



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

Formação de biofilme de bactérias *Escherichia coli* isoladas do intestino de cães saudáveis

SAMARA MUNIZ FIDELIS DA SILVA

Brasília

2024



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

SAMARA MUNIZ FIDELIS DA SILVA

Formação de biofilme de bactérias *Escherichia coli* isoladas do intestino de cães saudáveis

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Saúde Animal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília como pré-requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Saúde Animal.

Prof^a. Dr^a. Simone Perecmanis

Orientadora

Brasília

2024

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Simone Perecmanis, minha orientadora, pela manifestação de incondicional apoio e disponibilidade, pela compreensão quando dos atrasos, pelo aconselhamento assertivo e pelo estímulo permanente, que muito contribuíram para aumentar o desafio e melhorar a profundidade e a clareza da investigação, pela sua amizade.

A Orlando Medeiros, meu marido, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela compreensão com as mudanças de humor repentinas, pelo aconselhamento e amor incondicional.

RESUMO

Existe grande preocupação na última década acerca das bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, mas também com a capacidade destas em formar biofilme, uma vez que isso implica na dificuldade de eliminá-las de superfícies e ambientes, e, consecutivamente, de conter infecções. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme de bactérias *Escherichia coli* a fim de melhor entender o potencial patogênico destas, visto que se sugere a correlação entre patogenicidade e formação de biofilme no caso desse tipo de bactérias. Foram isoladas 54 inóculos de *Escherichia coli* do intestino de cães saudáveis atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília. Os inóculos foram classificados em graus de formação de biofilme, encontrando 35,19% (19) formando biofilme no grau Forte, 44,44% (24) no grau Moderado, 16,67% (9) no grau Fraco, e 3,7% (2) que não formaram biofilme. O controle positivo (*Escherichia coli* E004) foi considerado grau Moderado. Os resultados sugerem que há potencial para que as *Escherichia coli* de cães causem infecções mais graves.

Palavras-chave: biofilme, *Escherichia coli*, patogenicidade.

ABSTRACT

There has been great concern in the last decade about bacteria resistant to multiple antibiotics. At the same time, there's been concern about their ability to form biofilms. This is because there's implication that these bacteria are difficult of eliminating from surfaces and environments, and, consequently, to contain infections. This study aims to evaluate the biofilm formation of *Escherichia coli* to better understand their pathogenic potential because there might be a correlation between pathogenicity and biofilm formation for this type of bacteria. Fifty-four samples of *Escherichia coli* were isolated from the intestines of healthy dogs treated at the Small Animal Veterinary Hospital of the University of Brasília. The samples were classified according to their degrees of biofilm formation, finding 35.19% (19) forming biofilm in the Strong degree, 44.44% (24) in the Moderate degree, 16.67% (9) in the Weak degree, and 3, 7% (2) that did not form biofilm. The positive control (*Escherichia coli* E004) was considered Moderate degree. The results suggest that there is potential for *Escherichia coli* from dogs to cause more serious infections.

Keywords: biofilm, *Escherichia coli*, pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microplaca inoculada corada.....	11
--------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grau de formação de biofilme de uma bactéria segundo a Densidade Óptica.....	12
Tabela 2. Grau de formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i> segundo a Densidade Óptica.....	14
Tabela 3. Formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i> do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Veterinária do HVET segundo a Densidade Óptica.....	14

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS: Ágar Sangue

BHI: Brain Heart Infusion

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

E. coli: *Escherichia coli*

EPEC: *Escherichia coli* Enteropatogêncica

EHEC: *E. coli* Enterohemorrágica

ETEC: *Escherichia coli* Enterotoxigêncica

HUS: Síndrome Urêmica Hemolítica

HVET: Hospital Veterinário

pH: Potencial Hidrogeniônico

RNA: Ácido Ribonucleico

UPEC: *Escherichia coli* Uropatogênica

UnB: Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Revisão de Literatura.....	8
3. Justificativa.....	9
4. Objetivos.....	10
4.1. Objetivos Gerais.....	10
4.2. Objetivos Específicos.....	10
5. Metodologia.....	11
6. Resultados.....	11
7. Discussão.....	13
8. Considerações Finais.....	14
9. Referências Bibliográficas.....	15

1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* há muito tempo tem sido objeto de estudo e interesse nas ciências da saúde, sendo de grande relevância na medicina veterinária. Esta é uma das bactérias mais estudadas no contexto econômico e de saúde dentro da agropecuária e apresenta grande diversidade de cepas, algumas das quais são cruciais para a manutenção da saúde intestinal em mamíferos, enquanto outras representam ameaças significativas à saúde pública e animal, com potencial patogênico grave. (Hartland,2002) Salgado-

Caxito, 2021, discutem que as bactérias *Escherichia coli* são um grande perigo por sua grande circulação entre humanos e animais. Valat, 2020, observa que há genes de patogenicidade de *E. coli* extraintestinal de humanos encontrados em cães. Wedley, 2017, e Salgado-Caxito, 2021, alertam para a intercorrência de genes de resistência a antimicrobianos em *E. coli* tanto de humanos quanto de cães, o que mostra a importância de promover mais estudos sobre este tema.

