tobramicina	Determinar a MBIC	FERNÁNDEZ-OLMOS et al., 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim	2	Ciprofloxacina e tobramicina	Examinar a penetração de tobramicina e ciprofloxacina na matriz extracelular	TSENG et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sim	58	Nenhum (Fago KT28 and KTN6)	Avaliar a degradação dos dois novos fagos em biofilme, verificando a viabilidade celular e a biomassa do biofilme	DANIS-WŁODARCZYK et al., 2015

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o impacto do biofilme de *E. coli* enteroagregativa na susceptibilidade a diversas classes de antimicrobianos e comparar o efeito dos antimicrobianos na fase plantônica e em biofilme.

3.2 Objetivos Específicos

- i) Comparar a formação do biofilme de EAEC em poço de microplaca e em *peg-lid* (Sistema “Calgary”);
- ii) Caracterizar a intensidade de formação do biofilme de amostras de EAEC;
- iii) Estabelecer tempo de maturação do biofilme de EAEC;
- iv) Determinar o perfil de susceptibilidade das amostras de EAEC na forma plantônica e em biofilme frente aos antimicrobianos;
- v) Avaliar interferência de biofilme forte e fraco de EAEC na susceptibilidade aos antimicrobianos;
- vi) Analisar o efeito do biofilme em diferentes tempos de maturação sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos;
- vii) Determinar a concentração mínima dos antimicrobianos para erradicação do biofilme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E AMOSTRAS BACTERIANAS

Trata-se de um estudo observacional descritivo realizado com 35 amostras de EAEC formadoras de biofilme que são mantidas em solução de sacarose 25% em freezer - 20°C na bacterioteca do LabViG (Laboratório de Virologia e Gastroenterite Infecciosa – UFES). Estas amostras foram isoladas entre agosto de 2007 e dezembro de 2009 de fezes de crianças com até 11 anos de idade, com e sem diarreia, de população que vive em área rural semi-isolada do norte do Espírito Santo, Brasil (Figura 10) (LOZER et al., 2013). Para fins deste estudo, dispensa-se a aprovação pelo CEP por se tratar somente das amostras bacterianas sem qualquer vínculo com o sujeito da pesquisa.

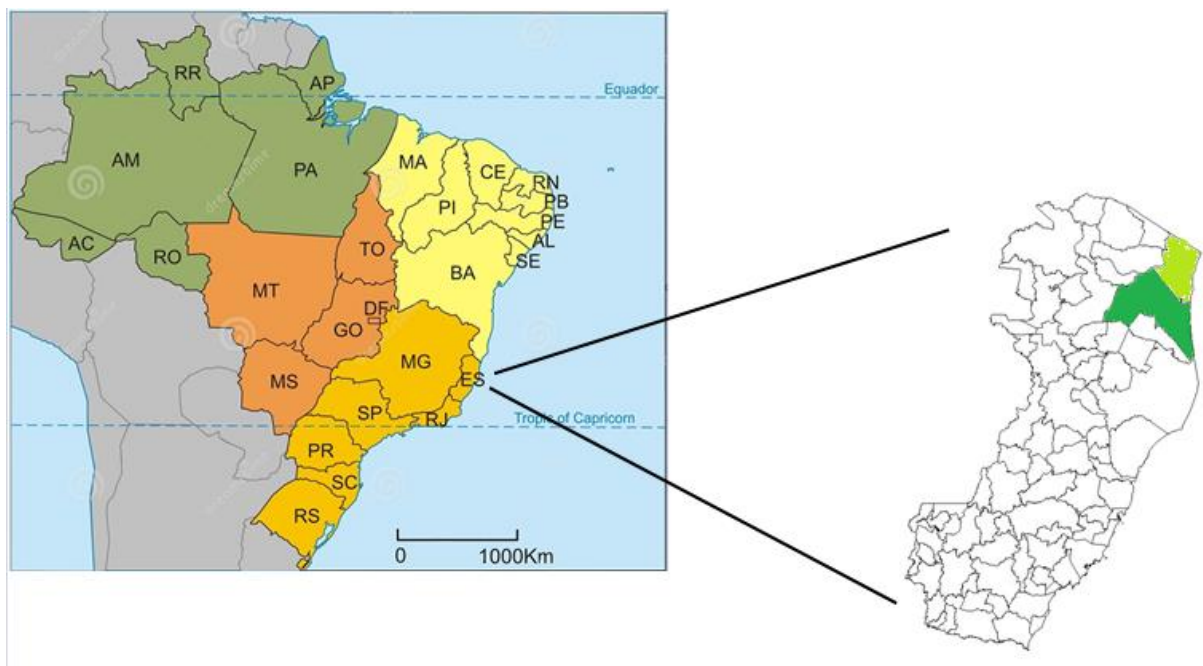


Figura 10: Mapa do Brasil destacando o Estado do Espírito Santo e, em verde escuro e claro, os Municípios de São Mateus e Conceição da Barra respectivamente, de onde foram obtidas as amostras clínicas de crianças de comunidades quilombolas.

Foram utilizadas ainda as cepas protótipos EAEC 042 e EAEC 17-2, *E. coli* HB101 e DH5 α , gentilmente fornecidas pela Dra. Isabel Christina Affonso Scaletsky (Universidade Federal de São Paulo). A cepa de referência *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle em teste de susceptibilidade para cada antimicrobiano.

De 35 amostras iniciais de EAEC produtoras de biofilme, foram selecionadas 20 que apresentavam sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no presente estudo, previamente determinados pelo método de difusão do disco (SILVA, 2014; Anexo 1) e confirmados no presente estudo por meio do método de diluição em ágar.

4.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI)

Foram determinadas as CMI pelo método de diluição em ágar para 35 amostras de EAEC produtoras de biofilme, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) de nove antimicrobianos pertencentes a oito classes, conforme classificação por MAGIORAKOS et al. (2012), (Quadro 3, Fluxograma 1). Além de confirmar resultado de susceptibilidade obtido pelo método de difusão do disco, este procedimento foi realizado para selecionar as cepas que fossem sensíveis aos mesmos antimicrobianos a serem analisados e com a finalidade de obter as concentrações de antimicrobianos a serem utilizadas para determinação da MBIC.

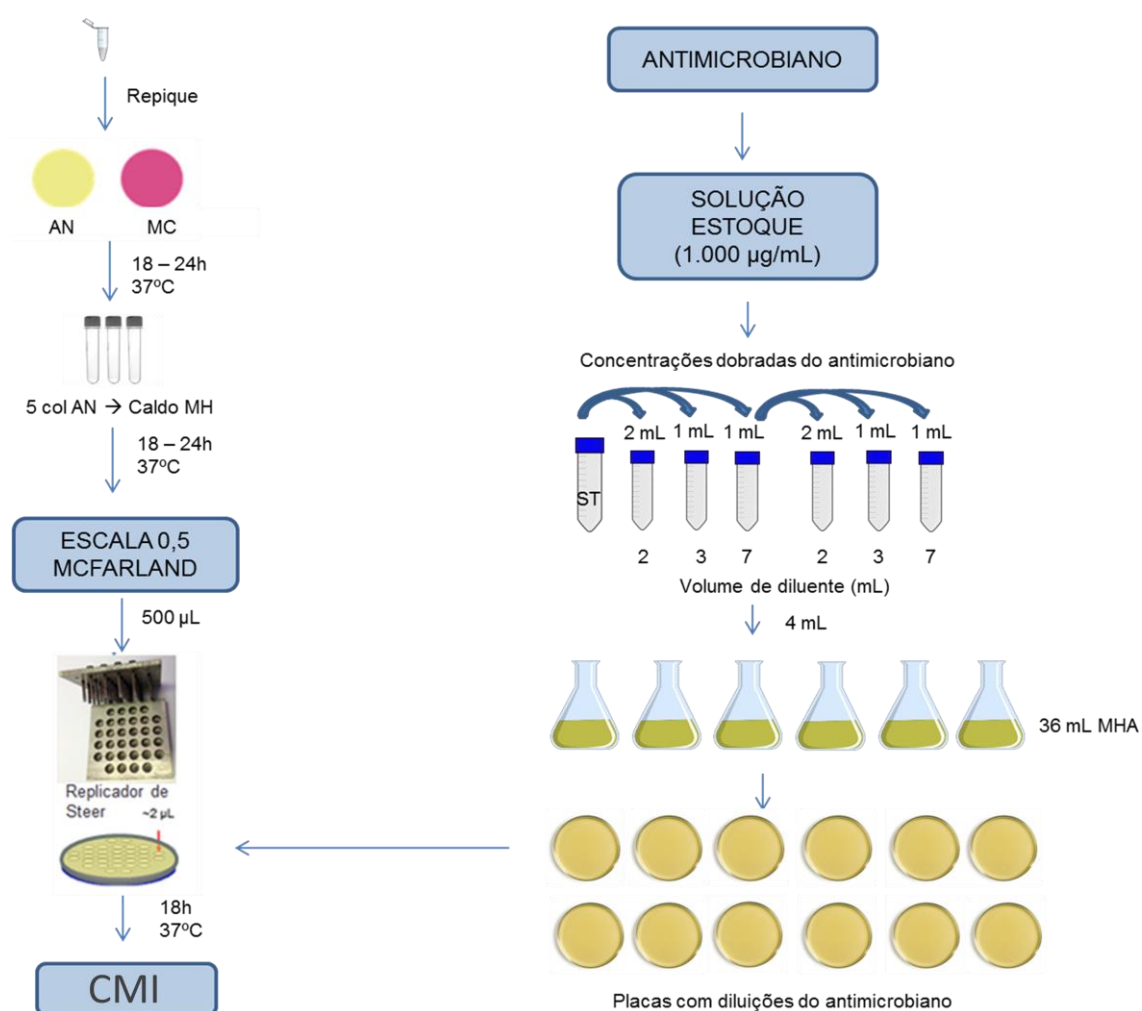
Quadro 3 - Classes e respectivos antimicrobianos utilizados com faixas de concentração testadas na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima inibitória em biofilme (MBIC).

Classe de antimicrobianos	Agentes antimicrobianos	Faixa de concentração (µg /mL)	Solvente/diluyente
Aminoglicosídeo	Tobramicina	8 – 0,25	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
Cefalosporinas 3ª geração	Cefotaxima	2 – 0,03	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
	Ceftriaxona	2 – 0,03	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
Cefamicina	Cefoxitina	16 – 0,5	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
Fenicol	Cloranfenicol	64 – 0,5	Etanol 95%/ H ₂ O dest
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	0,50 – 0,007	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
Tetraciclina	Tetraciclina	128– 1	H ₂ O dest/ H ₂ O dest
Penicilina	Ampicilina	16 – 0,5	TP* pH8 / TP* pH6
Inibidor da síntese do folato	Sulfa-trimetoprim	76/4 - 0,3/0,015	H ₂ O dest/ H ₂ O dest

*TP= tampão fosfato

Foram preparadas soluções estoque dos antimicrobianos em solvente correspondente (Quadro 3), na concentração de 1.000 µg/mL para todos os antimicrobianos, com exceção de tetraciclina, que foi de 10.000 µg/mL. Placas de ágar Mueller Hinton foram preparadas com diluições (1:2) de cada antimicrobiano (Sigma-Aldrich®) nas faixas de concentrações apresentadas no Quadro 3, segundo instruções do CLSI (2016), a partir de solução de trabalho preparada de uma

solução estoque conforme a seguinte fórmula: $V \text{ (mL)} = 10 \text{ (mg)} \times \text{potência } (\mu\text{g/mL}) / \text{concentração solução estoque } (\mu\text{g/mL})$. As amostras de EAEC foram repicadas em ágar MacConkey (MC) e Agar Nutriente (AN) e incubadas a 37°C por 18-24 horas, e aproximadamente cinco colônias do AN foram suspensas em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas 37°C por 18-24 horas. Após a incubação foi realizado o ajuste da concentração bacteriana conforme escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em solução salina e 500 μL foram distribuídos em poços do Replicador de Steer. Aproximadamente 2 μL foram inoculados em placas de Agar Mueller Hinton (MHA) contendo concentrações dobradas do antimicrobiano, em duplicata, e incubadas a 37°C por 18 horas (Fluxograma 1). Foi utilizada a cepa de referência *E.coli* ATCC 25922 como controle e a leitura da CMI, conforme indicado pelo CLSI (2016).



Fluxograma 1 - Protocolo de determinação da concentração mínima inibitória (CMI). À esquerda, esquema para determinação da CMI e à direita, esquema para preparo das placas de MH com antimicrobianos. AN: ágar nutriente; MC: ágar MacConkey; MH: Mueller Hinton; ST: solução de trabalho; MHA: Mueller Hinton Agar.

4.3 ESTABELECIMENTO E CALIBRAÇÃO DO SISTEMA *PEG-LID*

A formação de biofilme por EAEC em sistema *peg-lid* (Thermo Scientific™ Nalgene™) para determinação da MBIC foi realizada conforme previamente estabelecido (HARRISON et al., 2010), com modificações. O sistema foi inicialmente calibrado quanto ao inóculo usado e verificação da homogeneidade do sistema e apresentado a seguir. Condições ótimas para formação do biofilme pelas amostras de EAEC foram previamente estabelecidas em nosso laboratório (MONFARDINI, 2012).

As etapas referentes ao inóculo e ao controle da homogeneidade de formação de biofilme em sistema *peg-lid* foram realizadas com as seguintes cepas de *E. coli*: EAEC 042 (protótipo de EAEC formadora de biofilme), *E. coli* HB101 (não formadora de biofilme) e EAEC 146A.

4.3.1 Inóculo bacteriano

A calibração do inóculo bacteriano consiste em verificar o número de células ou unidades formadoras de colônia (UFC) do inóculo inicial compatível com o esperado. Para isso, o inóculo bacteriano foi preparado de amostras de EAEC produtoras de biofilme (EAEC 042 e 146A) e de *E. coli* não produtora de biofilme (HB101) repicadas dos estoques para ágar MC e AN e incubadas por 18-24 horas a 37°C. Após a incubação, cinco colônias foram suspensas no caldo LB e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A suspensão bacteriana foi ajustada para concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, conforme escala 0,5 McFarland e por leitura da DO₆₅₀ (Abs= 0,08-0,1) (Fluxograma 2A).

Para controle de UFC do inóculo inicial, foram adicionados 180 µL de salina em uma microplaca (Linha A – F), em quadruplicata, e posteriormente foram adicionados 20 µL da suspensão ajustada das cepas controle na primeira linha da microplaca (Linha A) e sequencialmente foram realizadas diluições de 1:10-1:10⁶ em quadruplicata, sendo transferidos 20 µL do poço da Linha A, para o poço da Linha B e assim sucessivamente até o poço da Linha F. Dez microlitros de cada diluição (3×10^6 - 3×10^0 UFC/mL) foram repicados para AN seguido por incubação a 37°C por 18-24 hs, conforme descrito previamente (HARRISON et al., 2004) (Fluxograma 2B). A

contagem das colônias foi realizada quando individualizadas no *spot* e comparada com o número de colônias esperado para a diluição.

