

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E**  
**EDUCAÇÃO**

**GRASIELE CRISTINA FÉLIX**

**Desafios sobre o desenvolvimento de resistência de**  
***Escherichia coli* a antibióticos: Uma revisão sobre**  
**linhagens patogênicas**

**ARARAS**

**2022**

**GRASIELE CRISTINA FÉLIX**

**Desafios sobre o desenvolvimento de resistência de  
*Escherichia coli* a antibióticos: Uma revisão sobre  
linhagens patogênicas**

Trabalho de Conclusão de Curso no  
Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras,  
como requisito da disciplina  
Monografia em Ciências Biológicas 2  
Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renato Montagnolli.

**ARARAS**

**2022**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a mim, ao meu esforço e dedicação, que nem sempre foram fáceis, porém desistir não é uma opção!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, que sempre foram minha base e estrutura nos dias mais difíceis em que estive difícil continuar, é tudo por vocês. Amo vocês Ivanda, Matheus e Ilson!

Obrigada mãe, por ser meu abrigo e proteção, minha amiga de todos os momentos!

Agradeço a pessoas que foram fundamentais para que eu pudesse ingressar na universidade, me auxiliando e acreditando em mim! Obrigada Dona Tiana, Victor André e Seu Nelson.

Agradeço aos meus amigos do curso, ao grupo MAXPOWER, Aline, Bruna, Débora, Stefon, Julio, Lucas, Raul e Rômulo, sem vocês não teria graça alguma, obrigada por todos os momentos compartilhados, vocês são incríveis!

Agradeço às minhas colegas de república, RepMentas, pela incrível experiência de partilhar uma casa e responsabilidades com vocês, foi muito importante para meu crescimento pessoal.

Agradeço ao meu amor e companheiro, Igor, por estar sempre comigo principalmente nos momentos difíceis, principalmente na escrita deste trabalho, me ouvindo, incentivando, empurrando e me animando, te amo.

As minhas amigas Gabriella e Jéssica, por serem tão companheiras, me ajudando, ouvindo, distraíndo e fazendo com que eu me sentisse querida e amada, amo vocês demais!

Agradeço as oportunidades que recebi, primeiramente no laboratório do Professor Dr. Alfredo na UFSCar - Araras, por terem me acolhido, onde conheci pessoas mais que especiais, que me ensinaram tanto e onde tive meu primeiro contato com a microbiologia.

Em segundo lugar ao laboratório de microbiologia da UNICAMP, com o Professor Dr. Domingos da Silva Leite, e as meninas maravilhosas com quem aprendi tanto, em especial Taila por toda paciência e cuidado ao ensinar, e Thielly e Marina, por todos os ensinamentos, risadas e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Em terceiro, a empresa Boehringer Ingelheim, gestoras e gestor, Luciana, André e Sheila, pela oportunidade de me desenvolver tanto em laboratório quanto em qualidade assegurada.

Agradeço ao Professor Dr. Renato por ter me aceito como orientada e por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a instituição de ensino UFSCar e a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

E finalmente, agradeço a mim mesma por não desistir, e que apesar da autossabotagem, muitas vezes insegurança, consegui escrever este trabalho e passar por todos os anos da faculdade, sempre fazendo o melhor que pude naquele momento para chegar até aqui.

“Quando a mulher negra se movimenta, toda a estrutura da sociedade se movimenta com ela.”

(Angela Davis)

## RESUMO

A resistência microbiana a antibióticos é um problema de saúde pública, causando danos significativos à saúde da população. Além disso, existem implicações no âmbito político e econômico. Em meio a sociedade existem consequências às ações antrópicas, mesmo as mais sutis, que contribuem para a resistência de agentes microbianos. Dentre eles estão: o uso inconsciente de antibióticos, a prescrição incorreta, a disseminação de micro-organismos entre a população mundial, o incentivo à automedicação e a falta de acesso a saneamento básico. Neste sentido, a relação entre micro-organismos e seres humanos pode se tornar extremamente danosa, pois ocorre uma facilitação na formação e desenvolvimento de biofilmes prejudiciais. Comunidades de micro-organismos produzem essa estrutura de biofilme para adesão a uma superfície, que por sua vez se expande até alcançar a maturação e posteriormente a dispersão. A formação do biofilme tem como objetivo a proteção de fatores externos e a relações simbióticas, propiciando o fluxo de troca de genes e consequente aumento de resistência para sobrevivência. Diversos trabalhos têm sido publicados sobre a resistência a agentes antimicrobianos e a formação de biofilme. Os impactos causados por ele, bem como consequências e formas de retenção e prevenção dos biofilmes serão analisados para ampliar a compreensão da minimização dos danos causados. Serão utilizados como objeto de estudo os biofilmes da bactéria *Escherichia coli*, que habita o sistema gastrointestinal de aves e mamíferos em sua maioria de maneira comensal, porém algumas cepas podem causar doenças moderadas a severas em todas as faixas etárias. A análise de fatores facilitadores de compartilhamento e distribuição de genes de resistência em biofilmes de *E. coli* e suas consequências são necessários para verificar os próximos passos para o controle dele.

## **ABSTRACT**

Microbial resistance to antibiotics is a public health problem, causing significant damage to the health of the population. In addition, there are political and economic implications. In society, there are consequences to anthropic actions, even the most subtle ones, which contribute to the resistance of microbial agents. Among them are the unconscious use of antibiotics, incorrect prescription, the spread of microorganisms among the world population, the encouragement of self-medication and the lack of access to basic sanitation. In this sense, the relationship between microorganisms and human beings can become extremely harmful, as it facilitates the formation and development of harmful biofilms. Microorganism communities produce this structure for adhesion to a surface, which in turn expands until reaching maturation and later dispersion. This formation aims to protect from external factors and symbiotic relationships, providing the flow of gene exchange and consequent increase in resistance to survival. Several works have been published on resistance to antimicrobial agents and biofilm formation. The impacts, consequences and forms of retention and prevention of biofilms will be analyzed to broaden the understanding of minimizing the damage caused. The biofilms of the bacterium *Escherichia coli*, which inhabit the gastrointestinal system of birds and mammals mostly in a commensal way, will be used as object of study, but some strains can cause moderate to severe diseases in all age groups. The analysis of factors that facilitate the sharing and distribution of resistance genes in *E. coli* biofilms and their consequences are necessary to verify the next steps for its minimization.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
3. MÉTODOS .....	11
4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	13
4.1 BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i> .....	13
4.1.1 GENÉTICA E VIRULÊNCIA <i>Escherichia coli</i> .....	15
4.1.2 CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICAS .....	18
4.1.2.1 <i>E. coli</i> ENTEROPATOGÊNICA (EPEC).....	19
4.1.2.2 <i>E. coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC).....	20
4.1.2.3 <i>E. coli</i> ENTEROINVASORA (EIEC) .....	21
4.1.2.4 <i>E. coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) e <i>E. coli</i> produtora da toxina de Shiga (STEC) 21	
4.1.2.5 <i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC).....	22
4.1.2.6 <i>E. coli</i> ADERENTE DIFUSA (DAEC) .....	22
4.1.2.7 SEMELHANÇAS ENTRE <i>Escherichia coli</i> PATOGÊNICAS .....	23
4.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS .....	24
4.2.1 RESISTÊNCIA BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i> .....	26
4.3 BIOFILME .....	27
4.3.1 BIOFILME de <i>Escherichia coli</i> .....	29
4.4 ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO DO BIOLFIME DE <i>Escherichia coli</i> .....	32
5. CONCLUSÃO .....	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por bactérias infecciosas e suas implicações a curto, médio e longo prazo são um tópico extremamente relevante e preocupante para a comunidade, academia e membros da política devido às consequências para a saúde pública geradas pela crescente resistência microbiana a antimicrobianos (O'NEILL et al., 2014).

De acordo com Instituto Butantan, em notícia publicada em 27/09/2021, a incidência de *Escherichia coli* patogênica causadora de diarreia em humanos atinge países de maior vulnerabilidade social e em desenvolvimento, principalmente devido a falta de saneamento básico, havendo em decorrência 2 milhões de mortes de crianças por diarreia no mundo.

A projeção de O'NEILL et al., 2014 prevê que até 2050, se continuarmos no mesmo ritmo que estamos haverá 10 milhões de mortes por resistência microbiana no mundo.

A resistência dos microrganismos a antimicrobianos trata-se de mecanismos genéticos naturais que aumentam a capacidade das bactérias de suportar o stress causado pelos antimicrobianos, ou seja, resistência bacteriana, sendo por mecanismos físicos, regulatórios e químicos. Porém existem mecanismos celulares capazes de auxiliar e acelerar o aumento de resistência a antimicrobianos (LOREIRO et al., 2016).

Os principais mecanismos que têm contribuído para a resistência dos microrganismos a antimicrobianos são a utilização indiscriminada de antimicrobianos ao longo dos anos. Para além dele existe a globalização crescente que aumenta o fluxo de pessoas entre diferentes lugares do mundo disseminando microrganismos que não estariam ali previamente (SCALDAFERRI et al., 2020).

Uma das bactérias relevantes para microbiologia e saúde pública global, tida como modelo de bactéria gram-negativa é a *Escherichia coli* que é uma habitante comensal do intestino de mamíferos e aves, incluindo humanos. Além disso, é utilizada como indicador fecal de corpos hídricos (DRUMOND et al., 2018).

Sua relevância também é sentida pelo fato de possuir cepas patogênicas que podem causar uma variedade de doenças intestinais e extra intestinais, como diarreia, infecção do trato urinário, septicemia, e meningite neonatal. Sendo ela uma bactéria que já apresenta a multirresistência em suas mutações, ou seja, algumas variações são capazes de resistir a mais de um tipo de antibióticos (DRUMOND et al., 2018).

A seleção de resistência a antimicrobianos por seleção natural, também pode ser adquirida por meio da formação de biofilme, que consiste em um conglomerado de bactérias

envolvidas em uma matriz extracelular, que se formam a fim de garantir sua sobrevivência em diferentes locais de forma comensal (MADIGAN ET AL., 2016).