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, bacilar, comumente encontrada no intestino de humanos e animais. Embora a maioria das cepas de *E. coli* seja comensal, algumas são patogênicas, como as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e enteropatogênicas (EPEC), que são conhecidas por sua capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas. (Valat, 2020) O interesse renovado na *E. coli* em contextos veterinários decorre de sua complexidade crescente, manifestada tanto na diversidade genômica quanto na capacidade de se adaptar a novos ambientes e desafios, como dizem Salgado-Caxito, 2021 e Valat, 2020. À medida que avançamos na compreensão de suas interações com o hospedeiro, seu papel como agente etiológico de doenças emergentes e seu potencial como vetor de resistência antimicrobiana, torna-se imperativo aprofundar nosso conhecimento sobre essa bactéria. (Marjanca, 2002) Vega-Manriquez, 2020, discorre sobre a versatilidade da *Escherichia coli* e afirma que apesar de várias cepas fazerem parte da microbiota normal de diversas espécies de mamíferos, há relatos dessas bactérias causando infecções sérias.

Quanto às características genéticas das *E. coli*, podemos dizer que são notáveis pela sua diversidade e plasticidade, o que contribui para a sua adaptação a uma variedade de ambientes ecológicos e nichos dentro e fora do hospedeiro. (Silva, 2012) Essa plasticidade genética permite à *E. coli* responder rapidamente a mudanças ambientais e pressões seletivas, promovendo sua sobrevivência e proliferação em condições desafiadoras. (Silva, 2012) As *E. coli* são bactérias gram-negativas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Seu genoma é composto por uma única molécula de DNA circular, variando de aproximadamente 4.6 a 5.5 milhões de pares de bases, dependendo da cepa. (Dykhuizen, 1984) Uma das características genéticas mais marcantes da *E. coli* é a sua capacidade de adquirir e trocar material genético horizontalmente, por meio de

processos como transformação, transdução e conjugação. (Benavides, 2021) Isso facilita a rápida disseminação de genes de resistência antimicrobiana, fatores de virulência e outras características adaptativas entre diferentes cepas bacterianas, incluindo aquelas que colonizam o trato gastrointestinal de animais e humanos. (Dykhuizen, 1984) Yang, 2021, discorre sobre as características genéticas de *E. coli*, enfatizando a importância do estudo genético destas bactérias, principalmente para entendimento de sua produção de toxinas.

A *E. coli* possui uma ampla variedade de genes que codificam fatores de virulência, ou seja, proteínas ou estruturas envolvidas na capacidade da bactéria de causar doenças. (Vega-Manriquez, 2020) Esses genes podem estar envolvidos na adesão às células hospedeiras, na produção de toxinas, na resistência a fagocitose pelo sistema imunológico, entre outras funções. (Salgado-Caxito, 2021) A presença e expressão desses genes de virulência variam entre as diferentes cepas de *E. coli*, influenciando sua patogenicidade e capacidade de causar infecções. (Schwarz, 2018) Além dos genes de virulência, a *E. coli* também pode abrigar genes de resistência antimicrobiana, que conferem resistência a antibióticos comumente utilizados na prática clínica. (Valat, 2020) A disseminação desses genes representa uma preocupação crescente para a saúde pública, tornando algumas cepas de *E. coli* resistentes a múltiplos antimicrobianos e, então, mais difíceis de tratar. (Schwarz, 2018)

Zhao, 2020, sugere que a força da formação de biofilme pode estar associada à patogenicidade, virulência e, inclusive, à capacidade de resistência a antibióticos. Surgers, 2019, corrobora com os achados de Zhao, 2020, quando mensura a formação de outras bactérias além da *Escherichia coli* e propõe que pode haver correlação desta formação de biofilme com a virulência das cepas. É possível que os mecanismos de formação de biofilme por bactérias estejam interligados com mecanismos inerentes à sua patogenicidade (Katongole, 2020).