4.3.2 Verificação da homogeneidade de formação de biofilme entre os *pegs* da microplaca

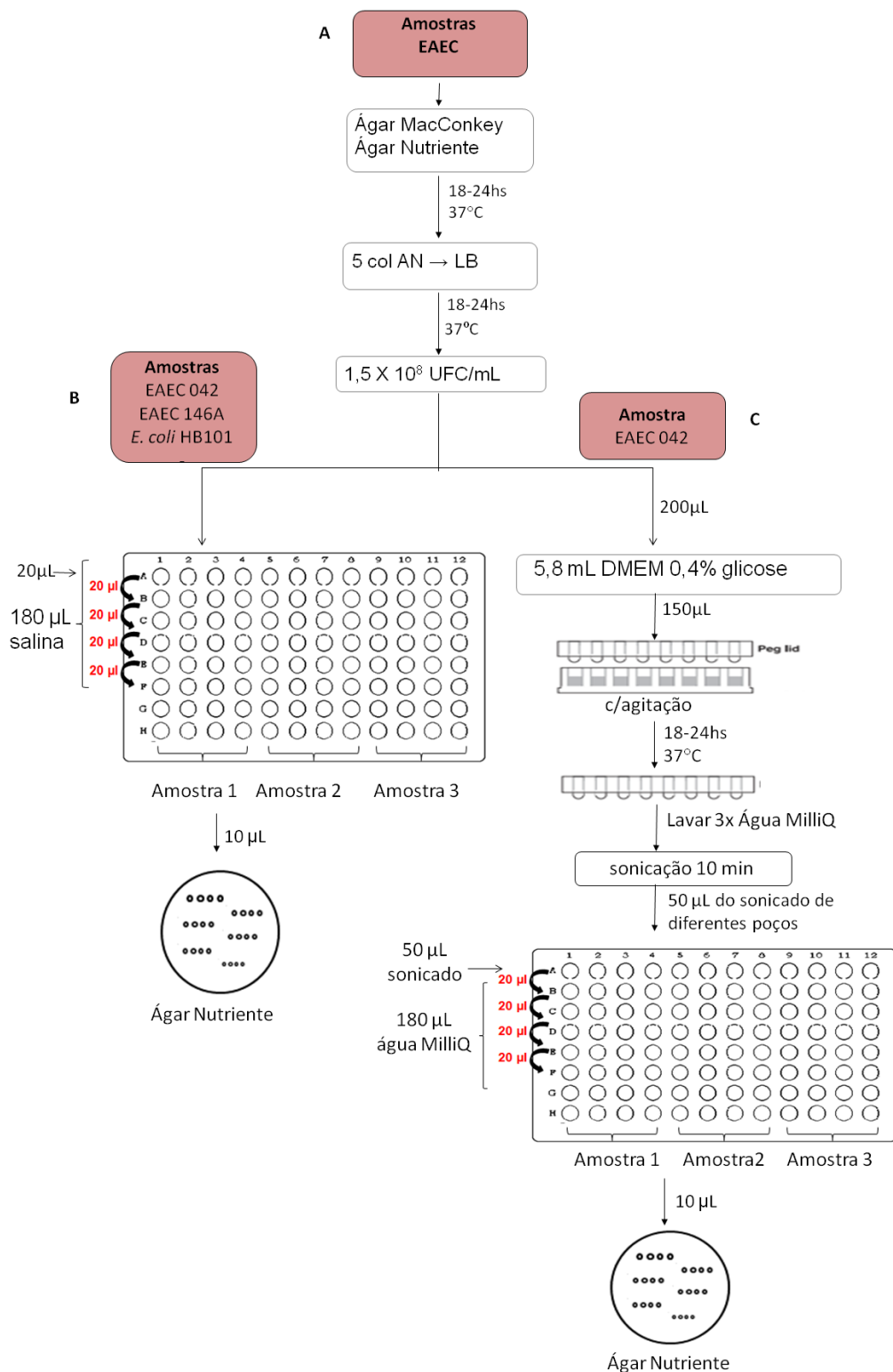
A calibração da formação de biofilme entre os *pegs* consiste em verificar se um mesmo número de UFC seria recuperado entre *pegs* de diferentes posições da microplaca, onde o biofilme seria formado. Para tal, a homogeneidade do biofilme formado entre os *pegs* foi analisada conforme descrito por Harrison et al. (2010), com a cepa protótipo EAEC 042, e descrito a seguir (Fluxograma 2C).

Biofilme de EAEC foi formado em *peg-lid* da suspensão de EAEC ajustada conforme descrito no item anterior, a partir de 200 µL que foram adicionados em 5,8 mL de Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Cultilab) com 0,4% de glicose, conforme previamente padronizado no LabViG (SHEIKH et al., 2001; MONFARDINI, 2012). Desta suspensão, 150 µL ($2,25 \times 10^7$ UFC/mL) foram adicionados a cada poço da microplaca de poliestireno (Thermo Scientific™ Nalgene™), exceto no controle de esterilidade, e tampada com o *peg-lid*. As microplacas foram seladas com filmito e incubadas em *Shaker-Incubator* (Agimaxx) a 37°C, com 110 rotações por minuto (rpm), por 18-24 horas para formação do biofilme.

Após incubação, o *peg-lid* foi lavado três vezes em água Milli-Q® e o biofilme foi recuperado em uma microplaca estéril contendo 150 µL de caldo LB por sonicação por 10 minutos a 40 kHz (sonicadora UNIQUE).

A fim de verificar se os *pegs* apresentavam quantidade equitativa de biofilme (homogeneidade de formação), foi montada uma microplaca estéril e adicionados 180 µL de água Milli-Q® estéril em cinco linhas (B-F, Fluxograma 2C) em quadruplicata. Foram então adicionados 50 µL do biofilme recuperado em caldo LB correspondente aos *pegs* de diferentes posições da microplaca (A1, A5, A8, A12, B3, C10, D1, D5, D8, E12, F3, F6, F9, H1, H5, H8 e H12), em quatro primeiros poços da primeira linha da microplaca (Linha A), dos quais foram realizadas diluições sucessivas (B-F) a partir de 20 µL do primeiro poço (1:10-1:100.000) para poço na posição B e assim sucessivamente, conferindo 3×10^6 – 3 UFC/mL nos respectivos

poços. Foram inoculados então 10 µL de cada diluição em uma placa de AN e incubada a 37°C por 18-24 horas, esperando-se o crescimento de $1,5 \times 10^6$ – 1,5 UFC/mL respectivamente em cada *spot* realizado na placa de AN (Fluxograma 2C).



Fluxograma 2 - Estabelecimento e calibração do sistema *peg-lid*, demonstrando em (A) preparo do inóculo, (B) procedimento para controle do inóculo, (C) verificação da homogeneidade de formação de biofilme em todos os poços. AN: Ágar Nutriente; LB: Luria Bertani; DMEM: Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco.

4.4 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

A fim de determinar o tempo de maturação do biofilme de EAEC, uma curva de crescimento do biofilme foi realizada para a cepa protótipo EAEC 042 e para amostras fortes formadoras de biofilme (Q255D e Q340A) e fracas formadoras de biofilme (89A e 110C). As amostras bacterianas foram repicadas dos estoques para ágar MC e AN e incubadas por 18-24 horas a 37°C. Após a incubação, cinco colônias foram suspensas no caldo LB e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A suspensão bacteriana foi ajustada para concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, conforme escala 0,5 McFarland. Após o ajuste da escala, seguiu-se o protocolo de formação do biofilme em sistema *peg-lid*, descrito no item 4.3.2. Foram montadas nove microplacas com as respectivas bactérias, tampadas com o *peg-lid* e incubadas nos seguintes tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Após cada tempo, o *peg-lid* foi retirado da microplaca, lavado conforme anteriormente descrito, e adicionado a uma nova microplaca contendo caldo LB para recuperar o biofilme formado por 10 minutos de sonicação. Após o biofilme recuperado, foi realizada a leitura da DO₆₀₀ e plotado um gráfico para análise da formação do biofilme.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME EM POÇO DE MICROPLACA E PEG-LID

Foi realizado ensaio para determinação da biomassa e matriz extracelular para as 20 amostras analisadas e classificação de cada amostra, conforme intensidade de formação de biofilme, em forte ou fraca formadora. O ensaio foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços e no *peg-lid* correspondente de acordo com protocolo escrito por Sheikh et al. (2001), com algumas modificações. As amostras de EAEC foram repicadas para o ágar MC e AN e incubadas a 37°C. Após o crescimento bacteriano, cinco colônias foram adicionadas no caldo LB e incubadas a 37°C por 18-24 horas e posteriormente a suspensão bacteriana foi ajustada para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL com auxílio da escala 0,5 Mac Farland. Dois microlitros desta suspensão bacteriana foram adicionados em duas microplacas de 96 poços com *peg-lid*, de igual configuração (amostras bacterianas), contendo DMEM

suplementado com 0,4% glicose. A seguir as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

A primeira microplaca e o *peg-lid* correspondente foram utilizados para determinação do biofilme (biomassa de células bacterianas e matriz extracelular). Após a formação do biofilme, a microplaca e o *peg-lid* foram lavados três vezes com tampão PBS 0,2 M pH 7,2 e foram adicionados 100 µL de metanol 99% por 15 minutos. Após a fixação, o sobrenadante foi retirado e a microplaca e o *peg-lid* foram submetidos à secagem por 5 minutos e foram adicionados: (i) 100 µL de cristal violeta 0,3% aos poços da microplaca com biofilme formado e coberta com tampa “comum” e (ii) 150 µL de cristal violeta 0,3% em microplaca nova tampada com o *peg-lid* contendo biofilme formado. As microplacas foram incubadas por 20 minutos, o corante foi descartado e a microplaca e o *peg-lid*, ambos com biofilme, foram lavados uma vez com água, e solubilizado o corante com 150 µL de ácido acético 33% por 5 minutos. Foram transferidos 100 µL para uma nova microplaca e foi realizada a leitura da DO em leitor de microplacas EZ READ® 400 Microplate Reader, BIOCHROM® no comprimento de onda de 590_{nm} (DO₅₉₀).

A segunda microplaca e o *peg-lid*, utilizados para determinação da matriz de EPS, foram lavados três vezes com PBS e adicionados a cada poço 200 µL do corante safranina 0,1% e após 5 minutos, o corante foi descartado e os poços e os *pegs* foram lavados uma vez com PBS. O corante foi solubilizado com 200 µL de ácido acético 30% por 5 minutos. Após a solubilização, foram transferidos 100 µL para outra microplaca e foi realizada a leitura da DO no comprimento de onda de 530_{nm} (DO₅₃₀).

Todos os ensaios foram acompanhados pela cepa controle *Escherichia coli* ATCC 25922 e dois controles negativos (*E. coli* HB101 e DH5α).

A discriminação em amostras fortes e fracas formadoras de biofilme foi determinada tanto para biofilme corado com cristal violeta quanto com safranina, conforme previamente descrito, sendo forte quando a DO era superior a duas vezes a média da DO dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão (DP) dos controles negativos ($>2\bar{x}DO_{CN}+3XDP_{CN}$) e fraca, se $<2\bar{x}DO_{CN}+3XDP_{CN}$ (STEPANOVIC et al., 2007).

4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DE BIOFILME (MBIC)

O protocolo contendo as etapas para determinação da MBIC pode ser observado no Fluxograma 3. A MBIC foi inicialmente investigada para a cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 e das cepas protótipos EAEC 042 e EAEC 17-2, até então não descrito na literatura, e para as 20 amostras selecionadas de EAEC. A MBIC para a *E. coli* ATCC 25922 foi descrita previamente para os antimicrobianos ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina e tobramicina (CERI et al., 1999).

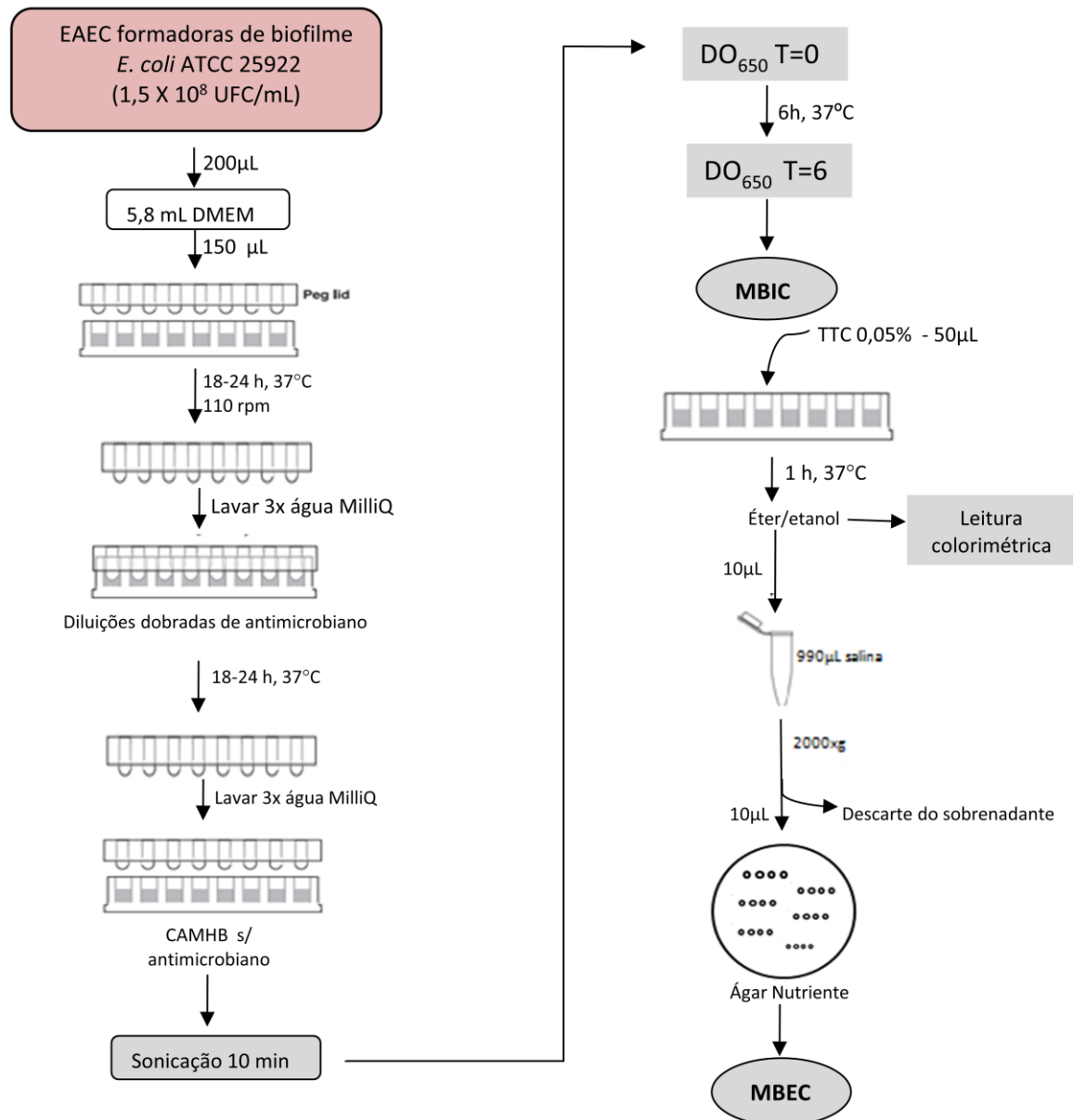
4.6.1 Formação de biofilme em sistema *peg-lid*

A formação de biofilme das 20 amostras sensíveis de EAEC em sistema *peg-lid* foi realizada conforme previamente estabelecido (HARRISON et al., 2010) e descrito no item anterior. Em cada microplaca foram testadas três amostras mais a amostra controle *E. coli* ATCC 25922, todas em triplicata para cada concentração de antimicrobiano testado, e o mesmo procedimento foi repetido duas a três vezes em dias diferentes. O controle de esterilidade era constituído por DMEM com 0,4% de glicose. A microplaca foi então tampada com o *peg-lid* e incubada à 37°C por 24 horas sob agitação a 110 rpm (*Shaker-Incubator* Agimaxx) para formação do biofilme. Após a incubação, o *peg-lid* foi lavado três vezes com água Milli-Q® estéril para eliminação das células não aderidas aos *pegs*, permanecendo somente o biofilme aderido. O *peg-lid* com biofilme formado foi utilizado para tampar a microplaca com os antimicrobianos diluídos, cuja montagem será descrita a seguir.