Inicialmente ocorre a aderência de uma superfície por micro-organismos planctônicos, as células iniciam a agregação, posterior formação de matriz extracelular, liberação de compostos celulares benéficos até amadurecimento característico do biofilme até sua

liberação de células para colonização e formação de novos biofilmes (TREMBLAY et al., 2014).

Alguns estudos apontam o método que ocorreria a troca ou compartilhamento entre genes no biofilme, que por tratar-se de uma matriz extremamente complexa há uma redefinição do significado de um biofilme, onde estudos mostraram que microrganismos parte do biofilme são capazes de transcrever diferentes tipos de genes, que células planctônicas não conseguem, adquirindo uma resistência parental (MADIGAN et al., 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Relacionar, por meio da compilação de dados na literatura, as principais formas de compartilhamento e distribuição de genes, quais são os principais genes de resistência, e quais ações e alternativas estão vinculadas à minimização da resistência microbiana promovida pelo biofilme de *Escherichia coli*.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Identificar em trabalhos experimentais os tipos patogênicos causadores de diarreia nos seres humanos de *E. coli*, quais são suas principais formas de disseminação, transferência de genes e principais características de identificação.
- b) Analisar as principais aplicações da bactéria *E. coli* na sociedade, principais locais a serem encontrados e diferenciação entre cepas voltados a saúde pública.
- c) Identificar principais fatores de resistência microbiana da *E. coli*, verificando sensibilidade e resistência a antibióticos.
- d) Relacionar o comportamento da bactéria *E. coli* e fatores de resistência relacionados a biofilmes.

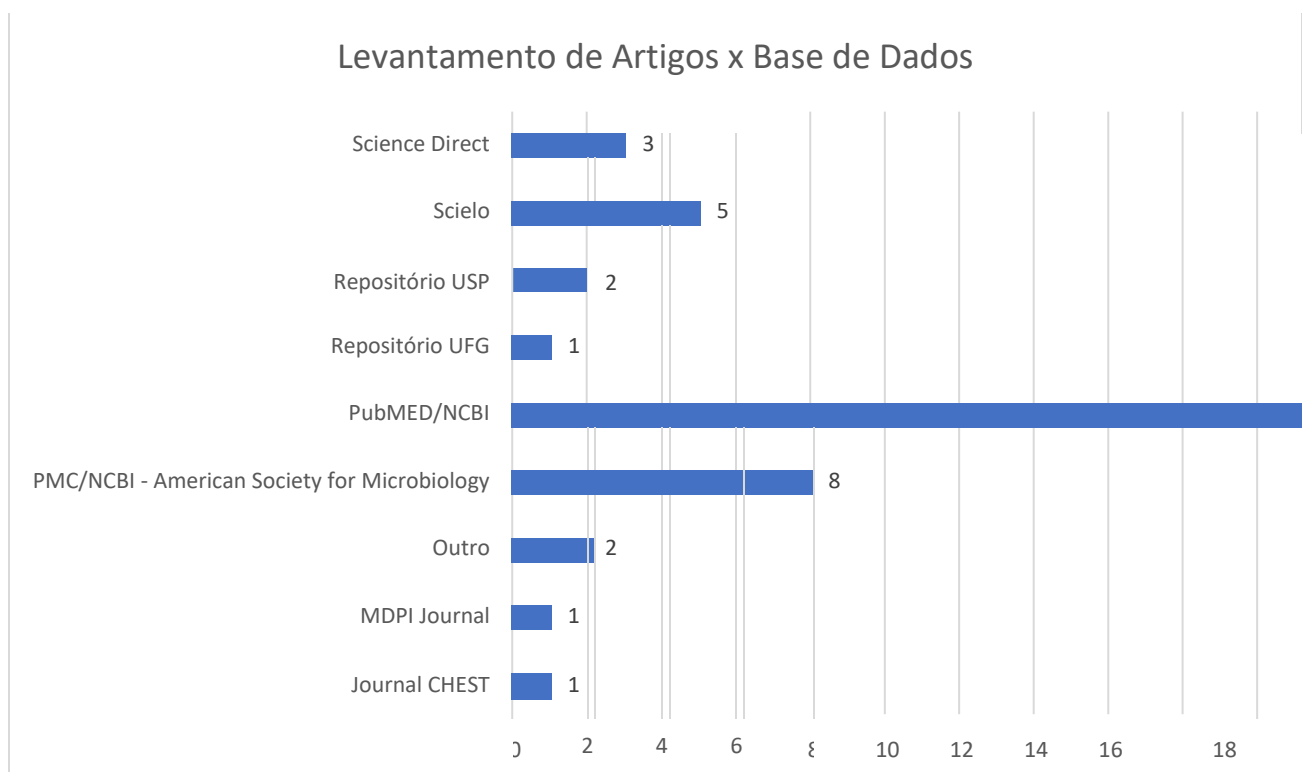
## **3. MÉTODOS**

O estudo foi realizado através de revisão bibliográfica em pesquisas realizadas em revistas científicas on-line, artigos acadêmicos e teses de trabalhos acadêmicos que abrangem o tema estabelecido com as palavras-chave em inglês e/ou português: biofilme, virulência, *E. coli*, compartilhamento de genes de bactérias no biofilme, remoção de biofilme, consequências de biofilme, biofilme *E. coli*, mecanismos compartilhamento *E. coli*, antibióticos, resistência à antimicrobianos e resistência do biofilme.

A pesquisa integrou as áreas de Microbiologia, Médica e Biotecnológica, porque são as áreas que mais possuem relevância ao tema, utilizando bases de dados consistentes como Scielo, NCBI (National Center for Biotechnology Information) em conjunto com PubMed e PMC vinculado a artigos da ASM (American Society for Microbiology), Repositório da USP, Repositório Science Direct, Repositório UFG, Jornais CHEST e MDPI (Open Access Journals). Além disso como base para conhecimentos específicos o livro Microbiologia de MADIGAN et al., Edição 14 foi utilizado para revisão e compreensão de processos relacionados a *E. coli*.

Como resultado, para esta revisão foram consultados em 42 artigos, distribuídos pelas bases de dados NCBI PubMed, NCBI PMC, Repositório USP e Scielo. A Figura 1 apresenta a quantidade de artigos para cada base de dados consultados.

Figura 1: Levantamento de artigos em relação a base de dados



Fonte: Levantamento feito pela autora.

A método de revisão utilizado para este trabalho foi a integrativa e interpretativa, que levou em conta os passos que a regem, consistindo na elaboração da questão principal em torno do tema voltada para *E. coli* patogênicas e fatores envolvidos, além de suas implicações na saúde pública. O passo seguinte foi a busca e amostragem da literatura que, a nível de

dificuldade de encontrar os dados pode ser considerado de médio acesso, facilitado pelo fato da bactéria *E. coli* ser considerada uma bactéria modelo gram-negativa, havendo artigos nas mais diversas áreas. Entretanto, o fator da bactéria *E. coli* ser bem estabelecida e fortemente estudada dificultou a busca por conteúdo base e básico sobre ela, sendo mais detalhados nos livros didáticos o que auxiliaram no entendimento e construção dos conceitos base relacionados a ela (LIMA&MIOTO, 2007).

Houve também a coleta de dados considerando as informações relevantes de acordo com os objetivos a serem incluídos, a análise crítica e interpretativa dos estudos a serem selecionados e incluídos e, por fim, a discussão de todas as informações e pontuações levantadas e elaboração de uma conclusão e consenso em torno do tema trabalhado (LIMA&MIOTO, 2007).

#### **4. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO**

##### **4.1 BACTÉRIA *Escherichia coli***

A bactéria *E. coli* faz parte da família Enter-bacteriaceae, e é classificada como gram-negativa, de formato bacilar e fermentadora de lactose. É uma das bactérias mais amplamente estudadas devido ao longo tempo de descoberta e por suas características, sendo seu rápido crescimento uma das principais vantagens, pois em boas condições têm capacidade de tempo de geração de aproximadamente 20 minutos. Além disso, desde o primeiro reporte em 1997 do genoma desta bactéria mais de 400 mil genomas foram sequenciados, conseguindo desta forma acompanhar a evolução da espécie em mais de 50.000 gerações (TENAILLON et al., 2016).

A *E. coli* é conhecida como bactéria modelo o que a faz ser de grande utilização para biotecnologia, pois, além de seu pouco tempo de geração e grande tempo de estudo dela, a mesma pode ser encontrada no corpo humano e de animais (TENAILLON et al., 2016).

Nos animais ela está presente em sua maioria o intestino dos mesmos devido a fonte de carbono, energia, umidade, pH e temperaturas moderados ideais para seu crescimento, o que faz com que linhagens que habitam o intestino sejam resistentes ao pH ácido, sendo sua quantidade determinada pela dieta e hábitos do hospedeiro (GORDON, 2013).

Além da presença dela no intestino de animais, um papel importante relacionado a *E. coli* que a faz ser tão conhecida está relacionada a utilização dela como indicador fecal visando a verificação da qualidade da água. Normalmente a concentração de *E. coli* por grama de fezes de animais pode variar de acordo com a espécie do hospedeiro, sendo o

normal por volta de  $10^7$  a  $10^{10}$  no trato intestinal de humanos e  $10^4$  a  $10^6$  em animais domésticos, estes limites auxiliam na determinação permitida na água levando em conta seus indicadores (BERTHE, 2013).

A utilização dos indicadores microbianos na qualidade da água está diretamente relacionada a saúde pública devido as variações da bactéria *E. coli* responsáveis por causar infecções gastrointestinais, sendo associadas a água potável ou águas recreacionais. Para a análise da água há tanto a análise de coliformes, quanto a análise de coliformes fecais, representado pela *E. coli*, pois se em uma análise não for encontrada a *E. coli*, não significa necessariamente que a água está ideal para consumo (DEVANE et al., 2020).