A compreensão dos aspectos genéticos das bactérias *Escherichia coli* é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, controle e tratamento. (Schwarz, 2018) O mesmo pode ser dito quanto à formação de biofilme por essas bactérias. Katongole, 2020, afirma que a formação de biofilme por *E. coli* é um fenômeno

multifacetado, influenciado por fatores genéticos que regulam a adesão, a produção de matriz extracelular e a comunicação celular. O ambiente também desempenha um papel crucial, influenciando a robustez e a persistência do biofilme. (Beebout, 2019) A compreensão dos mecanismos subjacentes à formação de biofilme em *E. coli* é essencial para o desenvolvimento de estratégias que visem controlar infecções bacterianas e prevenir a formação de biofilmes em superfícies médicas e industriais. (Henly, 2019)

2. REVISÃO DE LITERATURA

As bactérias do gênero *Escherichia coli* têm grande capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde desempenham papéis tanto benéficos quanto patogênicos. (Vega-Manriquez, 2020) A aderência às superfícies celulares é um passo crucial para o estabelecimento da colonização bacteriana e subsequente desenvolvimento de infecções. (Zhao, 2020) Os genes de aderência em *E. coli* codificam uma variedade de fatores que facilitam a fixação das bactérias às células hospedeiras e superfícies bióticas e abióticas. Segundo Medina, 2019, um dos genes mais bem estudados é o gene fimH, que codifica a proteína FimH, componente essencial das fímbrias tipo 1, estruturas filamentosas que desempenham um papel crucial na aderência inicial às células epiteliais. Além disso, outros genes de aderência, como os que codificam fímbrias P e curli, foram identificados como importantes para a colonização de diferentes nichos dentro do hospedeiro. (Colombel, 2018)

Os genes de aderência desempenham um papel crucial na capacidade das bactérias *E. coli* de colonizar o trato gastrointestinal de cães e estabelecer infecções. A aderência é o primeiro passo na patogênese bacteriana, permitindo que as bactérias se fixem às células hospedeiras e fômites, facilitando a colonização e subsequente proliferação. (Jacob, 2020) Wang, 2020, e Jacob, 2020, afirmam que um dos genes de aderência em bactérias *E. coli* que afetam cães, o gene fimH, que codifica a proteína FimH, é um componente essencial das fímbrias tipo 1. As fímbrias tipo 1 são estruturas filamentosas que desempenham um papel crucial na aderência inicial das bactérias às células

epiteliais intestinais. (Jacob, 2020) A proteína FimH reconhece e se liga a receptores específicos na superfície das células hospedeiras, promovendo a aderência e a colonização bacteriana. Jacob, 2020, demonstram que mutações no gene fimH podem afetar a capacidade de aderência de *E. coli* a células epiteliais e influenciar sua virulência nas infecções em cães.

Além do gene fimH, outros genes de aderência foram identificados em cepas de *E. coli* associadas a infecções em cães. (Lyle, 2018; Wang, 2020) Por exemplo, os genes que codificam fímbrias P e curli foram implicados na aderência de *E. coli* a superfícies bióticas e abióticas, incluindo células epiteliais intestinais e dispositivos médicos. Essas estruturas de aderência permitem que as bactérias formem biofilmes, comunidades bacterianas altamente organizadas que conferem resistência a fatores ambientais e antimicrobianos, contribuindo para a cronicidade das infecções. (Ogasawara, 2020)

A regulação dos genes de aderência em *E. coli* é complexa e altamente regulada, envolvendo uma variedade de fatores ambientais e de sinalização. Dissanayake, 2023 explora que a expressão dos genes de aderência pode ser influenciada por fatores como pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e interações com o hospedeiro. Além disso, sistemas de regulação global, como os sistemas de dois componentes e as redes de regulação de pequenos RNAs, desempenham papéis importantes na modulação da expressão dos genes de aderência em resposta a sinais ambientais e fisiológicos. (Dissanayake, 2023; Ogasawara, 2020)

Rajashekara, 2021, explica que os genes de patogenicidade em *E. coli* estão associados à capacidade da bactéria de causar doenças e incluem genes que codificam fatores de virulência, como toxinas, proteínas de secreção e sistemas de secreção. Pitout, 2019, exemplifica que os genes que codificam as toxinas Shiga (stx) são característicos das cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e estão intimamente ligados à patogênese da síndrome urêmica hemolítica (HUS) e colite hemorrágica. Da mesma forma, os genes que codificam os fatores de adesão intimina (eae) e intimina-like (lifA) desempenham papéis importantes na aderência e formação de lesões intimais nas células epiteliais intestinais. (Vega-Manriquez, 2020; Zhao, 2020)