4.6.2 Microplaca de antimicrobianos

Foi montada uma microplaca de poliestireno contendo diluições seriadas em triplicata do antimicrobiano a ser testado em CAMHB, partindo-se de uma concentração menor do que a CMI determinada para as mesmas amostras em forma plantônica (Item 4.2). O *peg-lid* lavado contendo o biofilme formado (item 4.3.2) foi adicionado nesta microplaca contendo antimicrobiano (os mesmos referidos no item 4.2) e incubado a 37°C por 18-24 horas sem agitação (Fluxograma 3). Além do controle de esterilidade anteriormente descrito (item 4.3.2), foi incluído o controle de crescimento (sem adição do antimicrobiano). Após a incubação, o *peg-lid* foi lavado por três vezes em água Milli-Q® para remoção do antimicrobiano, transferido para

uma nova microplaca isenta de antimicrobiano com 150 μ L de CAMHB e submetido à sonicação por 10 minutos a 40 kHz (sonicadora UNIQUE) para recuperação do biofilme formado (Fluxograma 3).



Fluxograma 3 - Protocolo de formação de biofilme com a determinação da concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) e a determinação da concentração mínima de erradicação de biofilme (MBEC), conforme previamente estabelecido por HARRISON et al., 2010. DO₆₅₀= leitura densidade óptica a 650 nm; T=0, tempo=zero; T=6, tempo= 6 h.

4.6.3 Concentração Mínima Inibitória de Biofilme (MBIC)

4.6.3.1 MBIC em biofilme de 24 horas

A MBIC foi determinada para biofilme de 24 horas de formação para todas as amostras selecionadas, conforme previamente estabelecido (MOSKOVITZ et al., 2004) e descrito a seguir. Da microplaca contendo o biofilme recuperado foram realizadas a leitura da DO_{650} no tempo zero ($DO_{650} t=0$ h) e após incubação por seis horas ($DO_{650} t=6$ h) (Fluxograma 3). O experimento foi considerado válido se a média das DO_{650} dos poços de controle de crescimento (CC) para cada amostra em triplicata $DO_{650} (\bar{x}_{t=6 \text{ hs}} - \bar{x}_{t=0 \text{ h}})$ era $\geq 0,05$. Por exemplo, se $DO_{650} \text{ CC } T_6 = 0,289$ e $DO_{650} \text{ CC } T_0 = 0,068$ então, $DO_{650} \text{ CC } T_6 - T_0 = 0,221$, ou seja $\geq 0,05$, logo, o experimento foi válido. A MBIC corresponde à menor concentração do antimicrobiano que resulta em uma diferença $\leq 10\%$ desse valor. Por exemplo, 10% do $CC DO_{650} T_6 - T_0 = 0,221 \times 0,10 = 0,0221$, logo se deve verificar entre as $DO_{650} T_6 - T_0$ da amostra analisada, qual foi a primeira menor concentração abaixo desse valor (0,0221). Considerando as concentrações de antimicrobianos utilizadas (8, 4, 2 e 1 $\mu\text{g/mL}$) e as $DO_{650} T_6 - T_0$ respectivas de 0,008; 0,013; 0,118 e 0,16, a primeira menor concentração abaixo do valor de 0,0221 foi de 4, esta é portanto a MBIC para esse caso.

Os biofilmes foram categorizados como sensíveis, resistentes ou de resistência intermediária aos antimicrobianos testados de acordo com os valores respectivos estabelecidos pelo CLSI (2016) para amostras plantônicas.

4.6.3.2 MBIC em biofilme de 48 e 72 horas

Foram selecionadas amostras de EAEC categorizadas pela MBIC como sensíveis ou que passaram a resistência intermediária em biofilme de 24 horas, para análise da MBIC de biofilme de 48 e 72 horas, paralelamente ao tempo de 24 horas. Três microplacas idênticas foram preparadas contendo então as amostras selecionadas de EAEC e o controle ATCC 25922, e incubadas por 24, 48 e 72 horas em condições previamente descritas.

Para manter a atividade antimicrobiana no período de 48 e 72 horas, o *peg-lid* com biofilme incubado com antimicrobiano por 24 horas, foi transferido para nova

microplaca com diluições dobradas de antimicrobianos. Para garantir a concentração do antimicrobiano durante todo o experimento, todas as microplacas foram preparadas no mesmo dia e armazenadas sob-refrigeração, ao abrigo da luz e com completa vedação até o uso. A leitura foi realizada conforme anteriormente descrito.

4.6.4 Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC)

A MBEC foi determinada para 13 amostras de EAEC formadoras de biofilme, frente aos antimicrobianos: cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, tobramicina, tetraciclina e ciprofloxacina. Após a leitura da DO_{650} $t=6$ h foram adicionados aos poços da microplaca 50 μ L do corante indicador de células viáveis, cloreto de trifênil tetrazólio 0,05% (TTC - Sigma Aldrich) (BROWN et al., 2013) incubado por 1 hora a 37°C seguido pela adição de 50 μ L de álcool/éter para solubilização do TTC (Fluxograma 3). A leitura foi realizada por inspeção visual do desenvolvimento da cor rósea. Dez microlitros do poço da menor concentração de antimicrobiano que apresentou coloração rósea e de todas as demais incolores foram acrescentados a 990 μ L de salina em microtubos para diluição do antimicrobiano a níveis subinibitórios, centrifugado a 2000xg e 10 μ L do sedimento ressuspenso foram repicados em ágar Nutriente (Fluxograma 3). A MBEC foi determinada pela menor concentração de antimicrobiano em que não ocorreu crescimento bacteriano.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram armazenados no programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 20.0. A análise estatística para verificar se existe diferença entre a CMI e a MBIC das amostras para cada antimicrobiano, para verificar se existe correlação entre biofilmes de fortes e fracas formadoras com aumento da MBIC e para verificar se existe diferença entre o biofilme formado no poço da microplaca e o *peg-lid* foi realizada usando o teste T de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (intervalo de confiança de 95%).

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA

A CMI foi determinada pelo método de diluição em ágar para as 35 amostras de EAEC formadoras de biofilme (Tabela 1). A frequência de amostras sensíveis pela CMI está de acordo com o resultado do teste de difusão do disco (Tabela 1). Destas, 20 amostras que foram sensíveis aos mesmos antimicrobianos (ampicilina, cefoxitina, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, tobramicina, tetraciclina e cloranfenicol) e 19 ao sulfametoxazol/trimetoprim foram subsequentemente analisadas neste estudo.

Tabela 1 - Frequência de susceptibilidade aos antimicrobianos, mediana da porcentagem de sensibilidade dos 21 estudos (amostras plantônicas), intervalo de concentração mínima inibitória das amostras de EAEC formadoras de biofilme (n=35), CMI₅₀ e CMI₉₀ determinada pelo método de diluição em ágar.

Antimicrobianos	Med % S (21 estudos)	Amostras sensíveis n (%)	Intervalo de CMI (µg/mL)	CMI ₅₀ (µg/mL)	CMI ₉₀ (µg/mL)
Ampicilina	19	23 (65,7)	2 – 512	8	>512
Cefoxitina	93,9	35 (100)	2 – 8	4	8
Cefotaxima	57,5	35 (100)	0,03 – 0,125	0,06	0,06
Ceftriaxona	66,8	35 (100)	0,03 – >2	0,06	0,06
Ciprofloxacina	98,9	35 (100)	0,0075 – 0,25	0,015	0,015
Tobramicina	100	35 (100)	0,25 – 1	0,5	0,5
Tetraciclina	30	23 (65,7)	2 – 128	4	>128
Cloranfenicol	61	27 (77,1)	2 – 32	4	32
Sulfa/Trimet	27,6	32 (91,4)	0,6/0,03 – 608/32	2,37/0,125	19/1

5.2 CALIBRAÇÃO DO SISTEMA PEG-LID

No procedimento para controle do inóculo bacteriano, com repique de concentrações que variaram de $1,5 \times 10^7$ - $1,5 \times 10^2$ UFC/mL da suspensão ajustada, observamos um crescimento da última diluição, que correspondeu à contagem que variou entre 1,5-15 UFC (Figura 11), compatível com número esperado para a diluição realizada.

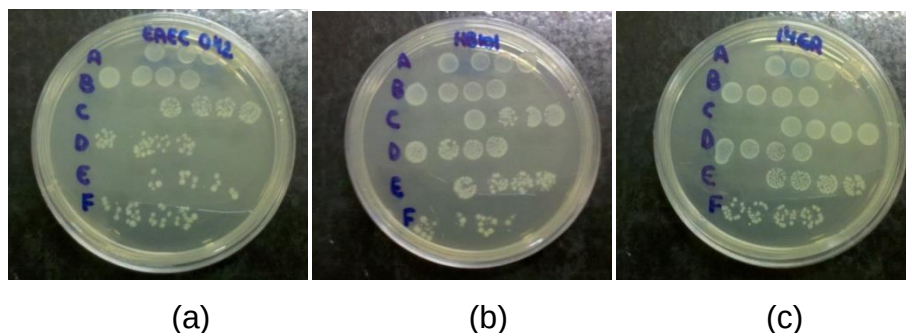


Figura 11 - Controle do inóculo bacteriano demonstrando crescimento a partir de 10 μL de suspensão ajustada em placas de ágar Nutriente das diluições de $1,5 \times 10^7$ (A) a $1,5 \times 10^2$ (F) UFC/mL, demonstrando em F crescimento de colônias individualizadas. Em (a) cepa protótipo EAEC 042, (b) cepa HB101 e (c) isolado clínico EAEC 146A.

Na verificação da homogeneidade de formação do biofilme entre os *pegs* da microplaca, verificamos contagem bacteriana similar entre eles, uma média de 3 – 6 UFC/spot em AN a partir do repique de diluições sequenciais de posições diferentes para a amostra bacteriana testada, oriunda de biofilme recuperado por sonicação (Figura 12).

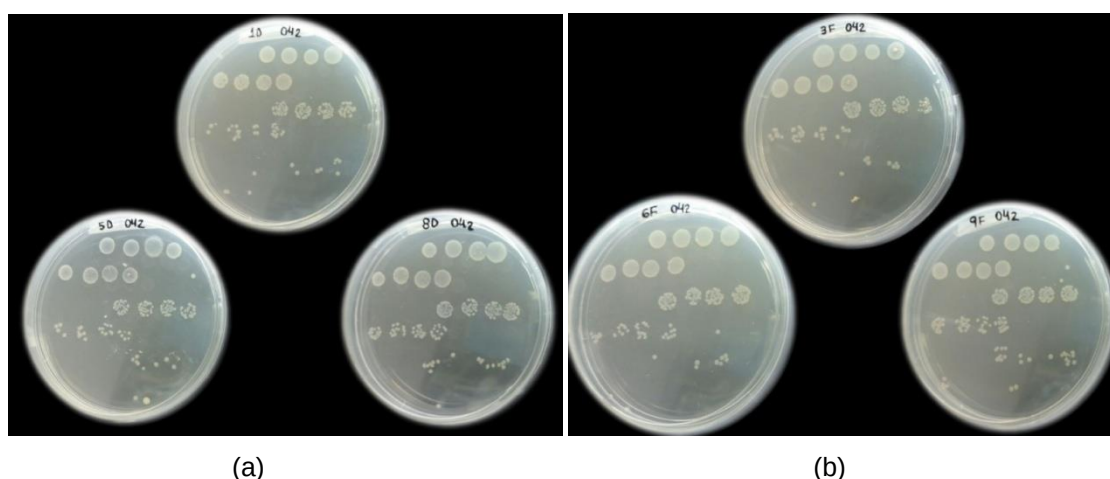


Figura 12 - Controle da homogeneidade na formação do biofilme recuperado dos *pegs*, representado pelo repique em placas de ágar Nutriente de diluição sequencial correspondente a replicatas das diluições sucessivas referentes à (a) EAEC 042 linha D de diferentes colunas e (b) EAEC 042 linha F de diferentes colunas.

5.3 CINÉTICA DE FORMAÇÃO DO BIOFILME

Observamos que até a 12^a hora representa a fase exponencial do crescimento do biofilme e a partir da 12^a hora, observamos uma estabilização da formação do biofilme, quando testadas a cepa protótipo EAEC 042, amostras fortes (Q255D e

Q340A) e fracas formadoras de biofilme (89A e 110C). Um biofilme de 24 horas de incubação foi considerado como biofilme maduro (Gráfico 1).

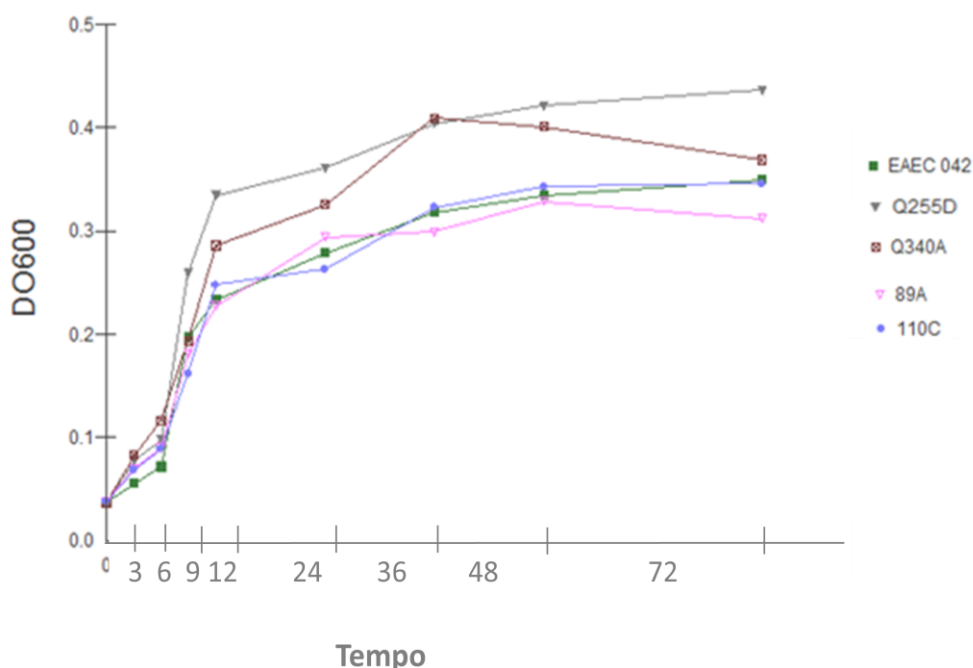


Gráfico 1 - Cinética de formação do biofilme nos tempos de crescimento, em horas, para a cepa referência EAEC 042, e amostras de EAEC fortes (Q255D e Q340A) e fracas formadoras de biofilme (89A e 110C).

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTENSIDADE DE FORMAÇÃO DO BIOFILME EM POÇO DE MICROPLACA E *PEG-LID*

A intensidade de formação do biofilme em forte e fraco foi determinada pela medida da DO, aplicando-se a fórmula descrita por Stepanovic et al. (2007), após coloração com cristal violeta e safranina (Tabela 2, Gráfico 2). A leitura da média da DO₅₉₀ e DO₅₃₀, mediana e média geométrica foram sempre maiores no biofilme do poço da microplaca do que do *peg-lid* (Tabela 2), consequentemente também os pontos de corte para caracterizar o biofilme como forte ou fraco, tanto para o cristal violeta quanto para a safranina (Quadro 4). Oito amostras foram caracterizadas como fortes e 12, como fracas formadoras de biofilme (Tabela 2, Gráfico 2). A média geométrica das DO das amostras fortes e fracas formadoras de biofilme para o cristal violeta foram respectivamente 0,45 e 0,20 quando em microplaca e de 0,36 e 0,14 quando em *peg-lid*. A média geométrica das DO das amostras fortes e fracas formadoras de

biofilme para safranina foram respectivamente 0,68 e 0,25 quando em microplaca e de 0,53 e 0,19 quando em *peg-lid*.