Os métodos de detecção de coliformes na água já é amplamente utilizado e padronizado, o mais comumente utilizado consiste na filtração por membrana filtrante (MF), onde ao filtrar uma quantidade específica de água, 100 mililitros, os microrganismos ficam retidos nela e ela posteriormente é inserida em uma placa de meio de cultura de eosina azul de metileno (EAM), que é um meio seletivo para bactérias gram-negativas, fermentadoras de lactose e mais especificamente é capaz de evidenciar bactérias com maior capacidade fermentativa, tornando mais fácil a identificação da *E. coli* (ISHII et al., 2008; DEVANE et al., 2020).

Outros meios seletivos também são capazes de identificar os coliformes totais e a *E. coli* especificamente, podendo ser mais precisos e rápidos do que os que utilizam o meio EAM, sendo conhecimentos como testes de substrato definido, que prevê a manifestação exclusiva da bactéria a ser estudada facilitando o processo não apenas de identificação, mas também de tratativas para a linhagem específica (DEVANE et al., 2020).

A bactéria *E. coli* possui ampla diversidade quando falamos da cepa espécie, sendo divididos em dois grandes grupos iniciais que são patogênicos e não patogênicos, mas vale ressaltar que a maioria é classificada como não patogênica, entretanto as variações patogênicas, quando ocorrem podem causar doenças gastrointestinais relativamente graves (HUDAULT, 2001).

A forte sobrevivência da bactéria *E. coli* é amplamente estudado, principalmente relacionada as condições de resistência bacteriana e virulência (para variantes patogênicas). Para esta bactéria as condições ideais no meio ambiente então pautadas de forma similar a

seu desenvolvimento nos animais endotérmicos (mamíferos e aves), pois anteriormente achava-se que a ela somente sobreviveria em seu hospedeiro, porém estudos recentes mostraram que são capazes de sobreviver no meio ambiente, solo, areia e sedimentos de clima tropical, temperado e subtropicais (ISHII & SADOWSKY, 2008; JANG et al., 2017).

As condições de crescimento, desenvolvimento e *fitness* (adaptabilidade) em meio ambiente são diretamente impactadas pelos seguintes pontos:

I – Temperatura: para animais endotérmicos ela sobrevive a uma temperatura de 35-40°C, enquanto fora deste ambiente ela pode sobreviver a ambientes próximos a 30°C. A variações ocorrem de acordo com o genótipo de cada CEPA (JANG et al., 2017).

II – Disponibilidade de água: devido a capacidade adaptativa não exclusiva desta bactéria, que consiste em ajustar sua membrana e genes reguladores em ciclos de escassez ou disponibilidade de água, porém seu crescimento é relativamente menor na escassez, indicando um ponto crítico em relação ao seu crescimento e desenvolvimento (EVANS and WALLENSTEI, 2012).

III – Disponibilidade de nutrientes: a *E. coli* precisa de três nutrientes fundamentais para sua sobrevivência e crescimento, que são carbono, fósforo e nitrogênio, apesar da disponibilidade ser maior no sistema gastrointestinal de animais, ela se desenvolve bem no meio ambiente devido a sua capacidade de adquirir energia e degradar diferentes tipos de carbonos (GORDON, 2013).

IV – Radiação solar: este fator é negativo quanto ao crescimento e desenvolvimento microbiano, devido a seus raios pode provocar danos no DNA e oxidação do conteúdo da célula, sendo por exemplo danoso quando utilizado como indicador de coliformes fecais, variando a incidência de acordo com a turbidez da água (GORDON, 2013).

#### **4.1.1 GENÉTICA E VIRULÊNCIA *Escherichia coli***

A investigação dos genomas consiste no mapeamento, sequenciamento, análise e comparação de material genético (DNA ou RNA), sendo fundamentais para averiguar possíveis mudanças evolutivas, alterações gênicas e identificar genes específicos patogênicos ou beneficiários a produção biotecnológica para o caso dos microrganismos (O'NEILL, 2014).



O primeiro genoma a ser sequenciado foi o de um vírus MS2, em 1977 por Fred Sanger, conhecido como primeira geração Método didesoxi de Sanger, que consiste na fluorescência ou radioatividade e ampliação do DNA (MADIGAN et al., 2016).

Além deste, outras três gerações são descritas considerando métodos mais tecnológicos, mas todos com base na primeira geração. A Tabela 1 retirada do livro de MADIGAN et al. 14 Edição – Microbiologia, descreve as 4 gerações, seus métodos e características.

**Tabela 1:** Métodos de Sequenciamento de DNA por 4 Gerações.

Métodos de Sequenciamento de DNA		
Geração	Método	Características
Primeira Geração	Método didesoxi de Sanger (radioatividade ou fluorescência; amplificação de DNA)	Comprimento de leitura: 700-900 bases Usado no projeto do genoma humano
Segunda Geração	Pirossequenciamento 454 (fluorescência; amplificação de DNA; massivo em paralelo) Illumina/método Solexa (fluorescência; amplificação de DNA; massivo em paralelo) Método SOLiD (fluorescência; amplificação de DNA; massivo em paralelo)	Comprimento de leitura: 400-500 bases Usado para sequenciar o genoma de James Watson (finalizado em 2007) Comprimento de Leitura: 50 - 100 bases Genome do panda gigante (2009; Beijing Genome Institute) Genoma do Denisovan (2010) Comprimento de leitura: 50 - 100 bases
Terceira Geração	Sequeciador HeliScope de molécula única (fluorescência; molécula única) Pacific Biosciences SMRT (fluorescência; molécula única, zero-mode waveguide)	Comprimento de leitura: até 55 bases Melhoramento de precisão do DNA de fósseis Comprimento de leitura: 2.500 - 3.000 bases
Quarta Geração	Íon torrent (eletrônico - pH; amplificação de DNA) Oxford nanoporo (eletrônico - atual; molécula única, em tempo real)	Comprimento de leitura: 100 - 200 bases Sequenciou o genoma do Gordon Moore, cofundados da Intel (autor da lei de Moore), 2011 Comprimento de leitura: milhares de bases A unidade portátil MiniON é aproximadamente do tamanho de um dispositivo USB

**Fonte:** Tabela 6.2 Métodos de sequenciamento de DNA (MADIGAN et al., 2016), adaptado pela autora.

Após o sequenciamento é necessário realizar a montagem gênica, que irá identificar a partir dele quais sequências são realmente funcionais deduzindo sua ordem. E por último é realizada a anotação genômica que consiste na utilização da bioinformática para realizar a leitura dos dados sequenciados (ácidos nucleicos e proteínas) e identificar possíveis e potenciais codificadores (MADIGAN et al., 2016).

A *E. coli* conforme citado anteriormente é uma bactéria modelo para gram-negativas, e por este fato seu genoma além de já ter sido sequenciado, várias linhagens também foram sequenciadas para que o grau de variabilidade da espécie seja estudado também (APARNA et al., 2008).

O artigo publicado na revista Nature por TENAILLON et al. em 2016 “Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment”, consiste em um estudo realizado por um grupo de cientistas para verificar o grau evolutivo da *E. coli*, em uma escala de 50.000 gerações, avaliando mutações e genes específicos, e se foram benéficas ou deletérias.

Para este atingir o objetivo do estudo, 12 linhagens distintas através de 50.000 gerações provenientes de experimentos de evolução a longo prazo, utilizando a plataforma de bioinformática para leitura de sequenciamento de DNA chamada Illumina, ao qual puderam verificar pontos relacionados a mutação (TENAILLON, 2016).

No total foram encontrados 14.572 pontos de mutação entre genes de inserções, deleções e duplicações, e dentre as dinâmicas genômicas foi observado que o aumento do *fitness* realmente ocorre em grupos onde há um maior número de mutações, porém a diferença entre eles não era muito superior de mutações benéficas constatadas em relação as mutações deletérias e duplicações (transferência horizontal) que acabaram dificultando a análise identitária destas mutações (TENAILLON, 2016; BELD et al., 2018).

A transferência de genes pode ocorrer em duas frentes principais, transferência vertical e transferência horizontal. A transferência vertical ocorre com base na replicação do genoma e divisão celular, já a transferência horizontal ocorre quando uma célula “doa” parte de seu material genético a outra célula por meio de transdução, transformação e conjugação tornando a identificação dos genes advindos desta transferência mais difíceis de serem identificados, sendo possível somente com a comparação do mapeamento, verificando por exemplo a ancestralidade de um determinado gene (WU XY et al., 2007).

Outro elemento importante relacionado a transferência de genes e evolução gênica está relacionado aos elementos móveis, que consistem em segmentos de DNA que se movimentam no interior de moléculas de DNA de seu hospedeiro, adicionando seus genes ao genoma dele por meio da enzima transponase (WU XY et al., 2007; MADIGAN et al., 2016).

Os elementos móveis mais comuns são plasmídeos, bacteriófagos e transposons, sendo seu nível de ocorrência e suscetibilidade de alteração genética medida através da atividade enzimática e maior em microrganismos que estão em constante mudança evolutiva, especialmente os patogênicos (DESVAUX et al., 2020).

Estes elementos móveis, uma vez transferidos podem resultar genes codificadores de características funcionais do microrganismo, como metabolismo, transporte e regulação no caso da *E. coli*, incluindo também a resistência a antibióticos e produção de toxinas (DESVAUX et al., 2020).

O índice de transferência da bactéria *E. coli* ocorre por bacteriófago, plasmídeo e transposons, com fatores de virulência vinculados a eles, que são toxina shiga através do bacteriófago. As enterotoxinas, fator de colonização dos pili hemolisina, urease, fator de resistência a soros, fatores de aderência e fatores de invasão celular por meio dos plasmídios e por último, as enterotoxinas termoestáveis, sideróforo aerobactina, hemolisina e óperons de pili por meio dos transposons (MADIGAN et al., 2016; PAKBIN et al., 2021).