Os genes de patogenicidade das *E. coli* que afetam cães podem variar dependendo do tipo de patógeno e da cepa envolvida, cada uma com seus próprios conjuntos de genes de virulência. Blanco, 2020, exploram que as cepas *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) causam diarreia em cães e em outros animais, sendo os principais genes aqueles que codificam as toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), responsáveis pela produção de toxinas que induzem a secreção de líquidos no intestino, o que leva à diarreia. Blanco, 2020, também disserta sobre as cepas *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC), associada à diarreia em filhotes. Segundo Blanco, 2020, e Katongole, 2020, o principal gene de virulência associado a EPEC é o gene *eae* (*intimina*), que codifica uma adesina que permite a aderência da bactéria às células intestinais, resultando em lesões intimais. Ainda Blanco, 2020, e Rankin, 2017, afirmam que as cepas *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) causariam infecções do trato urinário de cães e aponta como principais genes de virulência aqueles envolvidos na aderência às células epiteliais do trato urinário, como os genes *pap* (P-fimbriae) e *sfa/foc* (S/F1C-fimbriae), bem como genes envolvidos na invasão e formação de biofilme. Rankin, 2017, e Medina, 2019, apontam que cepas *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) são menos comuns em cães do que em humanos, porém podem causar diarreia sanguinolenta e, até mesmo síndrome hemolítica-urêmica (HUS) e, casos graves. Para tais cepas, os genes mais importantes segundo Rankin, 2017, seriam aqueles responsáveis por danificar as células do revestimento intestinal.

Pitout, 2019 também afirma que a presença e a expressão dos genes de aderência e patogenicidade em cepas de *E. coli* estão associadas à virulência e ao perfil de patogenicidade da bactéria. Assim, a identificação desses genes em cepas isoladas de casos clínicos e surtos epidemiológicos é essencial para o diagnóstico, tratamento e prevenção de infecções bacterianas causadas por *E. coli* patogênicas. (Qvortrup, 2019)

A força e a robustez do biofilme formado por *E. coli* podem ser influenciadas por fatores ambientais como a disponibilidade de nutrientes, pH e temperatura, além da característica da superfície de adesão. (Zhao, 2020) A disponibilidade de nutrientes pode afetar a densidade e a espessura do biofilme. (Henly,2019) Condições ambientais extremas podem aumentar a produção de matriz extracelular, tornando o biofilme mais

resistente. (Blanco, 2020) Superfícies rugosas ou hidrofóbicas podem favorecer a formação de biofilmes mais fortes. (Salgado-Caxito, 2021)

3. JUSTIFICATIVA

As bactérias *Escherichia coli* são bastante estudadas por desempenharem um papel essencial na saúde intestinal de mamíferos, incluindo cães. Apesar de sua prevalência como parte da microbiota intestinal normal, algumas cepas de *E. coli* podem manifestar potencial patogênico, representando uma preocupação significativa para a medicina veterinária e a saúde pública.

A partir do estudo da formação de biofilme e da possível correlação entre a patogenicidade em cepas de *E. coli*, será possível compreender melhor os mecanismos subjacentes à virulência bacteriana e sua relação com a colonização intestinal. Essa abordagem visa elucidar se certos padrões na formação de biofilme estão associados a cepas de *E. coli* que mantêm um estado benigno no intestino de cães saudáveis ou se existem sinais precoces de potencial patogênico latente.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo investigar a formação de biofilme por bactérias *Escherichia coli*, com foco na compreensão das implicações que essa característica pode ter para a saúde animal e potencialmente para a saúde humana. Entender se há diferença na formação de biofilme entre cepas comensais e patogênicas, e se essa característica pode potencializar sua virulência.

Avaliar como a formação de biofilme pode influenciar a capacidade das bactérias causarem doenças em mamíferos, incluindo infecções urinárias, gastrointestinais, e outras infecções sistêmicas. Embora tradicionalmente vistas como inofensivas, é possível que essas cepas possam apresentar riscos ocultos quando formam biofilmes, como o de se tornar mais resistente a antibióticos e a capacidade de persistir em

ambientes hospitalares ou domésticos, representando assim uma ameaça à saúde pública.

O estabelecimento de graus de formação de biofilme pode ser diferente entre gêneros e entre cepas, o que pode contribuir para avaliar a patogenicidade e virulência de determinada bactéria.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo fornecerá as ferramentas para entender a dinâmica da colonização bacteriana e os riscos associados à disseminação de cepas patogênicas. Além disso, pode influenciar estratégias de manejo da saúde intestinal canina e a implementação de medidas preventivas contra infecções bacterianas.

Ao investigar a correlação entre a formação de biofilme em *E. coli* isoladas de cães saudáveis e a formação de biofilme nas cepas patogênicas desta bactéria, contribuiremos para uma melhor compreensão da microbiota intestinal canina e para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes na prevenção e controle de doenças bacterianas, beneficiando tanto a saúde animal quanto a saúde pública.