Tabela 2 - Média da densidade ótica em cristal violeta e safranina em poço de microplaca e em *peg-lid* para caracterização em forte e fraca formadoras de biofilme obtidas em poços e *pegs*.

Cepas/ amostras	Cristal Violeta		Safranina	
	poço	<i>peg-lid</i>	poço	<i>peg-lid</i>
ATCC25922	0,406	0,222	0,483	0,254
HB101	0,089	0,071	0,114	0,084
DH5α	0,098	0,069	0,115	0,087
6A	0,216	0,137	0,259	0,184
39B	0,446	0,307	0,546	0,455
89A	0,187	0,133	0,247	0,177
110C	0,211	0,134	0,267	0,181
139D	0,197	0,132	0,233	0,189
Q015B	0,215	0,139	0,252	0,192
Q016B	0,213	0,132	0,248	0,186
Q028B	0,478	0,376	0,481	0,378
Q158A	0,216	0,133	0,258	0,185
Q165A	0,181	0,139	0,258	0,195
Q193A	0,185	0,137	0,248	0,174
Q226A	0,492	0,329	0,709	0,522
Q255D	0,414	0,361	0,689	0,559
Q266B	0,508	0,344	0,544	0,496
Q300A	0,217	0,138	0,246	0,187
Q340A	0,404	0,318	0,964	0,679
Q370A	0,449	0,333	0,928	0,656
Q391B	0,187	0,135	0,247	0,189
Q426A	0,401	0,319	0,746	0,589
Q488B	0,207	0,141	0,246	0,189

***Azul:** Cepa de referência classificada como forte formadora de biofilme

****Vermelho:** Amostras clínicas classificados como fortes formadoras de biofilme

Quadro 4 - Caracterização das amostras em forte e fraca formadora de biofilme, conforme fórmula proposta por Stepanovic et al. (2007)*

Corante	Poço da microplaca	<i>Peg-lid</i>
Cristal violeta	$>(2 \times \text{Média } DO_{CN} = 0,187) + (3 \times \text{Desvio padrão}_{CN} = 0,049851) = 0,236$ Forte se DO > 0,236	$>(2 \times \text{Média } DO_{CN} = 0,14) + (3 \times \text{Desvio padrão}_{CN} = 0,0381) = 0,178$ Forte se DO > 0,178
Safranina	$>(2 \times \text{Média } DO_{CN} = 0,229) + (3 \times \text{Desvio padrão}_{CN} = 0,054093) = 0,283$ Forte se DO > 0,283	$>(2 \times \text{Média } DO_{CN} = 0,171) + (3 \times \text{Desvio padrão}_{CN} = 0,05895) = 0,229$ Forte se DO > 0,229

* Forte formadora de biofilme, se $\bar{x}DO$ for $>2\bar{x}DO_{CN}+3\bar{x}DP_{CN}$

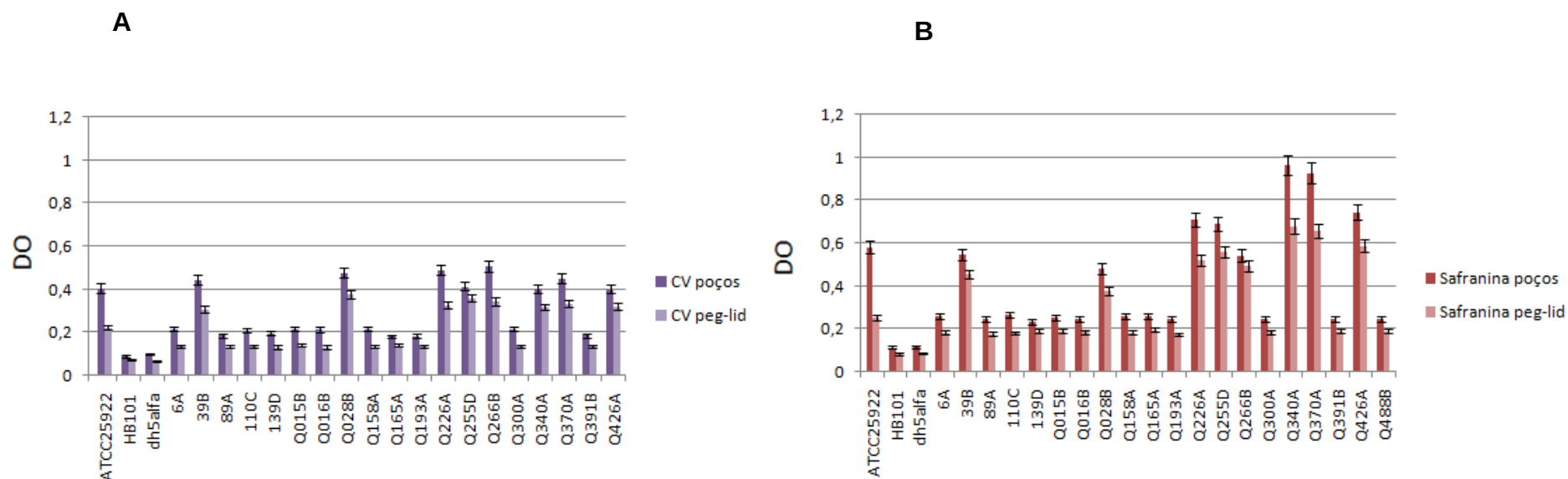


Gráfico 2 - Médias das densidades ópticas obtidas de biofilme formado em poços de microplacas e nos *peg-lids* após coloração com cristal violeta (A) em DO_{590nm} ou safranina (B) em DO_{530nm}, referente ao controle positivo (ATCC 25922), aos controles negativos (HB101 e DH5α) e às amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa.

5.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MBIC) E DE ERRADICAÇÃO DE BIOFILME (MBEC)

5.5.1 Concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC)

A determinação da MBIC, sempre realizada em triplicata e em pelo menos dois experimentos separados (Tabela 3), foi obtida inicialmente para as cepas protótipos EAEC 042, EAEC 17-2 e ATCC *E. coli* 25922 (Tabela 3). Todas elas se mantiveram sensíveis para ciprofloxacina e tobramicina e resistentes para os demais antimicrobianos testados, com um aumento da MBIC de quatro a até 253,34 vezes em relação à CMI (Tabela 3).

A MBIC foi realizada para 20 amostras selecionadas dentre as 35 iniciais, pois foram sensíveis a todos os mesmos antimicrobianos pela CMI, exceto para sulfametoxazol/trimetoprim, para o qual foram testadas 19 amostras (Gráfico 3, Tabela 3). O gráfico de dispersão das amostras analisadas por meio da DO₆₅₀ demonstra os biofilmes resistentes e com resistência intermediária acima do ponto de corte, sendo todos eles resistentes aos antimicrobianos ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim (Gráfico 3). Ao compararmos a MBIC com a CMI, observamos um incremento na concentração mínima de antimicrobiano de duas a até 133,3 vezes para biofilme de amostras que se mantiveram sensíveis e de duas a até 4.266,7 vezes para biofilme de amostras resistentes (Tabela 3).

Na Tabela 4 pode ser evidenciada a frequência da susceptibilidade de biofilme aos antimicrobianos baseada na MBIC e estratificada como sensível, de resistência intermediária e resistente. Os intervalos de MBIC, MBIC₅₀ e MBIC₉₀ obtidos para as amostras formadoras de biofilme estão demonstrados na Tabela 5. Observamos que mesmo para biofilme sensível, a MBIC₅₀ e MBIC₉₀ foram sempre maiores do que a CMI₅₀ e CMI₉₀ (Tabela 5). A relação MBIC/CMI foi significativa para todos os antimicrobianos ($p < 0,05$), exceto para ciprofloxacina (Tabela 5). A mediana e a média geométrica dos valores de MBIC de todos os antimicrobianos foram sempre maiores do que os de CMI (Tabela 6).

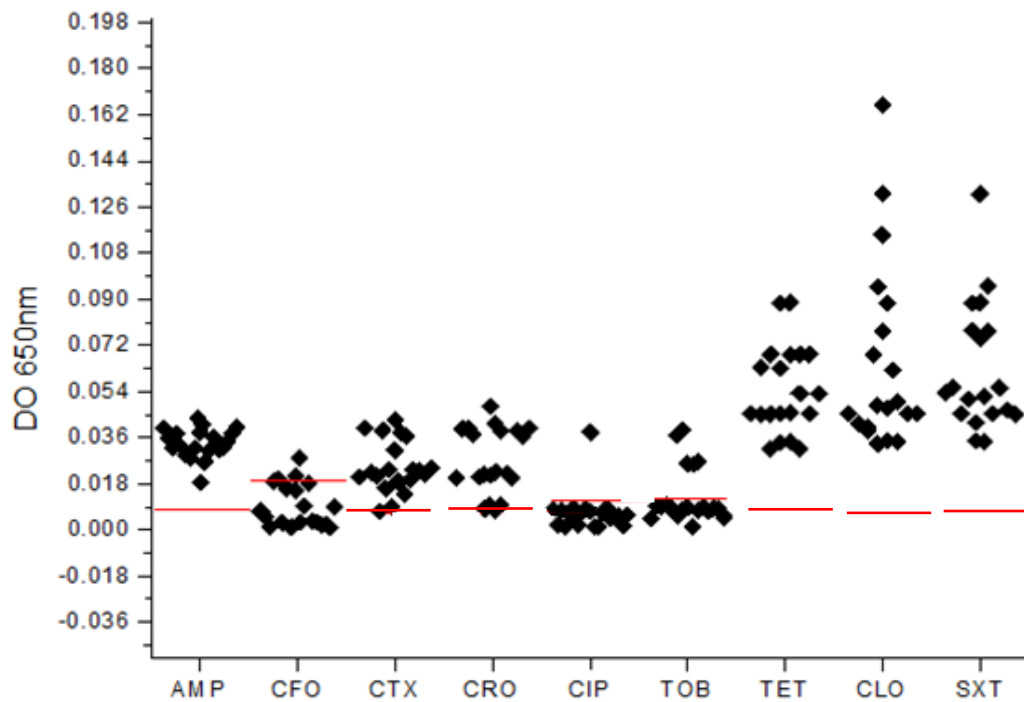


Gráfico 3 - Densidade óptica de amostras de EAEC frente aos antimicrobianos testados. Linha horizontal indica o ponto de corte (diferença de 10% da média da leitura DO_{650} do controle positivo no tempo 0 e 6h) para cada antimicrobiano testado, acima da qual os biofilmes são resistentes ou de resistência intermediária (AMP= 0,008, CFO= 0,0175, CTX= 0,0083, CRO= 0,0099, CIP= 0,0113, TOB= 0,0121, TET= 0,0116, CLO= 0,0114, SXT= 0,0115). AMP- ampicilina, CFO- cefoxitina, CTX- cefotaxima, CRO-ceftriaxona, CIP- ciprofloxacina, TOB- tobramicina, TET- tetraciclina, CLO- cloranfenicol, SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

Tabela 3 - Concentração Mínima Inibitória (CMI) ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Mínima Inibitória de Biofilme (MBIC) ($\mu\text{g/mL}$), incremento para amostras de EAEC e para os protótipos EAEC 042, EAEC 17-2 e cepa de *E. coli* ATCC 25922 para cada antimicrobiano em sistema *peg-lid*.

(Continua)

		ATCC 25922	EAEC 17-2	EAEC 042	6A	39B	89A	110C	139D	Q015B	Q016B	Q028B
AMP	CMI	2	2	2	2	2	4	8	8	8	8	2
	MBIC	32	32	32	32	64	16	64	16	128	128	32
	Incremento	16x	16x	16x	16x	32x	4x	8x	2x	16x	16x	16x
CFO	CMI	8	8	8	4	4	8	2	8	4	8	8
	MBIC	32	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
	Incremento	4x	4x	4x	2x	2x	1x	4x	1x	2x	1x	1x
CTX	CMI	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125	0,06	0,125
	MBIC	4	4	4	4	1,92	1,92	0,24	4	4	1,92	4
	Incremento	66,67	66,67	66,67	66,67	32	32	4	66,67	32	32	32
CRO	CMI	0,03	0,06	0,06	0,015	0,06	0,06	0,06	0,03	0,03	0,06	0,03
	MBIC	4	4	4	1	2	2	1	1	4	2	4
	Incremento	133,33x	133,33x	133,33x	66,7x	33,33x	33,33x	16,6x	33,3x	133,3x	33,33x	133,3x
CIP	CMI	0,0075	0,0075	0,0075	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
	MBIC	0,0075	0,0075	0,0075	0,06	0,03	0,03	0,0075	0,015	0,125	0,0075	0,0075
	Incremento	1x	1x	1x	4x	2x	2x	0,5x	1x	8,34x	0,5x	0,5x
TOB	CMI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	MBIC	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
	Incremento	4x	4x	4x	4x	4x	2x	2x	4x	4x	2x	4x
TET	CMI	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4
	MBIC	16	16	16	16	64	32	32	16	>128	>128	>128
	Incremento	8x	8x	8x	4x	16x	8x	8x	4x	32x	32x	32x
CLO	CMI	4	2	2	4	4	4	2	4	8	8	4
	MBIC	128	128	128	128	128	128	32	128	128	128	128
	Incremento	32x	64x	64x	32x	32x	32x	16x	32x	16x	16x	32x
SXT	CMI	0,6/0,03	0,6/0,03	0,6/0,03	2,37/0,125	2,37/0,125	0,6/0,03	2,37/0,125	2,37/0,125	19/1	19/1	2,37/0,125
	MBIC	152/8	152/8	152/8	152/8	152/8	76/4	152/8	152/8	76/4	76/4	152/8
	Incremento	253,34x	253,34x	253,34x	64x	64x	126,67x	64x	64x	4x	4x	64x

(Conclusão)

		Q158A	Q165A	Q193A	Q226A	Q255D	Q266B	Q300A	Q340A	Q370A	Q391B	Q426A	Q488B
AMP	CMI	4	8	2	2	4	2	2	4	2	8	2	4
	MBIC	64	128	128	64	32	64	128	32	64	32	64	32
	Incremento	16x	16x	64x	32x	8x	32x	64x	8x	32x	16x	32x	8x
CFO	CMI	8	8	8	4	8	8	4	4	8	2	4	2
	MBIC	16	8	16	8	16	16	8	8	8	8	8	8
	Incremento	2x	1x	2x	2x	2x	2x	2x	2x	1x	4x	2x	4x
CTX	CMI	0,06	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
	MBIC	1,92	4	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	4	1,92	1,92	1,92	0,12
	Incremento	32x	32x	32x	32x	32x	32x	32x	66,67x	32x	32x	32x	2x
CRO	CMI	0,03	0,03	0,03	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
	MBIC	4	2	2	2	2	64	8	64	32	32	32	2
	Incremento	133,3x	66,7x	66,7x	133,3x	133,33x	4266,7x	533,3x	4266,7x	2133,3x	2133,3x	2133,3x	133,3x
CIP	CMI	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,007	0,015	0,25	0,015	0,007	0,007	0,007
	MBIC	0,06	0,015	0,125	0,06	0,015	0,03	0,0075	> 16	0,06	0,125	0,06	0,0075
	Incremento	4x	1x	8,33x	4x	1x	4x	0,5x	64x	4x	16,67x	8x	1x
TOB	CMI	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
	MBIC	2	1	2	2	1	16	1	16	16	16	16	1
	Incremento	2x	2x	4x	4x	2x	32x	2x	64x	32x	32x	32x	2x
TET	CMI	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	4	4
	MBIC	> 128	64	> 128	> 128	64	> 128	64	32	> 128	> 128	> 128	> 128
	Incremento	32x	16x	32x	32x	16x	32x	16x	8x	32x	64x	32x	32x
CLO	CMI	4	4	4	4	4	4	4	8	4	8	8	4
	MBIC	128	128	128	128	128	128	32	64	128	128	128	128
	Incremento	32x	32x	32x	32x	32x	32x	8x	8x	32x	16x	16x	32x
SXT	CMI	19/1	19/1	1,19/0,06	2,37/0,125	1,19/0,06	1,19/0,06	*	1,19/0,06	1,19/0,06	2,37/0,125	1,19/0,06	1,19/0,06
	MBIC	152/8	152/8	76/4	152/8	152/8	152/8	*	152/8	152/8	152/8	152/8	152/8
	Incremento	8x	8x	64x	64x	128x	128x	*	128x	128x	64x	128x	128x

AMP: ampicilina; CFO: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacino; TOB: tobramicina; TET: tetraciclina; CLO: cloranfenicol; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim. *Amostra CMI resistente para SXT. **Negrito:** correspondem à resistência e resistência intermediária. G - Med Global: Média Geométrica global.