Outro fator que em conjunto com os anteriores favorece o aumento da resistência é a formação de biofilmes por *E. coli* que ao formar a união de seres sésseis possibilita através da estrutura e proximidade as transferências por bacteriófagos, plasmídeos e transposons (PAKBIN et al., 2021).

Em relação a identificação de genes patogênicos, estes ocorrem através da comparação entre linhagens, sendo o genoma base ou cerne que é aquele que possui os genes que a espécie possui em comum em relação ao pangenoma, que contém o mesmo e mais inserções genéticas além das necessárias para o funcionamento do organismo, chamadas de ilhas cromossômicas podendo ser classificada como ilhas patogenicidades, e estas contribuem para a virulência, especialmente para o caso da *E. coli* (MADIGAN et al., 2016; PAKBIN et al., 2021).

#### **4.1.2 CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICAS**

A *E. coli* faz parte da flora intestinal normal dos mamíferos e aves, vivendo de forma comensal com seus hospedeiros, porém algumas linhagens podem ser potencialmente patogênicas, causando doenças moderadas a graves como diarreia em adultos e crianças, infecção do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (ORSKOV et al., 1992).

As cepas patogênicas são caracterizadas em antígenos que representam uma resposta imune, sendo antígeno O, que é um polímero de oligossacarídeos em repetição, que faz parte da camada de lipo-polissacarídeos, o antígeno K que é um polissacarídeo ácido capsular, de textura em muco e espessa e o antígeno H é um antígeno flagelar formado pela polimerização da flagelina resultando a patogenicidade (RILEY, 2020).

As bactérias *E. coli* patogênicas são divididas em 2 grupos, que são: IPEC que está relacionada a patógenos intestinais e ExPEC que está relacionada a outras patógenos extra intestinais como no trato urinário, corrente sanguínea, abdômen, articulações, meninges, pele e tecidos moles causadas por ela. Além desta divisão, há também a separação entre CEPAS que correspondem a diferentes tipos de doenças e sintomas, como por exemplo as enteropatogênicas intestinais que são voltadas especificamente para IPEC (RILEY, 2020).

Pode-se elencar seis cepas principais de IPECs: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) diferindo entre si de acordo com os fatores de virulência supracitados (SOUZA, 2016).

#### **4.1.2.1 *E. coli* ENTEROPATOGÊNICA (EPEC)**

A *E. coli* enteropatogênica (EPEC) é considerada uma categoria variável entre os grupos patogênicos de *E. coli* e causa de doenças intestinais moderadas a graves na população em geral, principalmente crianças de até cinco anos e é o grupo mais estudado por ter sido o primeiro identificado e realizada a sorotipagem (SOUZA, 2016).

Associada a condições precarizadas de habitação, ausência de água tratada para consumo, alimentos contaminados e saneamento básico, pode ser isolada de diferentes meios, estando presentes em animais domésticos e silvestres, ambientes naturais e alimentos processados ou não (SOUZA, 2016). Em consequência a isso, segundo WATURANGI et al, 2021 a EPEC é a maior causadora de doenças intestinais por alimentação, em 2010 foram estimados 420.000 casos globalmente.

Em estudo realizado por HARTLAND et al, 2013 dentre as variações de *E. coli* patogênica, a EPEC é considerada uma das que possui maior virulência associada à sua estrutura potencializando a infecção.

A incidência da infecção por EPEC se dá a aderência ao tecido epitelial intestinal, em um local chamado de “localized adhesion (L/A), causando lesões características por meio da A/E (attaching and effacing, destruindo microvilosidades e formando uma característica dianorreica chamada de pedestal (SOUZA, 2016; WATURANGI et al, 2021).

Ainda segundo SOUZA, 2016, esta adesão ocorre em três estágios diferentes. O primeiro está relacionado ao contato da célula hospedeira e bactéria pili formador de feixes

tipo IV voltados para a capacidade de adesão e são codificados por plasmídeos, sendo o principal o EAF (adherence factor), seguido de sinais de transdução na ilha de patogênica do genoma denominada locus of enterocyte effacement (LEE), e finalizado pela aderência íntima ao tecido para a formação da taça.

Já de acordo com WATURANGI et al, 2021, a inibição desta bactéria deveria ser através dos fagócitos da EPEC, uma vez que a utilização de conservantes pode acabar por desencadear efeitos colaterais maléficos aos consumidores, sendo desta forma considerada uma boa alternativa de resolução.

#### **4.1.2.2 *E. coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)**

A *E. coli* enterotoxigênica ou ETEC, é amplamente conhecida como diarreia do viajante, sendo ela a maior responsável causadora, seguida por *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter*. Além disso, pode ser encontrada em locais de maior vulnerabilidade social e emergente, e sendo causadora inclusive de mortes pediátricas e ocorrências em adultos por sua alta resistência a antimicrobianos apresentadas (FLECKENSTEIN et al, 2019).

Esta bactéria constituinte da família *Enterobacteriaceae* possui o fator de multiresistência a antibióticos o que contribui com sua incidência no mundo, ademais, ela possui um agravante em sua identificação que só pode ser realizada através de testes moleculares, não sendo distinguível da *E. coli* comensal (FLECKENSTEIN et al, 2019).

O mecanismo agregativo da ETEC ocorre principalmente através do pilis ou fimbriae, que são estruturas de adesão, sendo seu fator patogênico a síntese de enterotoxinas, que são toxina termolabile (LT) e toxina termodeset (ST), sendo compartilhadas em grande parte por plasmídeos, porém a toxina ST já foi encontrada em transposons também. Sendo que estas duas toxinas atuam aumentando o nível dos nucleotídeos cAMP e cGMP presentes nas células do intestino, resultando na perda de água de íons. (RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002).

Para sanar e minimizar este problema na saúde pública, estudos têm apresentado a criação de vacinas capazes de inibir as especificamente as toxinas LT e ST a ser aplicada na infância justamente pelo risco de mortalidade apresentado por ela. Ainda existem GAPs a serem sanados quanto ao desenvolvimento devido a necessidade de mapear as variações da bactéria ETEC e assim contribuir para uma maior eficiência (KHALIL et al, 2021).

#### **4.1.2.3 *E. coli* ENTEROINVASORA (EIEC)**

O grupo de *E. coli* EIEC (enteroinvasora) provoca uma diarreia líquida, podendo haver sangue e muco, uma diferença entre ela e os grupos anteriores é que seu atingimento é associado a surtos da doença e não casos mais isolados sendo similar a *Shigella spp* geneticamente e bioquimicamente (PASQUA et al, 2017).

A incidências das doenças causadas pela EIEC se dão através de sua transmissão por ingestão de alimentos contaminados, água contaminada não tratada e de indivíduo para indivíduo, atingindo as diferentes faixas etárias acima de 6 meses de idade e sendo incidente principalmente em países em desenvolvimento (PASQUA et al, 2017).

A patogenicidade da EIEC está relacionada a invasão do epitélio do cólon, extremidade inferior do trato digestivo, que ocorre através da adesão da bactéria a mucosa intestinal por atuação de citosinas, quimiocinas, moléculas de adesão e óxido nítrico multiplicando-se na célula e disseminando a patogenicidade em células saudáveis (RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002; BELD et al., 2018).

O seu fator de virulência associado a ele está principalmente relacionado ao plasmídeo específico denominado pInvm responsável pela codificação de proteínas e substâncias envolvidas neste processo e expressão cromossômica de forma também semelhante a *Shigella spp*, e, portanto, estudos realizados levantam a hipótese de um ancestral em comum com ambas para justificar esta similaridade (BELD et al, 2018).

#### **4.1.2.4 *E. coli* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC) e *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)**

A *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) é uma bactéria *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC), também denominada *E. coli* verotoxigênica (VTEC), em função do efeito citotóxico em células Vero, relacionadas a produção de pelo ou menos uma das toxinas shiga que auxilia no processo de virulência, sendo também possível através da ilha de patogenicidade LEE idêntica à *E. coli* EPEC, exceto pela dinâmica de proteínas envolvidas no processo, mas possuem também o fator de virulência *eae* relacionado a adesão a célula (COURA et al., 2017).

A EHEC e EPEC possuem grandes similaridades e estas contribuem para as interações e trocas gênicas e de fatores de disseminação ocorram com mais facilidade, enquanto a EPEC atua como patógeno para humanos, a EHEC atua como patógeno mais para

animais, além disso um desafio encontrado em relação a ambas está relacionado a identificação, que deve ser feita de forma molecular para que ela seja possível, bem como os sintomas vinculados a cada uma delas (COURA et al., 2017).

Os sintomas relacionados a ocorrência da STEC são caracterizados por dor abdominal, diarreia aguda com sangue, febre que podem ser causados pela ingestão de frutas, vegetais ou água contaminados, leite não fervido e principalmente através da ingestão de carne crua ou não totalmente cozida justamente pelo fato de a STEC ocorrer em gados, sendo seu principal reservatório é o intestino do gado, também identificando moscas como vetores de cepas enterohemorrágicas (NAWROCKI et al., 2020).

Em alguns casos pode causar diarreia sangrenta diretamente relacionado aos níveis de toxina produzidas pelos genes de virulência (plasmídeos ou bacteriófagos) podendo também gerar doenças renais (RODRIGUEZ-ANGELEZ, 2002; NAWROCKI et al., 2020).

#### **4.1.2.5 *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)**

A *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) possui maior incidência em países emergentes, sendo mais frequente em crianças com até 2 anos e viajantes, e seus sintomas são caracterizados como diarreia persistente, ou seja, com duração maior que 14 dias podendo levar a morte dos indivíduos se não tratada (JOFFRÉ et al., 2020).

As bactérias por sua vez colonizam os intestinos e podem causar inflamações no cólon retal, ela em si possui similaridades com a cepa EPEC devido a sua característica agregativa às células, porém possui um padrão característico diferente dela, devido ao mecanismo de auto aglutinação (plasmídeo AA) que possibilita entre elas a adesão à superfície intestinal (JOFFRÉ et al., 2020; DIAS et al., 2020).