5. METODOLOGIA

As bactérias *Escherichia coli* foram obtidas a partir das fezes de cães hígidos. As bactérias estavam preservadas em glicerol em Eppendorfs de 2mL, totalizando 54 amostras, as quais fazem parte do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília. A fim de conduzir o experimento, as bactérias foram recultivadas em Ágar Sangue (AS) e Brain Heart Infusion Broth (Caldo BHI). Para tal, foram utilizadas placas de Petri descartáveis estéreis 90x15mm e tubos estéreis 13x100mm. Para fins de controle positivo, foram utilizadas Cepas Microbianas Liofilizadas - *Escherichia coli* - E004. A formação de biofilme em placas de microtitulação foi a técnica utilizada, sendo observada em placas para cultura de células de 96 poços e fundo chato (TCP 011096).

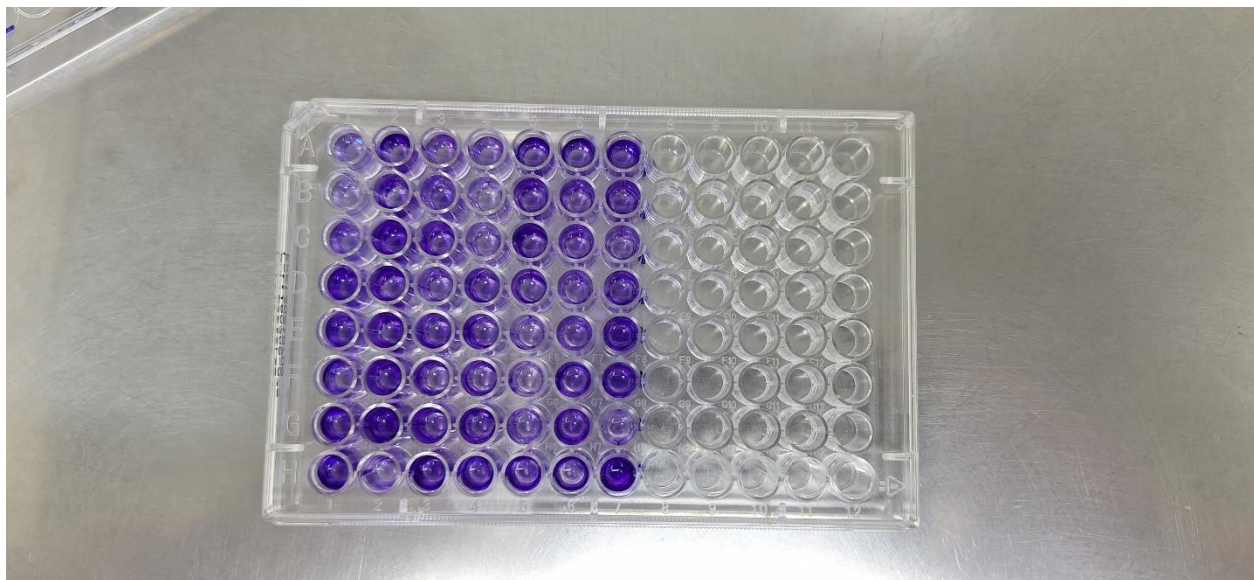
A leitura das placas para cultura de células foi realizada no equipamento Thermo Plate leitora de microplaca TP-READER.

O experimento procedeu-se a partir do proposto por Coffey & Anderson, 2014, e Allkja, 2020. Inicialmente, cultivam-se os inóculos em caldo BHI e procede-se à incubação em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida, cultivam-se os inóculos obtidos no caldo BHI em AS, incubando a 37°C por 24 horas. Logo, suspender uma colônia do AS e cultivar em caldo BHI a 37°C por 24 horas. Então, deve-se preparar as suspensões para atingir a absorbância desejada para esse experimento subjetivamente, 0,5 McFarland (MCFARLAND, 1907). A seguir, preparam-se as microplacas inoculando 3 poços com o controle negativo (200µL de BHI), 3 poços com o controle positivo (200µL de *Escherichia coli* E004), e o restante dos poços com as amostras preparadas e em triplicata. Cada placa deve ser coberta com filme plástico e incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Logo, deve-se descartar o conteúdo dos poços. Seguindo, os poços são lavados com 250µL de solução salina a 0,9%. Então, as bactérias são fixadas com 200µL de metanol, aguardando 15 minutos para a próxima etapa. Os poços são, então, esvaziados e deixados para secar em temperatura ambiente por 1 hora. Logo, utiliza-se 200µL de cristal violeta a 2% para corar os poços, aguardando 5 minutos. Retira-se o corante e lava-se com água destilada, deixando secar em temperatura por pelo menos 20 minutos. Então, o biofilme, que já pode ser visualmente observado por conta do corante, deve ser ressuspenso com ácido acético glacial a 33%. Procede-se à leitura com o leitor de microplaca programado com a Densidade Óptica (OD) a 550nm. A leitura da formação de biofilme é feita da seguinte forma: a bactéria é considerada não formadora de biofilme caso o resultado da densidade óptica seja menor que o resultado controle; obtém-se o grau Fraco caso o resultado esteja entre o valor controle e duas vezes o valor controle; obtém-se o grau Moderado caso o resultado esteja entre duas vezes o valor controle e quatro vezes o valor controle; e o grau Forte é estabelecido quando o resultado da densidade óptica é quatro vezes maior que o valor controle. Isto pode ser observado com ajuda da Tabela 1.