Tabela 4 - Frequência da susceptibilidade de biofilme das amostras de EAEC frente aos nove antimicrobianos analisados

Antimicrobiano	Sensível n (%)	Resistência Intermediária n (%)	Resistência n (%)
AMP	0	2 (10)	18 (90)
CFO	16 (80)	4 (20)	0
CTX	2 (10)	12 (60)	6 (30)
CRO	3 (15)	8 (40)	9 (45)
CIP	19 (95)	0	1 (5)
TET	0	0	20 (100)
TOB	15 (75)	0	5 (25)
CLO	0	0	20 (100)
SXT	0	0	19 (100)

AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO- cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

Tabela 5 - Intervalo de MBIC, relação MBIC/CMI, MBIC₅₀ e MBIC₉₀ para as 20 amostras de EAEC formadoras de biofilme em sistema *peg-lid* em relação com o intervalo de CMI, CMI₅₀ e CMI₉₀.

	Intervalo (µg/mL)				MBIC ₅₀	MBIC ₉₀	CMI ₅₀	CMI ₉₀
	MBIC	CMI	Incremento	*p _(MBIC/CMI)				
AMP	16 - 128	2 – 8	2 – 64x	<0,0001	64	128	2	8
CFO	8 -16	2 – 8	1 – 4x	<0,0001	8	8	4	8
CTX	0,12 - 4	0,06 – 0,125	2 – 66,67x	<0,0001	1,92	4	0,06	0,06
CRO	1 – 64	0,015 – 0,06	16,6 – 4.266,7x	0,0050	2	32	0,06	0,06
CIP	0,0075 - 16	0,0075 – 0,25	0,5 – 64x	0,1593	0,06	0,125	0,015	0,015
TOB	1 – 16	0,5 – 1	2 – 64x	<0,0001	2	16	0,5	0,5
TET	16 -128	2 – 4	4 – 64x	<0,0001	64	>128	4	4
CLO	32 - 128	2 – 8	8 – 64x	0,0047	128	128	4	4
SXT	76/4 – 152/8	0,6/0,03 – 19/1	4 – 253,34x	<0,0001	152/8	152/8	1,19/0,06	2,37/0,125

AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO- cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim. *Teste T de Student (p<0,05), exceto CIP.

Tabela 6 - Média geométrica e Mediana do valor da CMI e do valor da MBIC das amostras de EAEC formadoras de biofilme

Antimicrobiano	MED-CMI*	MED-MBIC*	GM-CMI**	GM-MBIC**
AMP	4	64	3,605	53,817
CFO	4	8	4,924	9,189
CTX	0,06	1,92	0,066	1,877
CRO	0,06	2	0,047	4,594
CIP	0,015	0,03	0,014	0,038
TOB	4	2	0,5	2,639
TET	0,5	128	3,863	73,516
CLO	4	128	4,594	107,634
SXT	2,37	152	2,651	158,743

*MED: mediana; **GM: média geométrica. Aumento significativo da MBIC em relação a CMI. Teste T de Student $p < 0,05$. AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO- cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

As oito amostras caracterizadas como fortes formadoras de biofilme foram resistentes a seis a até oito antimicrobianos, e as doze amostras fracas formadoras de biofilme, a quatro a até sete antimicrobianos (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição de biofilmes fracos e fortes por número de antimicrobianos para os quais apresentaram resistência ou resistência intermediária.

Biofilme	Nº Antimicrobianos R e R/I*	Nº Amostras (%)
Forte (n=8)	6	3 (37,5)
	7	3 (37,5)
	8	2 (25)
Fraco (n=12)	4	1 (8,34)
	5	3 (25)
	6	5 (41,6)
	7	3 (25)

*R- resistentes, R/I- resistência intermediária

Na análise da média geométrica e mediana dos valores de MBIC das amostras fortes e fracas formadoras de biofilme, observamos que não há diferença entre o valor de MBIC das amostras forte formadoras com as amostras fraca formadoras de biofilme, com exceção dos antimicrobianos ampicilina, ceftriaxona e tobramicina, que para estes casos houve um aumento do valor de MBIC em relação as amostras forte formadoras de biofilme (Tabela 8). Ao analisarmos o gráfico das médias das DO entre as amostras forte e fraca formadoras de biofilme para todos os antimicrobianos, observamos que a intensidade do biofilme não interferiu na susceptibilidade aos antimicrobianos ($p > 0,05$) (Gráfico 4). Contudo, a relação entre amostras fortes e fracas formadoras de biofilme foi significativa quando analisado isoladamente a DO em relação aos antimicrobianos ampicilina, ceftriaxona e tobramicina (Gráfico 5).

Tabela 8 - Média geométrica e Mediana do valor de MBIC das amostras Fortes e Fracas formadoras de biofilme

Antimicrobiano	GM-Fraca*	GM-Forte*	MED-Fraca**	MED-Forte**
AMP	50,80	58,68	48	64
CFO	8,48	10,37	8	8
CTX	1,74	2,10	1,92	1,92
CRO	2,93	9,51	2,5	17
CIP	0,02	0,09	0,015	0,06
TOB	1,68	5,19	1,5	9
TET	64	90,50	96	128
CLO	101,59	115,93	128	128
SXT	125,81	139,38	152	152

*GM: média geométrica; **MED: mediana. Aumento da MBIC entre amostras fortes e fracas formadoras de biofilme não significativo ($p>0,05$, Teste T de Student). AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO- ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO- cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

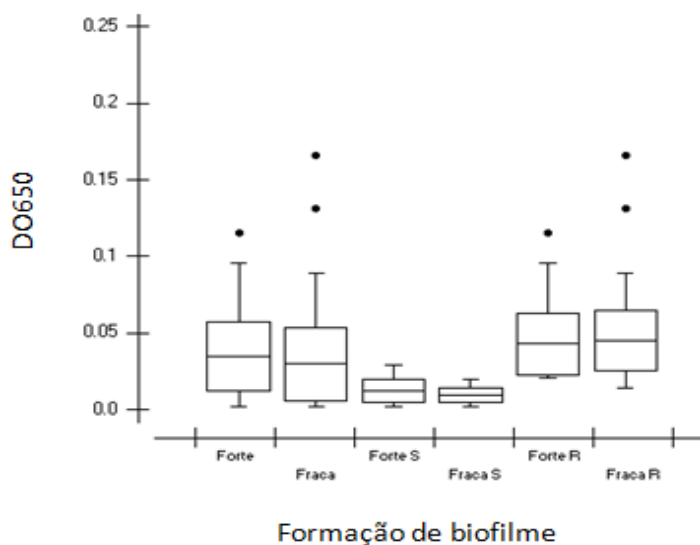


Gráfico 4 – Densidade óptica da biomassa recuperada de *peg-lids* de amostras fortes e fracas formadoras de biofilmes categorizadas como sensíveis (S) ou resistentes (R) aos antimicrobianos ($p>0,05$) (Teste T de Student). (•) DO acima do valor máximo (valor atípico).

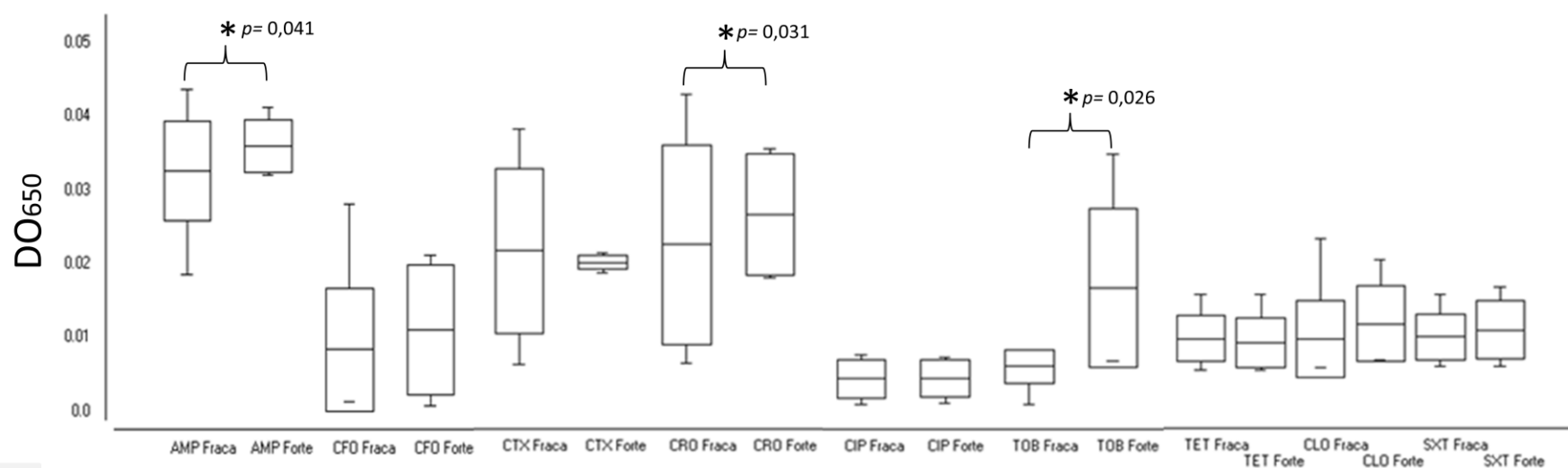


Gráfico 5 - Relação da densidade óptica entre amostras fortes e fracas formadoras de biofilme para cada antimicrobiano testado. DO significativamente superior para amostras fortes formadoras de biofilme frente a AMP, CRO e TOB (*) ($p<0,05$ Teste T de Student). AMP- ampicilina; CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO- ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina; CLO- cloranfenicol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

Biofilmes de 24 horas sensíveis ou com resistência intermediária a antimicrobianos tiveram a MBIC avaliada também com 48 e 72 horas. As amostras foram selecionadas para o teste da seguinte forma: (i) seis sensíveis para ciprofloxacina, com MBIC 4x e 8x superior à CMI; (ii) duas com resistência intermediária para ampicilina, (iii) três sensíveis para tobramicina, com MBIC 4x superior à CMI; e (iv) três com resistência intermediária para cefoxitina. Aumento progressivo da MBIC conforme maturação do biofilme (de 24-72 horas) foi somente observado de ciprofloxacina para uma amostra de EAEC (6A) e de ampicilina para ATCC 25922 (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração mínima inibitória de biofilme (MBIC) de amostras de EAEC em biofilme em diferentes tempos de crescimento (24, 48 e 72 horas).

Amostras <i>E.coli</i> /EAEC	MBIC (µg/mL)/Tempo de maturação do biofilme (horas)											
	Ciprofloxacina			Ampicilina			Tobramicina			Cefoxitina		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
ATCC 25922	0,03	0,06	0,03	16	32	64	2	2	4	64	64	32
6A	0,06	0,12	0,24	-	-	-	2	2	2	-	-	-
39B	0,06	0,06	0,03	-	-	-	2	2	4	-	-	-
89A	0,06	0,12	0,06	16	16	32	-	-	-	-	-	-
139D	-	-	-	16	16	32	4	2	4	-	-	-
Q158A	0,06	0,06	0,12	-	-	-	-	-	-	64	64	32
Q193A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	32	16
Q226A	0,06	0,12	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q255D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32	16	16
Q266B	0,03	0,03	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.5.2 Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC)

A tolerância do biofilme à presença do antimicrobiano por 24 horas de incubação foi determinada a partir de: (i) leitura visual (colorimétrica) conforme desenvolvimento da coloração rósea em decorrência da redução do TTC 0,05% pelas células viáveis (Figura 13) e; (ii) detecção de crescimento bacteriano após repique do último poço com coloração rósea e as demais incolores após incubação com TTC (Figura 14). Os valores de MBEC, medida de tolerância, foram sempre superiores na detecção de células viáveis em relação à leitura visual com TTC (Tabela 10). Foram considerados então como valores de tolerância de biofilme o resultado obtido pela contagem de células viáveis. A MBEC pela contagem de células viáveis, com

exceção de uma mesma amostra para cefoxitina e cefotaxima (39B), foi sempre superior a ultima concentração analisada (Tabela 10).

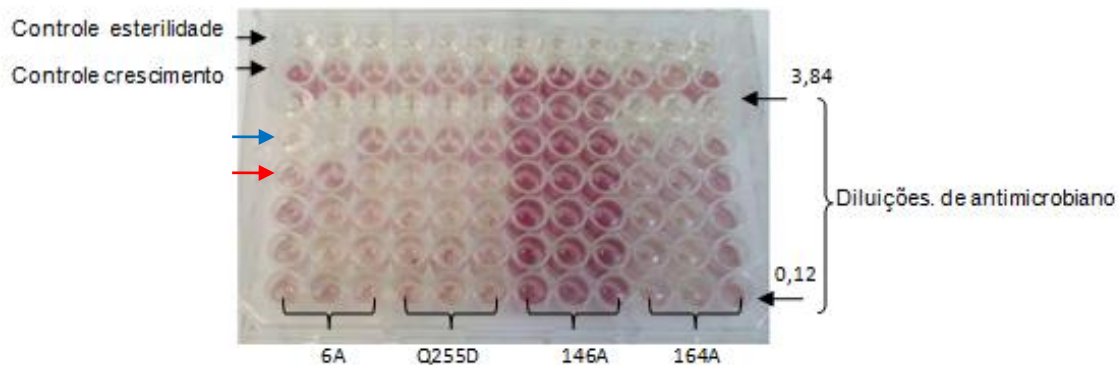


Figura 13 - Biofilme recuperado do *peg-lid* por sonicação, após tratamento com ceftriaxona (0,12 – 3,84 $\mu\text{g/mL}$) e incubação com TTC 0,05%. Controle de esterilidade: somente CAMHB. Controle de crescimento: bactéria com CAMHB. Diluições de antimicrobiano: bactéria e CAMHB com antimicrobiano. Poços coloridos: indica presença de células viáveis. A diluição a partir da qual foi feito repique para determinação de células viáveis está demonstrada com seta vermelha para amostra 6A e seta azul para as demais amostras. CAMBH: caldo Mueller Hinton-cátion ajustado.

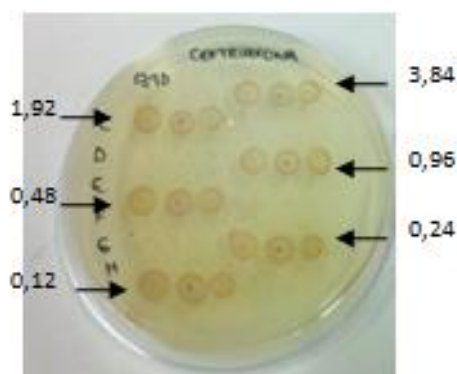


Figura 14 - Detecção de células viáveis de EAEC 89A após tratamento com diferentes concentrações de ceftriaxona para determinação da MBEC. Os inóculos foram feitos em ágar nutriente a partir de microplaca previamente incubada com TTC 0,05%.