O gene *aggA* é responsável pela codificação de uma fimbria agregativa I (AAF/I), compartilhada por plasmídeo, sendo que suas cepas possui a característica da produção e secreção de muco aumentando o fator de agregação destas bactérias, formando um filme fino que torna a diarreia recorrente em seus hospedeiros (DIAS et al., 2020).

#### **4.1.2.6 *E. coli* ADERENTE DIFUSA (DAEC)**

A *E. coli* DAEC também é caracterizada por sua ocorrência em países em desenvolvimento e majoritariamente em crianças maiores de seis meses, associada a introdução alimentar infantil (JAVADI, 2017).

A *E. coli* aderente difusa pode ser encontrada no cromossomo ou plasmídeo, sendo de todas as classificações de cepas patogênicas a menos estudada quanto ao fator de virulência e mecanismo do patógeno (JAVADI, 2017; SERVIN, 2014).

O fator de virulência identificado é relacionado a fimbria sendo encontrados no cromossomo ou no plasmídeo, sendo seu fator determinante e diferenciados a capacidade de aderência difusa, ou seja, em larga escala mantendo um padrão de adesão (SERVIN, 2014).

Com isso, conclui-se que as bactérias *E. coli* patogênicas causadoras de diarreia (IPECs) são importante objeto de estudo e foco dada sua influência direta na saúde pública, isto ocorre, pois, a doença é a terceira maior causa de mortalidade infantil dada em sua maioria nas localidades em desenvolvimento e emergentes, como África, Sul da Ásia e América Latina (JOFFRÉ et al., 2020).

Ainda em relação a incidência, a associação entre as localidades e ocorrência da doença se dá pelo precário acesso da população em políticas públicas que forneçam água tratada, saneamento básico, moradia digna e educação básica voltada a higienização, cozimento e condições adequadas dos alimentos (JUNG et al., 2017; GOMES et al., 2016).

Além da incidência na infância, também podem ocorrer em viajantes e adultos, porém em menor quantidade. Um ponto importante a ressaltar é que as interações entre as bactérias *E. coli* ocorrem não somente entre sua própria CEPA, mais também entre elas, facilitando a troca de informações genéticas (GOMES et al., 2016).

#### **4.1.2.7 SEMELHANÇAS ENTRE *Escherichia coli* PATOGÊNICAS**

A CEPA de *E. coli* patogênica que mais apresenta interação direta com as outras CEPAs é a EPEC, a qual foi a primeira a ser descoberta e estudada, podendo ser considerada uma versão estrutural mais simples e comum do que as outras, já que se trata de mecanismos de adesão as quais todas possuem similaridades relacionadas a esse fator, além dos mecanismos que diferem entre si (GOMES et al., 2016).

Quanto a identificação das bactérias *E. coli* patogênicas, em sua maioria testes moleculares se fazem necessários para identificação e separação das CEPAs comensais para elas, este é um desafio quando se fala deste quesito dado o consumo de tempo até identificação e possível tratamento (JUNG et al., 2017).

Segundo JOFFRÉ et al., 2020 os tratamentos a serem proporcionados para a ocorrência de diarreia universalmente deveriam ser primeiramente tratados com a constante



hidratação oral, aplicação de fluídos de forma intravenosa, reposição de zinco, alimentação contínua e amamentação para os casos infantis, além de revisão de práticas de gestão em comunidade (JOFFRÉ et al., 2020; O'NEILL et al., 2014).

Entretanto, a utilização constante de antimicrobianos para o tratamento das infecções por bactérias por *E. coli* acabou favorecendo o aumento e aceleração do processo de desenvolvimento natural de resistência a eles, reduzindo o efeito inibitório e associada aos fatores de virulência aumentam a probabilidade de formação de filmes, que por sua vez contribui para o agravamento dos quadros de doenças dianorreicas por *E. coli* (JOFFRÉ et al., 2020; O'NEILL et al., 2014).

## 4.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A resistência de bactérias a antimicrobianos é um fator que contribui para o seu sucesso reprodutivo (*fitness*) como ser vivo, existindo fatores que podem contribuir para o aumento da resistência à antimicrobianos, sendo desencadeada pela evolução da própria espécie e ecologia do microrganismo. E por meio das atividades humanas, que por sua vez acabam por acelerar o processo de resistência por meio da seleção natural, e contribuir com o aumento de microrganismos multirresistentes e conseqüentemente, no caso de microrganismos patogênicos, infecções mais nocivas e difíceis de serem tratadas (HARBARTH et al., 2005).

Para HARBARTH et al., 2005, os determinadores que influenciam a disseminação da resistência microbiana em *E. coli* podem ser agrupados em 4 categorias, sendo a previamente citada patogenicidade e ecologia microbiana, prescrição médica de antimicrobianos, características populacionais e política e saúde públicas, havendo determinantes para cada uma das categorias e possíveis formas de avaliar os níveis de cada um e intervenções para minimização da resistência microbiana.

As categorias propostas também são amplamente discutidas em outros estudos relacionados a resistência microbiana, como: JOFFRÉ et al., 2020, JUNG et al., 2017 e GOMES et al., 2016, abordando fundamentalmente evolução acelerada das bactérias, virulência e interação entre CEPAs patogênicas e globalização voltada para interação entre pessoas do mundo e facilitação de transmissão e carreamento de genes resistentes, sendo assim encaixada em duas dimensões propostas por HARBARTH et al., 2005 que são ecologia microbiana e de patógenos e características populacionais.

Além destas categorizações, a própria utilização de antimicrobianos desenfreada acaba por também atuar como facilitador dela, desencadeando os mecanismos de resistência e tornando mais difícil a inibição dela (JUNG et al., 2017).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos das bactérias são divididos em quatro grupos: destruição e alteração por meio de enzimas, alteração da permeabilidade celular reduzindo o aumento do antimicrobiano na célula ou através das bombas de efluxo das células bacterianas, característico da família *Enterobacteriace* as tetraciclinas, alterações moleculares nas moléculas onde os antibióticos atuam. E por último, através da produção de moléculas alvo dos antimicrobianos que não são inibidas por ele e ao mesmo tempo seguem produzindo as moléculas alvo originais não deixando com que a célula seja inibida (LOUREIRO et al., 2016; JUNG et al., 2017).

As bactérias gram-negativas possuem importante fator evolutivo de resistência que está relacionado a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, que atuam impedindo que os  $\beta$ -lactâmicos (antimicrobiano) que interferem na integridade da parede bacteriana (LOUREIRO et al., 2016).

Segundo o artigo LOUREIRO et al. (2016), na década de 60 após a introdução da ampicilina como mecanismo de ação as *Enterobacteriace*, tornou-se um problema de saúde pública, porque iniciou-se a transferência por plasmídeos de genes  $\beta$ -lactâmicos de resistência, codificando 2 importantes enzimas, a  $\beta$ -lactamases de serina temoniera (TEM) e sulfhydryl variable (SHV).

Ainda segundo LOUREIRO et al. (2016), em conjunto com a introdução do mecanismo de ação cefalosporina de terceira geração, foram identificados genes mutados de TEM e SHV principalmente nas espécies *Klebsiella* spp e *Escherichia coli*, ampliando o mecanismo de resistência em relação as  $\beta$ -lactamases, denominado por ESBL (Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases).

A partir deste amplo espectro houve o surgimento de duas famílias de enzimas  $\beta$ -lactamases de grande importância quando relacionada a resistência, sendo a cefotaximases Munich (CTX-M) a família que mais conseguiu se disseminar por todos os continentes do mundo e as enzimas carbapenemases, que devido ao aumento do uso do carbapenemos resultou no aumento da disseminação da resistência a ele (JUNG et al., 2017).

#### 4.2.1 RESISTÊNCIA BACTÉRIA *Escherichia coli*

As bactérias *Escherichia coli* patogênicas apresentam em sua estrutura genes de resistência e multirresistência que auxiliam em sua maior sobrevivência e conseqüentemente maior compartilhamento destes genes de resistência a antimicrobianos (LOUREIRO et al., 2016).

De acordo com o artigo por VASCONCELOS et al. (2010), em análise de resistência antimicrobiana da bactéria *E. coli* há a susceptibilidade da bactéria em relação aos principais antimicrobianos: Ampicilina (10 µg), Ácido Nalidíxico (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Imipinem (10 µg), Nitrofurantoina (300 µg), Sulfazotrin (25 µg) e Tetraciclina (30 µg).

Em estudo realizado por MAAL-BARED et al., 2013 no Canadá, que efetuou a avaliação de perfil antimicrobiano em corpos d'água próximos a crescimento de bovinos em sedimentos e biofilmes localizados em pedras a beira rio, mostra além da susceptibilidade desses antimicrobianos a resistência a eles, que também é favorecida no ambiente aquático, ambiente no qual a *E. coli* é bem adaptada, sendo utilizada inclusive como indicador de qualidade da água conforme já citado.

O estudo de VASCONCELOS et al., 2010 em específico realizou com o teste com um total de 43 cepas de *E. coli* provenientes do Açude Santo Anastácio (Ceará) através do crescimento da colônia em meio TSA, posteriormente testagem de turbidez em 0,5 da escala McFarland aferida em espectrofotômetro, semeadura em ágar Mueller-Hinton e por último inserção dos antimicrobianos e análise da sensibilidade através dos halos formados entre bactéria e antimicrobiano, classificando-as como sensível, intermediária e resistente. Sendo este método denominado antibiograma, amplamente utilizado para análise de resistência microbiana.

Em ambos a *E. coli* apresenta maior resistência respectivamente a ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e por último nitrofurantoina, bem como a apresentação de multirresistência para tais, principalmente à Tetraciclina, mostrando a importância de haver análises constantes nos corpos d'água, que são resultantes de descarte por empresas, hospitalar ou doméstico contribuindo para o aumento dela (VASCONCELOS et al., 2010; MAAL-BARED et al., 2013).