Tabela 1. Grau de formação de biofilme de uma bactéria segundo a Densidade Óptica.	
Não formador	$OD_{\text{resultado}} < OD_{\text{controle}}$
Fraco	$OD_{\text{controle}} < OD_{\text{resultado}} < 2x OD_{\text{controle}}$
Moderado	$2x OD_{\text{controle}} < OD_{\text{resultado}} < 4x OD_{\text{controle}}$
Forte	$> 4x OD_{\text{controle}}$

Fonte: Coffey & Anderson, 2014; Allkja, 2020.

Figura 1. Microplaca inoculada corada.



Fonte: Arquivo pessoal.

6. RESULTADOS

A partir dos resultados do experimento e seguindo a Tabela 1, estabeleceu-se a Tabela 2 para mensuração da formação de biofilme pelas bactérias *Escherichia coli* de cães do Hospital Veterinário (HVET) de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (UnB). O valor da densidade óptica das amostras controle, ou seja, o meio líquido BHI sem inóculos, foi 0,0430. Então, seguindo o estabelecido pela Tabela 1, bactérias não formadoras de biofilme teriam valor menor que 0,0430, aquelas no grau Fraco teriam

valor entre 0,0430 e 0,0860, as de grau Moderado teriam valor entre 0,0860 e 0,1720, e o grau Forte ficou estabelecido para as cujo resultado for maior do que 0,1720.

Tabela 2. Grau de formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i> segundo a Densidade Óptica.	
Não formador	$OD_{\text{resultado}} < 0,0430$
Fraco	$0,0430 < OD_{\text{resultado}} < 0,0860$
Moderado	$0,0860 < OD_{\text{resultado}} < 0,1720$
Forte	$> 0,1720$

Fonte: Coffey & Anderson, 2014; Allkja, 2020.

Assim, construiu-se a Tabela 3, onde é possível observar a formação de biofilme das bactérias *Escherichia coli* coletadas. Uma vez que os resultados foram obtidos com amostras em triplicata, foi calculada a média aritmética destes, obtendo os resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3. As amostras a serem testadas foram nomeadas de E₁ a E₅₄, a amostra controle positivo *Escherichia coli* E004 foi nomeada A_{controlep}, e a amostra controle negativo (caldo BHI não inoculado) foi nomeada A_{controlen}. A Tabela 3 mostra a média dos resultados obtidos em triplicata para cada inóculo.

Tabela 3. Formação de biofilme de *Escherichia coli* do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Veterinária do HVET segundo a Densidade Óptica.

Acontrolep 0,1627	=	E ₁₁ = 0,2330	E ₂₃ = 0,1057	E ₃₅ = 0,0637	E ₄₇ = 0,0760
Acontrolen 0,0430	=	E ₁₂ = 0,1513	E ₂₄ = 0,1027	E ₃₆ = 0,1417	E ₄₈ = 0,0220
E ₁ = 0,4723		E ₁₃ = 0,3423	E ₂₅ = 0,1397	E ₃₇ = 0,1083	E ₄₉ = 0,0360
E ₂ = 0,1270		E ₁₄ = 0,2277	E ₂₆ = 0,0830	E ₃₈ = 0,1283	E ₅₀ = 0,1140
E ₃ = 0,1203		E ₁₅ = 0,4090	E ₂₇ = 0,0620	E ₃₉ = 0,1787	E ₅₁ = 0,0680
E ₄ = 0,1360		E ₁₆ = 0,1940	E ₂₈ = 0,1190	E ₄₀ = 0,1007	E ₅₂ = 0,0937
E ₅ = 0,2080		E ₁₇ = 0,1790	E ₂₉ = 0,096	E ₄₁ = 0,0760	E ₅₃ = 0,1037
E ₆ = 0,3650		E ₁₈ = 0,2137	E ₃₀ = 0,1887	E ₄₂ = 0,0770	E ₅₄ = 0,1170
E ₇ = 0,2120		E ₁₉ = 0,3947	E ₃₁ = 0,0917	E ₄₃ = 0,0883	-
E ₈ = 0,1807		E ₂₀ = 0,1793	E ₃₂ = 0,0643	E ₄₄ = 0,0483	-
E ₉ = 0,1917		E ₂₁ = 0,1837	E ₃₃ = 0,0867	E ₄₅ = 0,0687	-
E ₁₀ = 0,3483		E ₂₂ = 0,1117	E ₃₄ = 0,1103	E ₄₆ = 0,1133	-

Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo a Tabela 3, os 19 inóculos E₁, E₅, E₆, E₇, E₈, E₉, E₁₀, E₁₁, E₁₃, E₁₄, E₁₅, E₁₆, E₁₇, E₁₈, E₁₉, E₂₀, E₂₁, E₃₀, e E₃₉ formam biofilme no grau Forte, totalizando 35,19%. Já os 24 inóculos E₂, E₃, E₄, E₁₂, E₂₂, E₂₃, E₂₄, E₂₅, E₂₈, E₂₉, E₃₁, E₃₃, E₃₄, E₃₆, E₃₇, E₃₈, E₄₀, E₄₁, E₄₃, E₄₆, E₅₀, E₅₂, E₅₃, e E₅₄ formaram biofilme no grau Moderado, ou seja, 44,44%. Em seguida, os 9 inóculos E₂₆, E₂₇, E₃₂, E₃₅, E₄₂, E₄₄, E₄₅, E₄₇, e E₅₁ formaram biofilme no grau Fraco, a saber, 16,67%. Por fim, os 2 inóculos E₄₈, e E₄₉, não formaram biofilme, representando 3,7%.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a correlação entre a formação de biofilme por cepas não patogênicas de *Escherichia coli* e seu potencial de se tornarem patogênicas, a fim de compreender melhor os mecanismos que contribuem para a virulência bacteriana.

As bactérias *Escherichia coli* obtidas de fezes de cães hígidos são inicialmente não patogênicas, visto que os cães foram avaliados por médicos veterinários no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília e não mostravam clinicamente sinais de doença gastrointestinal ligada a infecções bacterianas. É importante estudar as características das bactérias *Escherichia coli* pois estas bactérias são comensais e podem agir como oportunistas quando da ocasião de outras doenças gastrointestinais, levando ao agravamento destas (Massella, 2021; Zhao, 2020).

A formação de biofilmes é um processo complexo e multifásico, onde micro-organismos, especialmente bactérias, aderem a superfícies e formam comunidades estruturadas e protegidas por uma matriz extracelular. (Wittum, 2022) Esse fenômeno tem importância significativa em diversos contextos, incluindo ambientes clínicos, industriais e naturais. (Dissanayake, 2024) Bactérias da família Enterobacteriaceae, como a *Escherichia coli*, são conhecidas por sua capacidade de formar biofilmes, o que tem implicações em infecções persistentes e resistência antimicrobiana. (Siqueira, 2021)

A formação de biofilme é um fator crítico para a sobrevivência de *E. coli* em ambientes hostis, proporcionando proteção contra agentes antimicrobianos e resposta imune do hospedeiro (Ageorges, 2020). A capacidade de formação de biofilme de cepas de *E. coli* patogênicas (ETEC e EHEC) é significativamente maior em comparação às cepas comensais (Dissanayake, 2024), o que contribui para a persistência destas cepas em ambientes intestinais e extraintestinais e contribui para o seu potencial de patogenicidade, além de resistência a antimicrobianos. (Jacob, 2020)

Outras bactérias da família Enterobacteriaceae, como *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella Typhimurium*, são formadoras de biofilme em diversos graus (Siqueira, 2021), obtendo grau Forte de formação de biofilme principalmente quando também avaliados patogenicidade e virulência. (Fernandes, 2022) Nesse ínterim, Bujňáková, 2021, discute as etapas de formação de biofilme, a saber, adesão inicial, adesão irreversível, maturação de biofilme, e desprendimento e dispersão, além de trabalhar o grau de formação de biofilme de *Escherichia coli* em outros contextos além do intestinal, encontrando resultados semelhantes a Fernandes, 2022, quanto ao grau de formação de biofilme e a correlação com patogenicidade dessa bactéria.