Tabela 10 - Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (MBEC) de amostras de EAEC em biofilme para alguns antimicrobianos com adição de cloreto de trifênil tetrazólio 0,05% e detecção de células viáveis

Biofilme	Amostra EAEC	MBEC (µg/mL)											
		CFO		CTX		CRO		TOB		TET		CIP	
		TTC*	CV**	TTC*	CV**	TTC*	CV**	TTC*	CV**	TTC*	CV**	TTC*	CV**
Fraco	6A	32	>64	>7,68	>7,68	-	-	>16	>16	>128	>128	0,24	>1,92
	89A	16	>64	3,84	>7,68	>4	>4	>16	>16	>128	>128	0,06	>1,92
	139D	16	>64	>7,68	>7,68	-	-	>16	>16	>128	>128	0,06	>1,92
	110C	16	>64	>7,68	>7,68	>4	>4	>16	>16	>128	>128	0,03	>1,92
	Q016B	-	-	-	-	1,92	>4	-	-	-	-	-	-
	Q304A	-	-	-	-	>4	>4	-	-	-	-	-	-
	Q320A	-	-	-	-	>4	>4	-	-	-	-	-	-
Forte	39B	8	16	1,92	3,84	2	>4	8	>16	64	>128	0,03	>1,92
	146A	32	>64	>7,68	>7,68	2	>4	>16	>16	-	-	0,24	>1,92
	164A	32	>64	>7,68	>7,68	2	>4	>16	>16	-	-	0,24	>1,92
	Q124A	-	-	-	-	-	-	-	-	>128	>128	-	-
	Q255D	32	>64	>7,68	>7,68	-	-	>16	>16	>128	>128	0,24	>1,92
	Q340A	-	-	-	-	-	-	-	-	>128	>128	-	-

*TTC: cloreto de trifênil tetrazólio; CV**: detecção de células viáveis. CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina.

Todos os valores de MBEC foram $\geq$ MBIC (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores de MBIC e MBEC em sistema *peg-lid* pela detecção de células viáveis de amostras de EAEC (n=13).

Biofilme	Amostra EAEC	MBIC/MBEC ($\mu\text{g/mL}$)					
		CFO	CTX	CRO	TOB	TET	CIP
Fraco	6A	8/>64	4/>7,68	-	2/>16	16/>128	0,06/>1,92
	89A	8/>64	1,92/>7,68	2/>4	1/>16	32/>128	0,03/>1,92
	139D	8/>64	4/>7,68	-	2/>16	16/>128	0,015/>1,92
	110C	8/>64	0,24/>7,68	1/>4	1/>16	32/>128	0,0075/>1,92
	Q016B	-	-	2/>4	-	-	-
	Q304A	-	-	4/>4	-	-	-
	Q320A	-	-	4/>4	-	-	-
Forte	39B	8/16	1,92/3,84	2/>4	2/>16	64/>128	0,03/>1,92
	146A	8/>64	3,84/>7,68	2/>4	8/>16		0,0075/>1,92
	164A	4/>64	7,68/>7,68	4/>4	2/>16		0,0075/>1,92
	Q124A	-	-	-	-	16/>128	-
	Q255D	16/>64	1,92/>7,68	-	1/>16	64/>128	0,015/>1,92
	Q340A	-	-	-	-	32/>128	-

CFO- cefoxitina; CTX- cefotaxima; CRO-ceftriaxona; CIP- ciprofloxacina; TOB- tobramicina; TET- tetraciclina.

6 DISCUSSÃO

A diarreia bacteriana é ainda um problema importante em países em desenvolvimento, e embora muitas vezes seja auto-limitada, a OMS indica terapia antimicrobiana para tratamento da diarreia persistente causada pela EAEC (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Como a característica marcante da patogênese da EAEC se baseia na formação de biofilme, a falência no tratamento pode ocorrer, mesmo que elas apresentem o fenótipo de sensibilidade nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos. Como, até o momento, nenhum estudo foi realizado com biofilme de EAEC neste sentido, nós determinamos o impacto do biofilme na susceptibilidade a oito classes de antimicrobianos para os quais as amostras foram sensíveis em forma plantônica, incluindo aqueles indicados para o tratamento empírico (KONG et al., 2015), e apontamos aqueles que seriam ineficazes assim como os que poderiam levar ao sucesso terapêutico.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos que direcionam a terapia antimicrobiana são realizados com as bactérias na sua forma plantônica (DORING et al., 2012). Assim sendo, estes resultados não podem ser utilizados para sugerir o tratamento para infecções com biofilme. Portanto, é crescente o interesse no desenvolvimento de testes de susceptibilidade específicos para o biofilme bacteriano (MACIÁ et al., 2014).

Em nosso estudo, optamos pelo uso do sistema miniaturizado *peg-lid* (“dispositivo Calgary”), descrito por Ceri, Olson e Stremick (1999) como o que reproduz verdadeiramente a aderência da população bacteriana para testes de susceptibilidade, além de apresentar reprodutibilidade e homogeneidade em cada *peg*. De acordo com Harrison et al. (2010), este sistema promove a formação do biofilme em volta dos *pegs* com a vantagem de eliminar a agregação bacteriana que ocorre por sedimentação dos microrganismos quando da análise da MBIC formado em poços da microplaca. Estes dados corroboram com os resultados do nosso estudo, pois comparando a DO entre os poços da microplaca e *pegs*, observamos valor sempre superior para os poços da microplaca em relação aos *pegs*, indicando que teria havido agregação bacteriana nos poços. Além disso, apresenta praticidade de manejo, reduzindo tempo de trabalho e a possibilidade de contaminação. Porém para o estabelecimento desse sistema, há necessidade de realizar padronizações e

de verificar a calibração para garantir o controle de inóculo e homogeneidade de produção de biofilme em todos os *pegs* da tampa da microplaca.

O inóculo bacteriano utilizado nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, que deve estar com concentração padronizada de microrganismos, é usualmente determinado através de comparação com uma escala de turvação (McFarland) (CLSI 2016). Entretanto, realizamos o controle do inóculo através de diluições sucessivas e repique para meio de crescimento bacteriano para avaliar a contagem bacteriana esperada, como proposto por Harrison et al., (2010). Este procedimento revelou que a comparação com a escala de McFarland que poderia incorrer em subjetividade, apresentou número de UFC compatível com o esperado. A partir de então, o inóculo foi determinado por comparação com escala de McFarland, mas também certificado por meio da leitura da DO₆₅₀ para minimizar erros subjetivos.

Em todos os testes realizados de susceptibilidade a antimicrobianos, sejam eles qualitativos ou quantitativos, exige-se o controle de qualidade com cepas padrão que possuem perfil de susceptibilidade pré-determinado pelo CLSI ou EUCAST. Das cepas preconizadas, a *E. coli* ATCC 25922 é indicada para teste com enterobactérias (CLSI 2016). Para que ela fosse utilizada como controle da concentração de antimicrobiano que entraria no sistema, era necessário ter determinado o MBIC desta amostra visto que, somente um estudo descreveu a MBIC para esta cepa (CERI et al., 1999). Entretanto, dentre os nove antimicrobianos utilizados em nosso estudo, Ceri et al. (1999) analisaram somente três deles, quais sejam, a cefotaxima, tobramicina e ciprofloxacina. A MBIC destes antimicrobianos diferiu em apenas uma ou duas diluições em relação à do presente estudo e foi igual para ciprofloxacina. Porém, como o estudo deles não trazia valores de MBIC para todos os antimicrobianos que testamos e, mais importante ainda, o procedimento diferia em relação ao do presente estudo, determinamos a MBIC de todos os antimicrobianos para a ATCC 25922, que passou a ser utilizada em nossos experimentos. Além desta cepa de referência *E. coli*, analisamos as cepas protótipos EAEC 042 e EAEC 17-2, para as quais ainda não se tem conhecimento da MBIC ou MBEC, e são cepas de acesso mundial. Pelos resultados obtidos, observamos a sensibilidade destas cepas em biofilme somente para ciprofloxacina e tobramicina, sendo resistente para os demais antimicrobianos testados.

Vários estudos mostram que o biofilme pode levar a um aumento na resistência aos antimicrobianos de até 1000 vezes em relação à forma plantônica (CERI et al., 1999; FERREIRA, LEAO, D'ALINCOURT, 2010). Em nosso estudo houve um aumento na concentração de antimicrobiano para inibir biofilme de dois a até 4.266,7 vezes o valor da CMI para as amostras que passaram a ser resistentes.

Apesar dos pontos de corte para bactérias em biofilme não estarem estabelecidos até o momento, comparações dos parâmetros farmacodinâmicos das bactérias em sua forma plantônica e em biofilme tem fornecido informações importantes. Por exemplo, dados avaliados para diferentes microrganismos destacam que biofilme leva a um aumento de mais de uma diluição na MBIC em relação à CMI para a maioria dos antimicrobianos (MOSKOWITZ et al., 2004; HENGZHUANG et al., 2011). Consideramos então o ponto de corte descrito para células plantônicas de enterobactérias (CLSI 2016), e observamos que biofilme de EAEC foi resistente ou com resistência intermediária à ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim. As cefalosporinas de terceira geração, ceftriaxona e cefotaxima, apresentaram baixa atividade (somente 15% e 10% foram sensíveis, respectivamente). Por outro lado, observamos ótima atividade de ciprofloxacina (95%) em biofilme de EAEC e boa atividade de cefoxitina e tobramicina (80% e 75%, respectivamente).

Alguns estudos reportam que a maioria das infecções por EAEC são tratadas com sucesso com fluoroquinolonas como a ciprofloxacina (HAIDER et al., 1992; WANKE et al., 1998; GLANDT et al., 1999; GUERRANT et al., 2001). Tseng et al. (2013) e Kwiecinska-Piróg et al., (2013) mostraram eficácia da ciprofloxacina na inibição do *Pseudomonas aeruginosa* (n= 63) e *Proteus mirabilis* (n= 50) em biofilme, sendo para este observado 64% de sensibilidade, embora em nível inferior ao observado em nosso estudo com EAEC (95% de sensibilidade). Logo, a ciprofloxacina aparentemente apresenta ou pode apresentar atividade em biofilme de *Pseudomonas*, *P. mirabilis* e, pelos nossos achados e com atividade ainda superior, também de EAEC. Esta fluoroquinolona supostamente permeia eficientemente estes biofilmes, embora a constituição do EPS seja distinta entre essas espécies: em *E. coli* é constituído por ácido colânico, celulose e PGA, em *P. aeruginosa* é formado por alginato, enquanto em *P. mirabilis*, por homo ou heteropolissacarídeos ainda não determinados (COSTERTON et al., 1995; LÓPEZ et al., 2010; SANTOS et al., 2010;

MORYL et al., 2014). Porém, os mecanismos que respondem pela limitada atividade dos antimicrobianos em biofilme de EAEC não foram investigados por nós. No que diz respeito à tobramicina, é possível que a resistência esteja relacionada a uma menor difusibilidade do antimicrobiano através da matriz polissacarídica, complexação com seus constituintes, ou ainda, redução da taxa de crescimento bacteriano (ALIPOUR et al., 2009). Tseng et al. (2013) observaram que a tobramicina é sequestrada na matriz do biofilme de *P. aeruginosa*, o que sugere uma menor difusibilidade do antimicrobiano através da matriz. De fato, observamos que biofilme de amostras fortes formadoras apresentou DO significativamente superior ao das fracas formadoras.

Quanto às cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima e ceftriaxona), para as quais observamos alta taxa de resistência de biofilme dentre as EAEC, pode estar relacionado também a uma redução da taxa de crescimento ou a uma barreira pela EPS. De acordo com esta hipótese, os antimicrobianos falham na penetração do biofilme, de modo que em algumas regiões do biofilme, a bactéria simplesmente não é exposta a concentrações efetivas do antimicrobiano (COSTERTON et al., 1987). A observação da DO de biofilme das amostras de EAEC fortes formadoras foi significativamente superior ao das fracas formadoras para ceftriaxona, sugerindo que o EPS pode estar servindo como barreira à ação deste antimicrobiano.

O fato de 100% dos biofilmes de EAEC serem resistentes ou de resistência intermediária à ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim é preocupante, pois todos estes são indicados para tratamento empírico da diarreia causada por EAEC (KONG et al., 2015). Portanto, estes dados apontam para falência terapêutica quando do uso destes antimicrobianos.

Nossos achados corroboram os estudos de May et al., (2009) que demonstraram que o biofilme de *E. coli* foi 1.000 vezes mais resistente à tetraciclina do que as células plânticas. Eles atribuíram essa resistência ao aumento da expressão de bombas de efluxo para tetraciclina (MAY et al., 2009). O tipo de resistência depende da presença do antimicrobiano, e pode ser específico ou não específico para um antimicrobiano em particular. Um mecanismo universal não específico é a formação de bombas de efluxo (WHITELEY et al., 2001), que pode ser uma hipótese para a ineficácia desses antimicrobianos em nosso estudo.

Na análise da curva de crescimento do biofilme, observamos que não houve incremento significativo após as 24 horas de formação do biofilme o que justifica nossos experimentos realizados para todos os antimicrobianos com 24 horas de formação, correspondente ao biofilme maduro. Da mesma forma, Adamus-Bialek (2015) realizou a cinética de crescimento de biofilme de *E. coli* uropatogênica (24, 48, 72 e 96 horas) e observou que após 24 horas não houve diferença significativa na formação do biofilme. No nosso caso, como ocorria ainda um ligeiro incremento do biofilme de EAEC após 24 horas, testamos biofilme de 48 e 72 horas de algumas cepas e amostras que se mantiveram sensíveis ou de resistência intermediária a alguns antimicrobianos selecionados (ciprofloxacina, ampicilina, tobramicina e cefoxitina). Exceto para duas amostras para as quais observamos um aumento progressivo na MIBIC, mas de apenas uma diluição (ATCC 25922 para ampicilina e 6A para ciprofloxacina), não houve aumento na MBIC entre os diferentes tempos de crescimento de biofilme. Isso significa que os testes foram realizados com biofilme já maduro e daí podemos inferir sua sensibilidade e resistência com alguma segurança.

Como a EPS pode servir de barreira à penetração de antimicrobianos, é possível que amostras fortes formadoras de biofilme apresentem maior resistência do que as fracas formadoras. Em nosso estudo, observamos que as fortes formadoras apresentaram resistência de seis a oito antimicrobianos enquanto as fracas formadoras de biofilme, de quatro a sete antimicrobianos, não significativo. Estudo com *E. coli* uropatogênica evidenciou que amostras fortes formadoras de biofilme são mais resistentes aos agentes antimicrobianos que as amostras fracas formadoras de biofilme (PONNUSAMY et al., 2012). Em nosso estudo observamos que houve diferença entre as amostras fracas e fortes formadoras quando comparamos a mediana dos antimicrobianos no gráfico de box-plot, somente para tobramicina, ceftriaxona e tobramicina, indicando que nestes casos a matriz de EPS corroborou para redução da ação dos antimicrobianos.

Para a tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, o intervalo de MBIC não diferiu entre as amostras fortes e fracas formadoras de biofilme, mas todas foram resistentes, ou seja, independeu da quantidade do biofilme formado, mas possivelmente de sua constituição bioquímica. Sahal & Bilkay (2014), mostraram que amostras de *S. epidermidis* fortes formadoras de biofilme formam tensões que

exibem um aumento da resistência antimicrobiana e a razão disto pode estar supostamente relacionado com alterações genéticas que refletem na matriz do biofilme. Da mesma forma, componentes da matriz do biofilme de EAEC interfeririam na penetração do antimicrobiano, fenômeno este que responderia pela diferença no perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em biofilme.