Outro estudo por RAMADAN et al., 2020 que estuda resistência antimicrobiana e diversidade genética de *E. coli* também apresentou como resultados uma maior resistência a ampicilina, tetraciclina, sulfamidas e estreptomicinas, respectivamente, em isolados de humanos, carcaças de carnes bovinas e carne de aves adquiridos em supermercados e açougues no Egito.

Estes estudos abordados apresentam resultados aos quais a resistência de *E. coli* a antimicrobianos é maior em tipos específicos como ampicilina e tetraciclina podendo ser relacionados a seu uso mais frequente e comum principalmente para animais de consumo que acabam por, em contato com a água ocasionar a ampliação desta resistência (VASCONCELOS et al., 2010; RAMADAN et al., 2020 e MAAL-BARED et al., 2013).

Além disso, ambos estudos por RAMADAN et al., 2020 e MAAL-BARED et al., 2013 propuseram que a maior resistência microbiana apresentada está na água e nos biofilmes específicos de *E. coli*, associando a maior resistência microbiana a união destas bactérias.

Os autores MAAL-BARED et al., 2013 realizaram a análise entre bactérias *E. coli* sésseis e em biofilme e concluíram que além de maior resistência uma vez que estão unidas, a facilitação das trocas gênicas também ocorre com mais facilidade e rapidez tornando-a potencialmente multirresistente e mais difícil de ser inibido, acabando por tornar-se um potencial risco para a saúde pública.

### **4.3 BIOFILME**

Os biofilmes bacterianos são definidos como seres planctônicos que aderem a determinada superfície, envolvidos em uma matriz extracelular polimérica hidratada (EPS) sintetizada por eles mesmos iniciando a formação do biofilme (FANG et al., 2018).

Universalmente o biofilme é dividido em 5 etapas do ciclo de formação. A primeira etapa consiste na fixação que pode ocorrer rapidamente ou não com o auxílio de sinais ambientais característicos das respectivas espécies por crescimento logarítmico. Estes sinais estão relacionados a todas as condições necessárias para o desenvolvimento dos organismos, disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura entre outros (FANG et al., 2018).

Os biofilmes estão mais suscetíveis a serem formados em superfícies irregulares (Figura 1) devido ao difícil acesso de fatores externos que possam removê-lo, além disso,

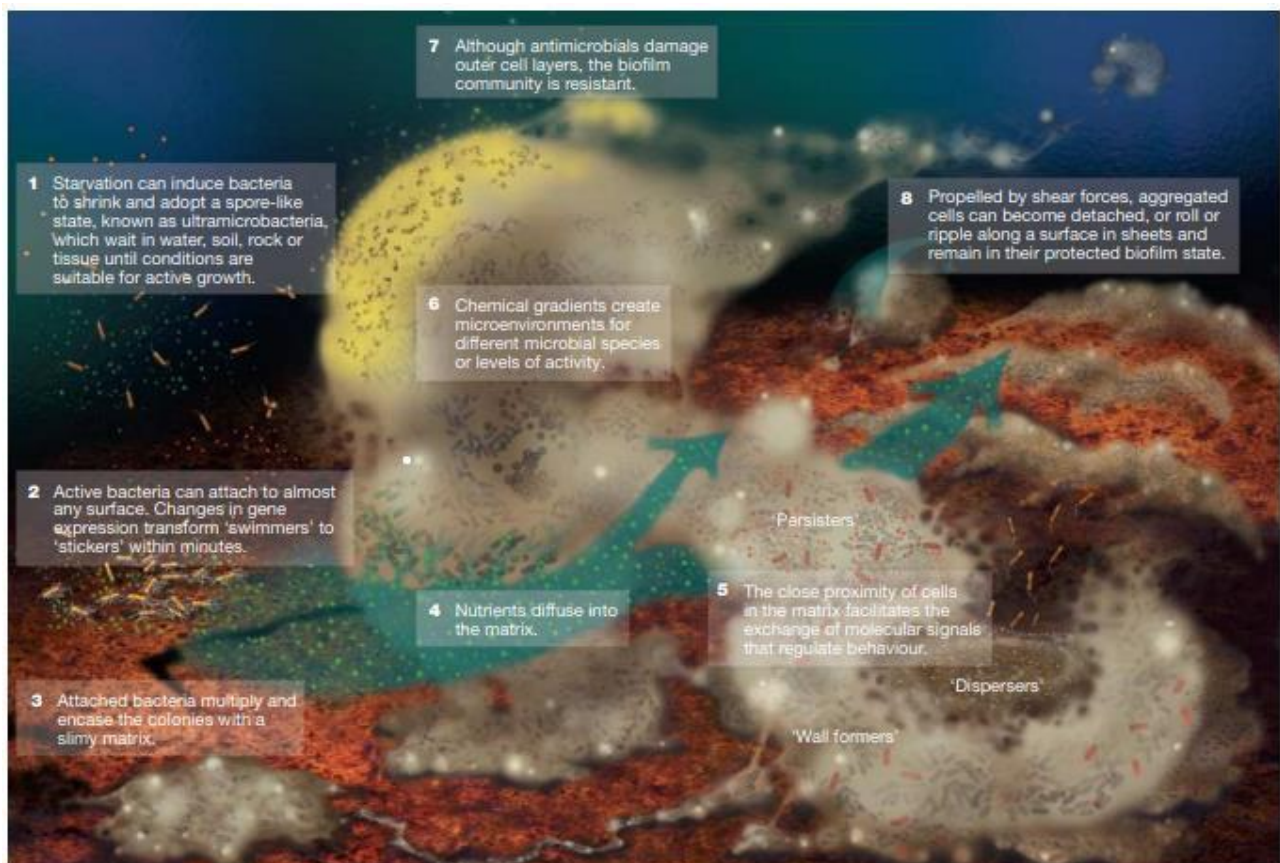
selecionam locais hidrofóbicos, como por exemplo no caso de materiais teflon e plásticos (APARNA et al., 2008; FANG et al., 2018).

Após a fase I, a fase II é t $\hat{e}$ m in $\hat{u}$ cio e  $\acute{e}$  definida pela agregação das células planctônicas por meio da comunicação por sinais químicos, célula a célula, até um limite inicial (*quorum sensing*), e a partir deste ocorre a ativação de mecanismos genéticos relacionados a produção do exopolissacarídeo (EPS) são ativados (APARNA et al., 2008; FANG et al., 2018).

Desta forma inicia-se a retenção de nutrientes e células planctônicas, tornando-as menos móveis e mais agregadas, até a formação de camadas, definido por maturação I e considerado o estágio III da formação dos biofilmes. Já no estágio IV ocorre a denominada maturação II, está definida pelo crescimento de camadas bacterianas visando o alcance de uma espessura média de 100mm (APARNA et al., 2008; FANG et al., 2018).

E por último, no estágio V, ocorre a fase de dispersão, nela, bactérias podem desenvolver o fenótipo planctônico seja para sobrevi $\hat{e}$ ncia a nível planctônico quanto para a formação de um novo biofilme (APARNA et al., 2008; FANG et al., 2018), conforme Figura 2 apresenta todas as fases do ciclo de formação de um biofilme:

**Figura 2: Conceitualização e comportamento do biofilme**



Fonte: HALL-STOODLEY, 2004. A imagem mostra as principais características estruturais no biofilme, traduzidas por: 1 - A fome pode induzir as bactérias a encolher e adotar um estado semelhante a esporos, conhecido como ultra microbactérias, que esperam na água, solo, rocha ou tecido até que as condições sejam adequadas para o crescimento ativo; 2- Bactérias ativas podem se anexar a quase qualquer superfície. Mudanças no gene expressão transformar 'nadadores' em 'Adesivos' em minutos; 3- Bactérias anexadas se multiplicam e envolver as colônias com uma matriz viscosa; 4- Nutrientes se difundem na matriz; 5- A proximidade das células na matriz facilita a troca de sinais moleculares que regulam o comportamento; 6- Gradientes químicos criam microambientes para diferentes espécies microbianas ou níveis de atividade; 7- Embora os antimicrobianos danifiquem as camadas celulares externas, a comunidade do biofilme é resistente; 8- Impulsionadas por forças de cisalhamento, as células agregadas podem se desprender, ou rolar ou ondular ao longo de uma superfície em folhas e permanecer em seu estado de biofilme protegido (HALL-STOODLEY et al., 2004).

Segundo LANDINI et al., 2010, o fato de a bactéria viver em biofilme possibilita sua maior troca genética e proteção do que estaria se estivesse em formato planctônico, deixando-as mais resistentes a antimicrobianos, o que dificulta, em casos de bactérias patogênicas o tratamento efetivo de infecções bacterianas, principalmente devido a constante introdução de antimicrobianos nestes tratamentos.

Para HALL-STOODLEY et al., 2004 os biofilmes possuem em suas fases iniciais mecanismos químicos que auxiliam no desenvolvimento dele. Além disso, pode ser determinante ao desenvolvimento dos mesmos a interação que ocorre entre ambiente e bactérias, que seriam as alterações genéticas propriamente ditas e que refletem diretamente na estrutura a ser formada e até mesmo a diferença de dinâmica entre biofilmes.

Em relação a sua dinâmica de dispersão os biofilmes podem apresentar três diferentes estratégias que fundamentam a dinâmica de dispersão, sendo dispersão por aglutinação, dispersão superficial e dispersão por sementeira (FANG et al., 2018).

#### **4.3.1 BIOFILME de *Escherichia coli***

O biofilme de *Escherichia coli* é considerado uma das maiores causas de infecções gastrointestinais, trato urinário e de dispositivos médicos, tais como cateteres uretrais e intravasculares, articulações e enxertos protéticos (SHARMA et al., 2016; MAAL-BARED et al., 2013).

O principal fator de comunicação entre as bactérias *E. coli* é o *quorum sensing*, que através da secreção de substâncias auto indutoras (AI) para o meio extracelular, e ao atingir a densidade suficiente inicia-se a maturação do biofilme. A AI também auxilia as células bacterianas na secreção de fatores de virulência, modulação da resposta imune do hospedeiro e facilitar as trocas e mudanças genéticas tornando-o mais resistente a antimicrobianos (FANG et al., 2018).

Para biofilmes de *E. coli*, principalmente uropatogênicos, existem fatores específicos de virulência voltados a fixação dele no hospedeiro, sendo adesinas fimbriais, toxinas (hemolisina e fator necrotizante citotóxico), sideróforos (sistema de aerobactina) e polissacarídeo capsular, vinculados a transferência genética por elementos móveis (SHARMA et al., 2016; FANG et al., 2018).

O crescimento e desenvolvimento do biofilme de *E. coli* se dá basicamente no mesmo formato descrito anteriormente, basicamente adesão inicial, primeira etapa de maturação, segunda etapa de maturação e dispersão. Havendo especificidades relacionadas a ela nas etapas de maturação (PAKBIN et al., 2021).

Na maturação inicial do biofilme, ocorre a repressão flagelar das bactérias, para que consigam aderir a superfície que irá se estabelecer, isso é desempenhado por moléculas de ácido cíclico-diguanílico (c-di-GMP), que atuam na mudança da célula de móvel para sésil, aumentando seus níveis conforme adesão do biofilme (SHARMA et al., 2016).

Outros constituintes das *E. coli*, atuam como adesivos, fimbrias (ou pili), atuando para que se torne irreversível a separação entre elas e são codificadas pelo gene *fim* e *csg* que são as estruturas extracelulares que se ligam às proteínas da matriz extracelular (MAAL-BARED et al., 2013; PAKBIN et al., 2021).

Os genes fundamentais para a formação do biofilme são respectivamente, *csgD* que atua que atua na regulação da produção da fimbria *curli* e atua positivamente na regulação de stress e formação em si dele, e em segundo o gene *bcsA* operon que atua na formação da camada externa de proteção química e mecânica das células (SHARMA et al., 2016).

Na maturação propriamente dita, após a adesão inicial, inicia-se o desenvolvimento do biofilme por meio de interação célula a célula e por meio do EPS. A matriz extracelular nos biofilmes são o que os diferenciam de bactérias sésseis, sendo formados em sua maioria por

água, polímeros extra poliméricos, proteínas, ácidos nucleicos, nutrientes, lipídios e outros metabólitos (FANG et al., 2018).

De acordo com SHARMA et al. (2016), o biofilme de *E. coli* é formado pelos seguintes exopolissacarídeos: polímero  $\beta$ -1, 6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) que atua mediação célula a célula, celulose responsável pela rigidez, ácido colânico, lipopolissacarídeo e cápsulas que atuam todos na proteção e fortalecimento físico dele (SHARMA et al., 2016).

Ainda segundo SHARMA et al. (2016), os lipopolissacarídeos (antígeno LPS O) e polissacarídeos capsulares (antígeno polissacarídeo K) na matriz também atuam em seu desenvolvimento, através da facilitação interativa entre as células bacterianas e o ambiente (SHARMA et al., 2016).

O *quorum sensing* e AI conforme citados anteriormente, desempenham um papel extremamente relevante na estruturação, ordenação, transferência de genes e funcionamento. A AI específico, possui dois tipos, AI1 e AI2, sendo as moléculas de AI-1 são lactonas de N-acil-homoserina (AHL) e AI-2 é um diéster de furanosil borato exclusivo (SHARMA et al., 2016; FANG et al., 2018).

A AI-1 é codificado pelos genes *luxI* e *luxR*, que atuam na síntese e regulação de resposta, respectivamente. A bactéria *E. coli* não sintetiza AHL, porém é capaz de codificar a *sdiA*, sensor de AI-1, expressando os genes *uvrY* e *csrA*, que resultam positivamente no aumentam a formação de biofilme, motilidade e virulência de *E. coli* (SHARMA et al., 2016; FANG et al., 2018).

Já o AI-2 é responsável pelo *quorum sensing* (comunicação) entre espécies e na própria espécie. Estudos demonstraram que o regulador de QS de motilidade (*MqsR*) auxilia no ganho de biomassa, movimento flagelar e motilidade ((SHARMA et al., 2016; FANG et al., 2018)).

Além disso, possui vínculos com componentes do biofilme que codificam o regulador de resposta e motilidade em *E. coli* através do regulon mestre *flhDC* que mais tarde estimula *MotA* e *FliA* levando à formação de biofilme por *qseB* e síntese da cinase do sensor, *qseC* (SHARMA et al., 2016).

Outro fator importante do comportamento e funcionamento do biofilme é relacionado aos genes de stress e resistência a antibióticos, principalmente voltados as bactérias



patogênicas que visam sua proteção a ambiente e compostos agressivos a eles (MAAL-BARED et al., 2013; PABKIN et al., 2021).

Existem proteínas, bem como no processo de comunicação entre células que são responsáveis por esta proteção a antibióticos. As proteínas as YcfR / BhsA que atuam na resistência do biofilme a ácido, calor, peróxido e cádmio e Hfq relacionado a formação de biofilmes patogênicos relacionados ao trato urinário (BORGES et al., 2012).

Já em relação ao sistema gastrointestinal, biofilmes de *E. coli* presentes neles possuem o gene ymgB que é responsável por produzir a proteína AriR que confere resistência ácida para que ela sobreviva no baixo pH do estômago (BORGES et al., 2012).

A resistência ao estresse possui um gene e profago (bacteriófago) principais e específicos voltados a ele, são eles: o gene rpoS que codifica o fator sigma S que regula a resposta ao estresse e o profago DLP12 que é capaz de induzir a resistência ao estresse em biofilmes (BORGES et al., 2012). A Tabela 2 a seguir apresenta todos os outros genes voltados a resistência do stress e aos antibióticos.

A dispersão do biofilme de *E. coli* é dada pela degradação enzimática da matriz do biofilme e alteração do *quorum sensing* quanto aos recursos oferecidos forçando a separação. Nesta separação dois componentes das bactérias *E. coli* patogênicas atuam na segregação, são o pili tipo IV e fimbrias agregativas, sendo assim cruciais para processos relacionados a inibição e separação deles (MAAL-BARED et al., 2013; SHARMA et al., 2016).

Portanto, o conhecimento em torno do biofilme de *E. coli* possibilita a identificação de meios de construção e fortalezas até seu estabelecimento e dispersão, em contrapartida esse aspecto auxilia em estudos relacionados a como inibir ou impedir a formação do biofilme dela.

#### **4.4 ESTRATÉGIAS DE INIBIÇÃO DO BIOLFIME DE *Escherichia coli***

As estratégias de contenção do biofilme de *E. coli* são fundamentais devido as sérias infecções que podem ser causadas por ele, sendo assim estratégias têm sido desenvolvidas trabalhando em estudos que possibilitem a eliminação ou desagregação das células constituintes do biofilme (MAAL-BARED et al., 2013).

Um constituinte celular fundamental e objeto de estudos para a formação interação e adesão no biofilme é o pili, que atua de forma extracelular célula a célula. Mais especificamente o pili tipo 1, possui a adesina FimH, que auxiliam na virulência e resistência

da infecção. Portanto se torna um alvo que pode auxiliar na retenção do biofilme de *E. coli* (SHARMA et al., 2016).

O método levantado pelo estudo de BORGES et al., 2012 propõe a utilização de fagos, que são vantajosos por estarem presentes em grande quantidade em hospedeiros, podem ser isolados e podem sofrer mutações com facilidade o que possibilita a atuação em bactérias que possuem alta taxa de mutação. Esta alternativa tem sido utilizada para bactérias menos complexas para dispositivos hospitalares (BORGES et al., 2012).

Outro método por fitoterapia tornou-se uma alternativa para a inibição do crescimento microbiano de forma natural, sendo vantajoso por não auxiliar na resistência a ele, os fitos químicos como 7-hidroxycumarina (7-HC), indol-3-carbinol (I3C), ácido salicílico e saponina apresentaram inibição no crescimento de cultura de bactérias *E. coli* planctônicas e diminuíram o reduziram o crescimento de seu biofilme. Já os fitos químicos I3C e 7-HC apresentaram resultados quanto a inibição do *quórum sensing* no biofilme de *E. coli* (BORGES et al., 2012).

A utilização de Probióticos, Prebióticos, Sinbióticos e Pós bióticos têm sido uma alternativa aos antibióticos no tratamento de infecções em aves de criadouro, tais quais bacilos e fungos no caso dos probióticos e prebióticos, que atuam no aumento da microbiota intestinal (*Lactobacillus*) enquanto reduz patógenos nocivos (SWELUM et al., 2021).

Quanto aos Sinbióticos são o conjunto de Probióticos e Prebióticos que em conjunto tornam-se mais potentes, este estudo reportou benefícios quanto ao tratamento inicial, com efeitos positivos quanto melhora na microbiota do hospedeiro, têm sido feitos tanto para aves quanto outros animais de produção (SWELUM et al., 2021).

Já os pós bióticos são mais recentes, e se referem aos fatores solúveis (produtos ou subprodutos metabólicos) secretados por bactérias vivas ou liberados após a lise bacteriana (que podem ser: enzimas, peptídeos, ácidos teicóicos, muropeptídeos derivados de peptidoglicanos, polissacarídeos, proteínas da superfície celular e ácidos orgânicos). Atuam de forma a melhorar a saúde do hospedeiro por meio do aprimoramento de várias funções fisiológicas (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Para animais de produção uma alternativa já existente é a vacinação, que atua na inibição da *E. coli*, onde ocorreria a inibição do gene *aroA* um dos responsáveis pela expressão da virulência. Porém ainda é um desafio, porque somente a inativação da

virulência não seria suficiente para a manifestação da doença em si além disso, existem processos a serem trabalhados a fim de evitar lesões e efeitos colaterais a elas e ao posterior consumidor daquela carne (SWELUM et al., 2021).