Levando em consideração a possibilidade de que, mesmo sendo o biofilme sensível a um dado antimicrobiano, possa haver falência do tratamento por dificuldade de ação conjunta da resposta do hospedeiro, especialmente quando se tratar de antimicrobianos bacteriostáticos, investigamos então a capacidade de sobrevivência da bactéria em presença do antimicrobiano, ou seja, de tolerância (MBEC). Para isso o TTC foi utilizado e baseia-se no desenvolvimento de uma coloração rósea quando há células viáveis que reduzem o composto a formazana (BROWN et al., 2013). Quando comparado com o método de pesquisa de células viáveis o TTC mostrou valores de MBEC menores e não deve, portanto, ser usado para este fim. Mesmo assim, observamos que o TTC foi de duas a até 256 vezes maior do que a MBIC para as amostras de EAEC testadas. A MBEC baseada em células viáveis foi, para praticamente todas as amostras, no mínimo igual à maior concentração testada do antimicrobiano.

Estes resultados nos mostram que mesmo biofilmes de EAEC sensíveis ao antimicrobiano, como foi à ciprofloxacina ou mesmo à cefoxitina e tobramicina, a eficácia *in vivo* do tratamento com estes antimicrobianos não pode ser assegurada, visto que temos bactérias tolerantes, e se ainda existe integridade da matriz do biofilme, poderá haver restrição à resposta do hospedeiro e comprometimento do controle do microorganismo.

6.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de grande importância se conhecer o perfil de susceptibilidade de bactérias para que o tratamento possa ser iniciado com algum grau de sucesso antes mesmo do resultado laboratorial, que demanda em torno de três dias. Porém, considerando-se bactérias formadoras de biofilme, como é o caso da EAEC, torna-se ainda mais relevante determinar aqueles antimicrobianos que seriam eficazes ou aqueles para os quais a bactéria seria refratária.

Neste sentido, este estudo mostrou que ciprofloxacina apresenta ótima atividade bem como a cefoxitina e tobramicina, embora com atividades um pouco menor. Porém, qual o impacto *in vivo* da sobrevivência de microrganismos mesmo em biofilme sensível ao antimicrobiano, como à altamente eficaz ciprofloxacina, ainda não pode ser inferido.

Devemos considerar que os testes de susceptibilidade de biofilme ainda não resultam em previsão confiável de sucesso terapêutico (CIOFU et al., 2017). Maciá et al. (2014) argumentam que embora a MBIC com dispositivo Calgary (*peg-lid*) não possa prever o sucesso terapêutico em infecção com biofilme, com alguma segurança podemos excluir o uso de antimicrobianos que se mostrem ineficazes. Kong et al. (2015) sugeriram o tratamento empírico de infecção por EAEC com ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclinas e quinolonas. Com o nosso estudo mostramos que, à exceção da quinolona ciprofloxacina, todos os biofilmes foram resistentes aos demais antimicrobianos. Portanto, os nossos resultados mostram que ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim e tetraciclinas não devem ser prescritas para tratamento por EAEC.

7 CONCLUSÃO

- Ciprofloxacina é o antimicrobiano com maior eficácia em biofilme, seguido de cefoxitina e tobramicina, portanto poderiam ser indicados para tratamento empírico;
- As cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima e ceftriaxona) apresentam atividade muito baixa contra biofilme de EAEC, enquanto que, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim são ineficazes para biofilme de EAEC e levariam a uma possível falência terapêutica;
- Biofilme de EAEC madura com 24 horas de incubação;
- Não houve diferença de atividade dos antimicrobianos em biofilme com 48 ou 72 horas;
- De modo geral, não houve relação entre a intensidade do biofilme (forte e fraco) e susceptibilidade aos antimicrobianos, exceto para ampicilina, ceftriaxona e tobramicina;
- A menor concentração de antimicrobianos para erradicar EAEC em biofilme foi superior às maiores concentrações testadas em quase todas as amostras, indicando a dificuldade de controle destes microrganismos.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMUS-BIALEK, W.; KUBIAK, A.; CZERWONKA, G. Analysis of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm formation under different growth conditions. **Acta Biochimica Polonica**, v.62, n.4, p. 765-771, 2015.
- AGLADZE, K.; WANG, Z.; ROMEO, T. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesion PGA. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 1, p. 8237-8246, 2005.
- ALI, M.M.; AHMED, S.F.; KLENA, J.D.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* in diarrheic children in Egypt: molecular characterization and antimicrobial susceptibility. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 5, p. 589-596, 2014.
- ALIPOUR, M.; SUNTRES, Z.E.; LAFRENIE, R.M.; et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and biofilms by co-encapsulation of bismuth-ethanedithiol with tobramycin in liposomes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.1, p.684-693, 2010.
- AMAYA, E.; REYES, D.; VILCHEZ, S.; et al. Antibiotic resistance patterns of intestinal *Escherichia coli* isolates from Nicaraguan children. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 216-222, 2011.
- AMORENA, B.; GRACIA, E.; MONZÓN, M.; et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 43-55, 1999.
- ARAÚJO, J.M. et al. Typical Enteroaggregative and Atypical Enteropathogenic Types of *Escherichia coli* Are the Most Prevalent Diarrhea-Associated Pathotypes among Brazilian Children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.1, p. 3396-3399, 2007.
- ASLANI, M. M. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 136-139, 2011.

BANGAR, R. & MAMATHA, B. Identification of Enteroaggregative *Escherichia coli* in infants with acute diarrhea based on biofilm production in Manipal, south India. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 62, n. 1, p. 8-12, 2008.

BASU, S.; GHOSH, S.; GANGULY, N.K.; et al. A biologically active lectin of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Biochimie**, v. 86, n. (9-10), p.657-66, 2004.

BARDOUNIOTIS, E.; HUDDLESTON, W.; CERI, H.; et al. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC™ assay system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, v.1, p. 263-267, 2001.

BARSOUMIAN, A. E.; MENDE, K.; SANCHEZ, C.J.; et al. Clinical Infectious outcomes associated with biofilm-related bacterial infections: a retrospective chart review. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 223, DOI: 10.1186/s12879-015-0972-2, 2015.

BAULDRY, B. et al. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **The Journal Infectious of Diseases**, v.161, n.1, p.1249-51, 1990.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M.; et al. *Escherichia coli* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, n. 1, p. 249-289, 2010.

BLACK, R. E., et al., Global regional and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 375, n.1, p. 5-11, 2010.

BRANDA, S.S.; VIK, S.; FRIEDMAN, L.; et al. Biofilms: the matrix revisited. **Trends of Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.

BRACKMAN, G. & COENYE, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 1, p. 216-222, 2014.

BRITO, P.H.; ROCHA, E.P.; XAVIER, K.B. Natural genome diversity of AI-2 *quorum sensing* in *Escherichia coli*: conserved signal production but labile signal reception. **Genome Biology and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 16-30, 2013.

BROWN, H.L.; VLIET, A.H.M.; BETTS, R.P.; et al. Tetrazolium reduction allows assessment of biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in a food matrix model. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 1212-1221, 2013.

CERCA, N. et al. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase negative *Staphylococci* in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 331-336, 2005.

CERI, H.; OLSON, M.E.; STREMICK C.; et al. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CERNA, J.F.; NATARO, J.P.; ESTRADA-GARCIA, T. Multiplex PCR for detection of three plasmid-borne genes of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **Journal of clinical microbiology**, v.5, n.1, p. 2138-40, 2003.

CHEN, Y., et al., Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. **Bacteriology**, v. 20, p. 52-58. 2014.

CHENG, K.C.; DEMIRCI, A.; CATCHMARK, J.M. Advances in biofilm reactors for production of value-added products. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 445-456, 2010.

CIOFU, O.; ROJO-MOLINERO, E.; MACIÀ, M.D.; et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. **Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica**, p. 304-319, 2017.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M 100-S20. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

COENYE, T. & NELIS, H.J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 89-105, 2010.

COSTERTON, J.W.; CHENG, K.J.; GESSEY, G.G.; et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual review of microbiology**, v. 41, n. 1, p. 435-64, 1987.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.
 COSTERTON, J.W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF, M.; et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. **Journal Clinical Investigation**, v. 112, n. 10, p. 1466-1477, 2003.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; et al. Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; GÖTZ, F. In vitro methods to study *Staphylococcal* biofilm formation. **Methods to study Staphylococcal biofilms**, v. 336, n. 1, p. 239-255, 2001.

CROXEN, M.A. & FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Review in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 26, n. 1, p. 822-880, 2013.

CZAJA, W.; KRYSTYNOMICZ, A.; BIELECKI, S.; et al. Biomaterials. **Wiley Online Library**, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2006.

DANIS-WLODARCZYK, K.; OLSZAK, T.; ARABSKI, M.; et al. Characterization of the newly isolated lytic bacteriophages KTN6 and KT28 and their efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **PLOS ONE**, DOI: 10.1371/journal.pone.0127603, 2015.

DEIGHTON, M.A.; CAPSTICK, J.; DOMALEWSKI, E.; et al. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods in enzymology**, v. 336, n. 1, p. 177-195, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DORING, G.; FLUME, P.; HEIJERMAN, H; et al. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, p. 461-79, 2012.

DURAND, D.; CONTRERAS, C.A.; MOSQUITO, S.; et al. Pic gene of enteroaggregative *Escherichia coli* and its association with diarrhea in Peruvian children. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 6, DOI: 10.1093/femspd/ftw054, 2016.

ELIAS, W.P.; UBER, A.P.; TOMITA, S.K.; et al. Combinations of putative markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhea. **Epidemiology and Infection**, v. 129, n. 1, p. 49-55, 2002.

ESTRADA-GARCÍA, T. et al. Drug-resistance Diarrheogenic *Escherichia coli*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n.8, p.1306-1308, 2005.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 281-298, 2012.

FERREIRA, A.G.; LEO, R.S.; D'ALINCOURT, A.P.; et al. Influence of biofilm formation in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Brazilian patients with cystic fibrosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 1, p. 606-612, 2010.

FERNANDEZ-OLMOS, A.; GARCIA-CASTILLO, M.; MAIZ, L.; et al. *In vitro* prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 173-176, 2012.

FLORES, J. & OKHUYSEN, P.C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Current Opinion of Gastroenterology**, v.25, n.1, p. 8-11, 2009.

GARCIA, P. G. et al., Occurrence and Antimicrobial Drug Susceptibility Patterns of Commensal and Diarrheogenic *Escherichia coli* in Fecal Microbiota from Children with and without Acute Diarrhea. **The Journal of Microbiology**, v. 49, nº 1, p. 46-52. 2011.

GLANDT, M.; ADACHI, J.A.; MATHEWSON, J.J.; JIANG, Z.D.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a cause of traveler's diarrhea: clinical response to ciprofloxacin. **Clinical Infectious disease: an official publication of the Infectious Disease Society of America**, v. 29, n. 2, p. 335-8, 1999.

GOMES, T.A.T.; BLAKE, P.A.; TRABULSI, L.R. Prevalence of *Escherichia coli* strains with Localized, Diffuse, and Aggregative to HeLa Cells in infants with Diarrhea and Matched controls. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.2, p.266-269, 1989.
GOMES, T. A.; ELIAS, W.P.; SCALETISKY, I.C.A.; et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.1, p. 3-30, 2016.

GUERRANT, R.L.; GILDER, V.T.; STEINER, T.S.; et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clinical infectious disease: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 1, p. 331-51, 2001.

HAIDER, K.; FARUQUE, S.M.; ALBERT, M.J.; et al. Comparison of a modified adherence assay with existing assay methods for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.1, p.1614–16, 1992.

HANNA, A.; BERG, M.; STOUT, V.; et al. Role of capsular colonic acid in adhesion os uropathogenic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4474-4481, 2003.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1565-1578, 2005.

HARRISON, J.J.; CERI, H.; YERLY, J.; et al. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. **Biological Procedures Online**, v. 8, n. 1, p. 194-215, 2006.

HARRISON, J.J.; STREMICK, C.A.; TURNER, R.J.; et al. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. **Nature Protocol**, v. 5, n. 7, p. 1236-1254, 2010.

HEILMANN, C.; GERKE, C.; PERDREAU-REMINGTON, F.; et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 1, p. 277-282, 1996.

HENGZHUANG, W.; WU, H.; CIOFU, O.; et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4469-74, 2011.

HILL, D.R. & BEECHING, N.J. Travelers' diarrhea. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, n.1, p.481-487, 2010.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

HOYLE B. D.; ALCANTARA, J.; COSTERTON, J. W. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacilin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 9, p. 2054-2056, 1992.

HUANG, D.B.; MOHAMED, J.A.; NATARO, J.P.; et al. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 1386-1392, 2007.

HUANG, D. B.; MONHANTY, A.; DUPONT, H. L.; et al. A review of emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1303-1311, 2006.

HUANG, D.B.; NATARO, J.P.; DUPONT, H.L.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 1, p. 556-563, 2006.

HUANG, D.B.; OKHUUSEN, P.C.; JIANG, Z.D.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 1, p. 383-389, 2004.

IKUMAPAYI, U.N.; BOISEN, N.; HOSSAIN, M.J.; et al. Identification of subsets of Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with diarrheal disease among under 5-year-old children from rural gambia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0705, 2017.

ITO, A.; TANIUCHI, A.; MAY, T.; et al. An increase in antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 4093-4100, 2009.

IZQUIERDO, M. et al. Identification of Cell Surface-Exposed Proteins Involved in the Fimbria-Mediated Adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli* to Intestinal Cells. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1719–1724, 2014.

JAFARI, F. *et al.* Prevalence and Antimicrobial resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* species associated with acute diarrhea on Tehran, Iran. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 56-62, 2008.

JAFARI, A.; ASLANI, M.M.; BOUZARI, S. Enteroaggregative *Escherichia coli*, a heterogenous, underestimated and under-diagnosed E.coli pathotype in Iran. **Gastroenterology and hepatology from bed to bench**, v.6, n.2, p.71-9, 2013.

JENKINS, C.; CHART, H.; WILLSHAW, G.A.; et al. Genotyping of enteroaggregative *Escherichia coli* and identification of target genes for the detection of both typical and atypical strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 55, n. 1, p. 13-19, 2006.

JENSEN, B.H.; OLSEN, K.E.P.; STRUVE, C.; et al. Epidemiology and Clinical manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614-630, 2014.

JOLIVET-GOUGEON, A. & BONNAURE-MALLET, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.11, n.1, p.49-56, 2014.

JONSSON, R.; STRUVE, C.; BOISEN, N.; et al. Novel aggregative Adherence fimbria variant of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infectious Immunology**, V.83, N.1, P.1396-1405, 2015.

KAHALI, S.; SARKAR, B.; RAJENDRAN, K.; et al. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 1, p. 4111-4120, 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KAUR, P; CHAKRABORTI, A.; ASEA, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric food borne pathogen. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2010.

KIEVIT, T.R. & IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839-4849, 2000.

KONG, H.; HONG, X.; LI, X. Current perspectives in pathogenesis and microbial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbial pathogenesis**, v. 85, n.1, p. 44-49, 2015.

KOO, H.L.; JIANG, Z.D.; BROWN, E.; et al. Coliform contamination of vegetables obtained from popular restaurants in Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. **Clinical Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 218-221, 2008.

KWIECIŃSKA-PIRÓG, J.; SKOWRON, K.; ZNISZCZOL, K.; et al. The Assessment of *Proteus mirabilis* susceptibility to ceftazidime and ciprofloxacin and the impact of these antibiotics at subinhibitory concentrations on *Proteus mirabilis* biofilms. **BioMed Research International**, v. 1, n. 1, p. 108-123, 2013.