Porém, de acordo com JOFFRÉ et al., 2021 e O'NEILL et al., 2014, a proposta de redução deveria ter início imediatamente visando a diminuição da utilização de antimicrobianos para tratamento de infecções por *E. coli*, pois a doença dianorreica em si causada por ela pode ser tratada com métodos mais simples do que a inserção de antibióticos desfavorecendo e desacelerando os fatores de virulência e resistência causados por eles (JOFFRÉ et al., 2021; O'NEILL et al., 2014).

Portanto, com esta redução de utilização de antimicrobianos desenfreadamente como ocorre atualmente, O'NEILL et al., 2014 prevê a diminuição de possíveis mortes causadas por resistência e multirresistência para os próximos anos, dada principalmente nos países emergentes onde a incidência de casos é maior, hoje o indicativo é de aumento de casos e mortalidade principalmente infantil. Dado que, quanto menor a utilização de antimicrobianos mais desacelerado é o processo de mutação e resistência, deixando o processo o mais próximo do natural.

## 5. CONCLUSÃO

A bactéria *E. coli* é de suma importância no quesito de relevância global, pois atua como modelo gram-negativa, indicador de qualidade da água, na participação do sistema gastrointestinal dos seres vivos e quanto se trata de saúde para as cepas patogênicas causadoras de diarreia em humanos.

Estudos no aspecto genético da bactéria *E. coli* são bem fundamentados, havendo identificação de seus fatores de virulência, transmissão de genes e formação de biofilmes capazes de auxiliar no mapeamento cada vez mais profundo de novas variações e consequentemente alternativas de inibição, além do acompanhamento da resistência dela a antimicrobianos.

Os biofilmes tornam-se um desafio para a saúde pública uma vez que auxiliam a taxa elevada de trocas genéticas, porém as alternativas disponíveis atualmente em conjunto com iniciativas globais feitas de forma eficaz tendem a desacelerar a intensidade de mutações e atuar na diminuição da mortalidade para doenças dianorreicas.

Desta forma o objetivo geral deste trabalho foi atingido com o levantamento

bibliográfico de estudos em torno do tema *Escherichia coli*, resistência microbiana, biofilme e controle, trazendo aspectos importantes de compactar os principais pontos relacionados a ele.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As iniciativas combinadas a conscientização das pessoas no geral quanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos, os produtores de animais de produção e órgãos médicos também contribuirão com este objetivo, porém o alerta seria a realização destas ações o mais rápido possível a fim de evitar piores resultados, populacionais e econômicos.

Os avanços para descobertas de identificação, comportamento, prevenção e até mesmo eliminação dos biofilmes de *E. coli* visam a prevenção de possíveis crises sanitárias, é possível verificar que o microrganismo por estar em constante evolução e seleção natural, entende-se que não será extinto, porém pode ser controlado a fim de manter o equilíbrio entre sociedade e *E. coli*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APARNA, M. et al., **SaritaBiofilms: microbes and disease**. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 12, n. 6, pp. 526-530, 2008.

BELD M. et al., **Evaluation of a Culture-Dependent Algorithm and a Molecular Algorithm for Identification of *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, and Enteroinvasive *E. coli***. Jornal of Microbiology, vol 56, no. 10, 2018.

BORGES A. et al. **The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria**. Biofouling, vol 20, 2012.

BERLINGUER, G. **Globalização e Saúde Global**. Estudos Avançados, vol. 13, no. 35, pp. 21–38, 1999.

COURA, F. et al. **Characterization of virulence factors and phylogenetic group determination of *Escherichia coli* isolated from diarrheic and non-diarrheic calves from Brazil**. Folia Microbiológica, v. 62, n. 2, p. 139–144, 2017.

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

DEVANE ML, Moriarty et al. **Fecal indicator bacteria from environmental sources; strategies for identification to improve water quality monitoring**. Water Res. PMID: 32745743, 2020.

DIAS, R. et al. **Analysis of the Virulence Profile and Phenotypic Features of Typical and Atypical Enteraggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolated from Diarrheal Patients in Brazil**. Frontiers in cellular and infection microbiology, vol 10, pp 144, 2020.

DÍAZ, E. et al. **Biodegradation of aromatic compounds by *Escherichia coli***. Microbiol Mol Biol Rev 65, pp 523–569, 2001.

DONLAN, R. M, et al. **Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms**. Clinical Microbiology Reviews, vol. 15, no. 2, pp. 167–193, 2002.

DRUMOND, Sheila Neves, et al. **Identificação Molecular de *Escherichia coli* Diarreiogênica Na Bacia Hidrográfica Do Rio Xopotó Na Região Do Alto Rio Doce**. Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 23, no. 3, pp. 579–590, 2018.

- FANG, K. et al. **Probiotic *Escherichia coli* inhibits biofilm formation of pathogenic *E. coli* via extracellular activity of DegP.** Scientific reports, vol. 8,1 pp 4939, 2018.
- GORDON, D.M. **Chapter 1 – The ecology of *Escherichia coli* A2 - Donnenberg, Michael S.** In *Escherichia coli* (Second Edition). Boston, MA: Academic Press, pp. 3–20, 2013.
- HALL-STOODLEY, L., Costerton, J. & Stoodley, P. **Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases.** Nat Rev Microbiol 2, 95–108, 2004.
- HARBARTH, S. et al. **Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control.** Emerging Infectious Diseases, vol. 11, no. 6, pp. 794–801, 2005.
- HARTLAND E. et al. **Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution.** Frontiers in cellular and infection microbiology, vol. 3 pp. 15, 2013.
- HUDAULT, S. ***Escherichia coli* Strains Colonising the Gastrointestinal Tract Protect Germfree Mice against Salmonella Typhimurium Infection.** Gut, vol. 49, no. 1, pp. 47–55, 2001.
- ISHII, S. et al. ***Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health.** Microbes Environ 23, 101–108, 2008.
- JAVADI, M. et al., **Horizontal gene transfer and the diversity of *Escherichia coli* in Recent Advances on Physiology.** Pathogenesis and Biotechnological Applications, ed. A. Samie, vol16, pp 382, 2017.
- JOFFRÉ, E. et al. **Molecular Epidemiology of Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) Isolates of Hospitalized Children from Bolivia Reveal High Heterogeneity and Multidrug-Resistance.** International journal of molecular sciences vol. 21, 24 9543, 2020.
- JUNG, J. et al. **Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications.** Society for Applied Microbiology, vol 123, issue 3, pp. 570-581, 2017.
- KHALIL I. et al. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccines: Priority activities to enable product development, licensure, and global access.** Elsevier Vaccine, vol. 39,31, 2021.
- KOLLEF, M. et al. **Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections.** Chest, vol. 115, no. 2, pp. 462–474, 1999.

LOUREIRO, R. et al. **O Uso de Antibióticos e as Resistências Bacterianas: Breves Notas Sobre a Sua Evolução.** Revista Portuguesa de Saúde Pública, vol. 34, no. 1, pp. 77–84, 2016.

NAWROCKI et al. **A Toxic Environment: a Growing Understanding of How Microbial Communities Affect *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin Expression.** Applied and Environmental Microbiology, vol. 86, No. 24, 2020.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock.** Tradução Artmed – Porto Alegre, ed.14, p 987, 2016.

O'NEILL, J. **The Review on Antimicrobial Resistance.** Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014.

ORSKOV, F. et al. ***Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals.** Canadian Journal of Microbiology, vol 38(7), pp 699-704, 1992.

PAKBIN, B. et al. **Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review.** International journal of molecular sciences, vol. 22,18 9922, 2021.

RAMADAN H. et al. **Antimicrobial Resistance, Genetic Diversity and Multilocus Sequence Typing of *Escherichia coli* from Humans, Retail Chicken and Ground Beef in Egypt.** Pathogens. Vol 9 pp 357, 2020.

MAAL-BARED, R. et al. **Phenotypic antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *E. coli* O157 isolated from water, sediment, and biofilms in an agricultural watershed in British Columbia.** Science of The Total Environment, Volume 443, 2013.

RODRIGUEZ-ANGELES, G. **Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*.** Salud pública Méx, Cuernavaca, v. 44, n. 5, p. 464-475, 2002.

SERVIN, Alain L. **Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges.** Clinical microbiology reviews, vol. 27, pp 823-69, 2014.

SHARMA, G. et al. ***Escherichia coli* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies.** Journal of Applied Microbiology, v. 121, p 309-319, 2016.

SILVA, Juliana & SILVA, Wilmar. ***Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), Ao Contrário Da *Escherichia coli* Comensal, Adere, Sinaliza E Lesa Enterócitos.** Revista Patologia Tropical. Vol. 34 (3): 175-196, 2005.

SOUZA, Cintya de Oliveira et al. ***Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioigênica versátil.** Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

Swelum, A. et al. **Ways to minimize bacterial infections, with special reference to *Escherichia coli*, to cope with the first-week mortality in chicks: an updated overview.** Poultry science vol. 100,5, 2021.

TENAILLON, O. et al. **Tempo and Mode Of Genome Evolution in a 50,000-generation Experiment.** Nature, 536,165–170, 2016.

TRABULSI LR, E. et al. **Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*.** Emerg Infect Dis 8: 508-513, 2002.

TREMBLAY, Y. D. N. et al. **Les Biofilms Bactériens: Leur Importance En Santé Animale et En Santé Publique.** Canadian Journal of Veterinary Research, v. 78, n. 2, p. 110–116, 2014.

VASCONCELOS, F. R. et al. **Perfil De Resistência Antimicrobiana De *Escherichia Coli* Isoladas Do Açude Santo Anastácio, Ceará, Brasil.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.3, p.405-410, 2010.

WHITMAN, R.L. et al. **Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a Lake Michigan swimming beach.** Appl Environ Microbiol, v. 70, pp 4276–4285, 2004.

WIRTH T, Falush et al. **Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective.** Mol Microbiol, vol 60(5), pp1136-51, 2006.

WU XY, Chapman et al. **Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs.** Appl Environ Microbiol vol 73(1), pp 83-91, 2007.