LAZĂR, V. & CHIFIRIUC, M.C. Manual significance and new therapeutical strategies for biofilm associated infections. **Roumanian archives of microbiology and immunology**, v.63, n.3, p.125-38, 2010.

LEWIS, K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, n. 1, p. 107-131, 2008.

LEMBRE, P.; LORENTZ, C.; MARTINO, P.D. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world, 2012. DOI: 10.5772/51213. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/exopolysaccharides-of-the-biofilm-matrix-a-complex-biophysical-world>. Acesso em: 24 de Janeiro de 2016.

LI, X.; ZHUN, Y.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 353-362, 2003.

LIMA, A.A.M.; FANG, G.; SCHORLING, J.B.; et al. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica Scandinavica Supplement**, v. 381, n.1, p. 39-44, 1992.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.1, n.1, p.1-11, 2010.

LOZER, D. M.; SOUZA, T. B.; MONFARDINI, M. V.; *et al.* Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in rural communities. **BMC Infectious Diseases**, 13:418, doi:10.1186/1471-2334-13-418, 2013.

MACIÀ, M.D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clinical Microbiology Infectious**, v.20, n.1, p.981-990, 2014.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n.3, p.268-281, 2012.

MAH, T.F. & O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends of Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MAY, T.; ITO, A.; OKABE, S. Induction of multidrug resistance mechanism in *Escherichia coli* biofilms by interplay between tetracycline and ampicillin resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4628-4639, 2009.

McDOUGALD, D.; RICE, S.A.; BARRAUD, N.; *et al.* Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. **Nature reviews. Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39-50, 2011.

MENDEZ-ARANCIBIA, E. *et al.* Evolution of antimicrobial resistance in enteroaggregative *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveller's diarrhoea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, p. 343-347, 2009.

MENDEZ-ARANCIBIA, E.; VARGAS, M.; SOTO, S.; *et al.* Prevalence of different virulence factors and biofilm production in enteroaggregative *Escherichia coli* isolates causing diarrhea in children in Ifakara (Tanzania). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 6, p. 985-989, 2008.

MITTAL, S.; SHARMA, M.; CHAUDHARY, U. Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*. **Pathogens and global health**, v. 109, n. 1, p. 26-9, 2015.

MONDAL, D.; HAQUE, R.; SACK, R.B.; *et al.* Attribution of malnutrition to cause-specific diarrheal illness: evidence from a prospective study of preschool children in

Mirpur, Dhaka, Bangladesh. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 5, p. 824-826, 2009.

MONFARDINI, M.D., 2012. Caracterização genotípica e fenotípica de amostras de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) e com padrão chain-like adhesion (CLA) isoladas de crianças com e sem diarreia. Tese de mestrado, Universidade Federal do Espírito Santo.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS biology**, v. 5, n. 11, p. 307-315, 2007.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A.L.; et al. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003.

MORIN, N.; SANTIAGO, A.E.; ERNST, R.K.; et al., Characterization of the AggR regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal ASM**, v.81, n.1, p. 122-132, 2013.

MORYL, M.; KALETA, A.; STRZELECKI, K.; et al. Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. **Acta Biochimica Polonica**, v.61, n.1, p.133-139, 2014.

MOSKOWITZ, S.M.; FOSTER, J.M.; EMERSON, J.; et al. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1915-1922, 2004.

NATARO, J.P.; Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 4–8, 2005.

NATARO, J.P. Diarrhea among children in developing countries. **Advances in experimental medicine and biology**, v.764, n.1, p. 73-80, 2013.

NATARO, J.P.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; et al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J.P. & KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBINS-BROWNE, R.; *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J.P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 1, p. 402-407, 2006.

NAVARRO-GARCIA, F. & ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E.coli*. **Gut Microbes**, v.2, n.1, p.13-24, 2011. DOI: 10.4161/gmic.2.1.14933.

NAVARRO-GARCIA, F.; GUTIERREZ-JIMENEZ, J.; GARCIA-TOVAR, C.; *et al.* Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. **Infectious Immunology**, v. 78, n. 10, p. 4101-4109, 2010.

NAVARRO-GARCÍA, F.; ESLAVA, C.; VILLASECA, J.M.; *et al.* In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infectious Immunology**, v.66, n.7, p.3149-3154, 1998.

NGUYEN, T.V.; LE, P.V.; LE, C.H.; *et al.* Antibiotic resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains isolated from children in Hanoi, Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 816-819, 2005.

OCHOA, T.J.; RUIZ, J.; MOLINA, M.; *et al.* High frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic *E.coli* in Peruvian infants. **NIH Public access**, v. 81, n. 2, p.296-301, 2009.

OKEKE, I.N. & NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 304-313, 2001.

OKEKE, I.N.; MACFARLANE-SMITH, L.R.; FLETCHER, J.N.; *et al.* IS3 profiling identifies the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O-island 62 in a distinct enteroaggregative *E. coli* lineage. **Gut Pathogens**, v. 3, n. 4, p. 1757-1767, 2011.

OKEKE, I.N.; OJO, O.; LAMIKANRA, A.; *et al.* Etiology of acute diarrhea in adults in Southwestern Nigeria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4525-4530, 2003.

OKHUYSEN, P.C. & DUPONT, H.L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 4, p. 503–550, 2010.

OLSON, M.E.; CERI, H.; MORCK, D.W.; et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 1, p. 86-92, 2002.

OPINTAN, J.A.; BISHAR, R.A.; NEWMAN, M.J.; et al. Carriage of diarrhoeagenic *Escherichia coli* by older children and adults in accra, Ghana. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, n.a, p.504-506, 2010.

OUNDO, J.O.; KARIUKI, S.M.; BOGA, H.L.; et al. High incidence of enteroaggregative *Escherichia coli* among food handlers in three areas of Kenya: a possible transmission route of travelers' diarrhea. **Journal of Travel Medicine**, v. 15, n. 1, p. 31-36, 2007.

PARAHITIYAWA, N.B.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; et al. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. **APMIS**, v. 114, n. 1, p. 298-306, 2006.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of microbiological methods**, V. 72, N. 1, P. 157-165, 2008.

PETTIT, R.K.; WEBER, C.A.; KEAN, M.J.; et al. Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 7, 2005.

PITTS, B. et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, p. 269-276, 2003.

PONNUSAMY, P.; NATARAJAN, V.; SEVANAN, M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 3, p. 210-213, 2012.

RAJU, B & BALLAL, M. Multidrug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* diarrhea in rural southern Indian population. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 41, n. 1, p. 105-108, 2009.

SAHAL, G. & BILKAY, I.S. Multidrug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 539-544, 2014.

SAILER, F.C.; MEBERG, B.M.; YOUNG, K.D. Beta-lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.226, n. 1, p. 245-249, 2003.

SANTOS, C.A.L.; CAMPOS, F.F.; PIZZOLITTO, E.L. Formação de biofilme cristalino de *Proteus mirabilis* em cateter urológico. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 26, n. 2, p. 91-98, 2010.

SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **The Journal of Clinical Investigation**, v.4, n.1, p.1450-5, 1991.

SCALETISKY, I.C.A.; FABBRICOTTI, S.H.; CARVALHO, R.L.B.; et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.2, p.645-648, 2002.

SCHEMBRI, M.A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P.; et al. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. **Journal Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 253-267, 2004.

SCHMIDT, H.; KNOP, C.; FRANKE, S.; et al., Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.3, p.701-705, 1995.

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALLI'AGNOL, M.; et al. Roles for *Fis* and *Yafk* in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983-997, 2001.

SILVA, A. Determinação da susceptibilidade e da concentração inibitória mínima a antimicrobianos de amostras plantônicas de *Escherichia coli* Enteroagregativa. 2014. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

SIMM, R.; FETHERSTON, J.D.; KADER, A.; et al. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 6816-6823, 2005.

SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; ROWE, B. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. **The Lancet**, v. 350, n. 1, p. 814-815, 1997.

SPANO, L.C.; SADOVSKY, A.D.; SEGUI, P.N.; et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 359-363, 2008.

STEINER, T.S.; LIMA, A.A.; NATARO, J.P.; et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release intestinal epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 1, p. 88-96, 1998.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STEWART, P.S. & COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p.135-138, 2001.

SUTHERLAND, I.W. The biofilmm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

TAGLIABUE, L.; MACIAG, A.; ANTONIANI, D.; et al. The yddV-dos operon controls biofilm formation through the regulation of genes encoding curli fibers' subunits in aerobically growing *Escherichia coli*. **FEMS Immunology Medicinal Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 477-484, 2010.

TOBIAS, J.; KASSEM, E.; RUBINSTEIN, U.; et al. Involvement of main diarrheageanic *Escherichia coli*, with emphasis on enteroaggregative *E.coli*, in severe non-epidemic pediatric diarrhea in a high-income country. **BMC Infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 15-79, 2015.

TOKUDA, K.; NISHI, J.; IMUTA, N.; et al. Characterization of typical and atypical enteroaggregative *Escherichia coli* in Kagoshima, Japan: biofilm formation and acid resistance. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 1, p. 320-329, 2010.

TOMLIN, K.L.; MALOTT, R.J.; RAMAGE, G.; et al. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5208-5218, 2005.

TORMO, M.A.; KNECHT, E.; GÖTZ, F.; et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer. **Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 2465-2475, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4 d. São Paulo: Ed Atheneu, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5 d. São Paulo: Ed Atheneu, 2008.

TRUNG, et al. Colonization of Enteroaggregative *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in chickens and humans in southern Vietnam. **BMC Microbiology**, 2016.

TSENG, B.S.; ZHANG, W.; HARRISON, J.J.; et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 15, p. 2865-78, 2013.

TYERMAN, J.G.; PONCIANO, J.M.; JOYCE, P.; et al. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 22, p. 2148-2155, 2013.

VAN HOUDT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; et al. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 177-184, 2004.

VAN HOUDT, R.; MOONS, P.; JANSEN, A.; et al. N-acyl-L-homoserine lactone quorum sensing controls butanediol fermentation in *Serratia plymuthica* RVH1 and *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 4570-4572, 2006.

VIAL, P.A, et al. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **Journal Infection Diseases**, v.158, n,1, p.70-79, 1988.

VILA, J. et al. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Children under the Age of 5 Years from Ifakara, Tanzania. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, n. 12, p. 3022-3024, 1999.

VILA, J. *et al.* Susceptibility patterns of enteroaggregative *Escherichia coli* associated with traveller's diarrhoea: emergence of quinolone resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n.11, p. 996-1000, 2001.

VIGIL, K.J.; JIANG, Z.D.; CHEN, J.J.; *et al.* Coliform and *Escherichia coli* contamination of deserts served in public restaurants from Guadalajara, Mexico, and Houston, Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 1, p. 606-608, 2009.

XU, Z.; LIANG, Y.; LIN, S.; *et al.* Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Current of Microbiology**, DOI: 10.1007/s00284-016-1081-1, 2016.

WAGNER, V.E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; *et al.* Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. **Journal of bacteriology**, V. 185, N. 7, P. 2080-95, 2003.

WANG, X.; PRESTON, J.F.; ROMEO, T. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2724-2734, 2004.

WANKE, C.A.; GERRIOR, J.; BLAIS, J.; *et al.* Successful treatment of diarrheal disease associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in adults infected with human immunodeficiency virus. **The Journal of infectious disease**, v.178, n.5, p.1369-72, 1998.

WHITELEY, M.; BANGERA, M.G.; BUMGARNER, R.E.; *et al.* Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v.413, n.1, p.860-864, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoea. Disponível em: <www.who.int/topics/diarrhoea/en/>. Acesso em: 24 janeiro de 2017.

YAMAMOTO, T.; ECHEVERRIA, P.; YOKOTA, T. Drug resistance and adherence to human intestines of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 1, p. 744-9, 1992.

ANEXO A - Estudos que realizaram testes de susceptibilidade para isolados de EAEC formadoras e não formadoras de biofilme e percentagem de resistência aos antimicrobianos

Antimicrobianos ^a	Estudos (n=amostras)																					
	Silva, 2014 Gonçalves, 2016 ^b (78)	Yamamoto, et al., 1991 (JAPÃO) (63)	Vila, et al., 1999 (TANZÂNIA) (65)	Vila et al., 2001 (ESPANHA) (50)	Okeke, et al., 2003 (NIGÉRIA) (18)	Kahali, et al., 2004 (ÍNDIA) (121)	Estrada-García, et al. 2005 (MÉXICO) (16)	Moon, et al., 2005 (CORÉIA DO SUL) (23)	Nguyen, et al., 2005 (SUÉCIA) (86)	Oundo, et al 2007 (QUÊNIA) (29)	Jafari, et al 2008 (IRÃ) (92)	Mendez-Arancibia, et al., 2009 1994-1997 (50)	2001-2004 (84)	Ochoa, et al., 2009 (PERU) (67)	Raju, et al., 2009 (ÍNDIA) (64)	Aslani, 2011 (IRÃ) (14)	Garcia, et al. 2011 (BRASIL) (34)	Amaya, et al. 2011 (NICARÁGUA) (203)	Ali, et al., 2014 (EGITO) (19)	Chen, et al., 2014 (CHINA) (114)	Tobias, et al., 2015 (ISRAEL) (27)	
AMP	32,1	47,6	83,1	52,0	80,9	86,8	81,0	100	90,7	37,9	60,0	52,0	64,0	91,0	85,7	100	32,4	70,1	100	94,9	78,0	
ASB	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,7	-	-	60,7	-	
AMC	0,0	49,2	-	0,0	-	-	-	-	-	-	51,1	0,0	21,0	-	-	50,0	-	2,1	69,6	29,4	44,5	
CFZ	3,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63,6	-	
CFO	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	-	
CTX	0,0	-	-	-	-	-	-	-	26,7	3,5	-	-	-	-	66,6	42,9	-	-	78,3	42,1	-	
CRO	1,3	-	-	-	-	14,0	-	-	-	-	0,0	-	-	-	-	-	0,0	0,8	91,3	-	39,5	
CAZ	0,0	-	-	-	-	33,1	-	-	-	-	2,2	-	-	-	60,3	-	0,0	0,8	-	17,8	-	
CPM	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,4	85,0	
AZT	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,1	-	
MER	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0	-	
IMP	0,0	-	-	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-	0,0	-	0,0	0,0	-	
TOB	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GEN	0,0	0,0	-	-	0,0	5,8	-	77,8	-	6,0	4,5	-	-	6,0	-	28,6	1,5	2,5	-	36,9	0,0	
AMI	0,0	-	-	-	-	6,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	-	-	5,1	-	
TET	28,2	20,6	87,7	64,0	95,4	79,3	94,0	66,7	-	79,3	57,8	64,0	76,0	73,0	80,9	64,3	42,7	-	78,3	64,5	33,5	
CLO	3,8	44,4	57	28,0	46,5	44,6	19,0	-	87,2	27,6	-	28,0	46,0	39,0	-	35,7	-	11,2	73,9	-	18,5	
CIP	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	41,3	-	-	0,0	0,0	2,2	2,0	4,0	1,0	63,4	0,0	-	1,2	0,0	31,8	39,5	
SUT	28,2	23,8	90,8	48,0	74,0	-	88,0	-	91,9	72,4	71,1	48,0	56,0	85,0	84,1	71,4	30,9	73,4	95,7	59,3	33,5	

^aAMP: Ampicilina; ASB: Ampicilina/sulbactam; AMC: Amoxicilina/clavulanato; CFZ: Cefazolina; CFO: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepime; AZT: Aztreonam; MER: Meropenem; IMP: Imipenem; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AMI: Amicacina; TET: Tetraciclina; CLO: Cloranfenicol; SUT: Sulfametoxazol/Trimetoprim; CIP: Ciprofloxacina. ^bRealizados no LabViG com amostras formadoras e não formadoras de biofilme.