O experimento mostrou que a maior parte dos inóculos estudados (44%) obteve grau moderado de formação de biofilme, corroborando com o inóculo controle, que obteve o mesmo grau. Porém, observamos 35,19% de inóculos com grau forte de formação de biofilme, o que sugere uma correlação entre a capacidade de formação de biofilme e o potencial patogênico das *Escherichia coli* estudadas, tendo como base Ageorges, 2020. Seria necessária a metodologia de Clermont, 2013, a fim de identificar o filogruppo das *E. coli* estudadas e, assim, ter mais informações sobre a possibilidade patogênica destas bactérias, ainda que em situação não patogênica. Ainda assim, os resultados estão em consonância com o que Siqueira, 2024, encontraram em relação à força de formação de biofilme, além dos encontrados por Dishan, 2022, corroborando com a sugestão de que a força de formação de biofilme pode estar correlacionada à patogenicidade dos isolados. Ainda, Ribeiro, 2022, mostra que *Escherichia coli* em outros ambientes que não o gastrointestinal é uma bactéria preocupante, mas que também estudam a formação de biofilme neste contexto, encontrando grau de formação de biofilme que tornam a *Escherichia coli* difícil de tratar. Assim, os resultados do presente estudo encontraram resultados semelhantes na literatura e podem auxiliar médicos veterinários no tratamento e prevenção das infecções por *Escherichia coli*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de cepas não patogênicas de *Escherichia coli* de formar biofilmes pode ser um fenômeno subestimado na literatura científica. Tradicionalmente, estas cepas são consideradas menos virulentas, porém alguns autores sugerem que essas cepas possuem potencial para desenvolver características associadas à patogenicidade através da formação de biofilmes. Este comportamento pode representar um mecanismo evolutivo que contribui para a resistência a condições adversas e facilita a colonização em ambientes hostis.

A correlação entre a formação de biofilmes e a patogenicidade sugere que a presença de biofilmes pode servir como um precursor ou facilitador de infecções oportunistas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. Ressalta-se a importância de considerar biofilmes de cepas não patogênicas de *E. coli* em contextos clínicos e de

saúde pública, pois podem atuar como reservatórios de resistência antimicrobiana e potencialmente transformar-se em agentes patogênicos sob as circunstâncias certas.

Estudos adicionais são necessários para uma compreensão mais completa da possível correlação entre formação de biofilme e patogenicidade em cepas de *E. coli* que afetam os cães. O papel das *E. coli* não patogênicas para o ambiente e para a microbiota de cães deve também ser mais estudado para melhor entender se estas têm mais importância na patogênese das infecções em cães. Abordagens terapêuticas inovadoras que visam a interrupção da formação de biofilmes podem ser fundamentais para mitigar os riscos associados a essas bactérias, destacando a necessidade de integrar considerações sobre biofilmes em estratégias de controle de infecções e políticas de uso de antibióticos.

9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Robins-Browne, R.M. and Hartland, E.L. (2002), *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17: 467-475. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02769.x>

Marjanca Starčič, James R Johnson, Adam L Stell, Jeanet van der Goot, Henno G.C.J.M Hendriks, Camillo van Vorstenbosch, Linda van Dijk, Wim Gaastra, Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains, *Veterinary Microbiology*, Volume 85, Issue 4, 2002, Pages 361-377, ISSN 0378-1135, [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00003-2).

Silva, N., Igrejas, G., Gonçalves, A. et al. Commensal gut bacteria: distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. *Ann Microbiol* 62, 449–459 (2012). <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0308-4>

Daniel L. Hartl, Daniel E. Dykhuizen. 1984. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.18.120184.000335>.

Poirel L. Madec J. Lupo A. Schink A. Kieffer N. Nordmann P. Schwarz S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6:10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>

Carla Camprubí-Font, Christa Ewers, Mireia Lopez-Siles, Margarita Martinez-Medina. 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00108>.

Palmela C, Chevarin C, Xu Z, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease *Gut* 2018;67:574-587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>.

Dipak Kathayat, Dhanashree Lokesh, Sochina Ranjit and Gireesh Rajashekara. *Pathogens* 2021, 10(4), 467; <https://doi.org/10.3390/pathogens10040467>.

Ame R. Manges, Hyun Min Geum, Alice Guo, Thaddeus J. Edens, Chad D. Fibke, Johann D. D. Pitout. 2019. <https://doi.org/10.1128/cmr.00135-18>.

Flament-Simon, S.-C.; de Toro, M.; García, V.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Alonso, M.P.; Goicoa, A.; Díaz-González, J.; Nicolas-Chanoine, M.-H.; Blanco, J. Molecular Characteristics of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC), Uropathogenic *E. coli* (UPEC), and Multidrug Resistant *E. coli* Isolated from Healthy Dogs in Spain. Whole Genome Sequencing of Canine ST372 Isolates and Comparison with Human Isolates Causing Extraintestinal Infections. *Microorganisms* 2020, 8, 1712. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111712>.

Hutton TA, Innes GK, Harel J, et al. Phylogroup and virulence gene association with clinical characteristics of *Escherichia coli* urinary tract infections from dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2018;30(1):64-70. doi:10.1177/1040638717729395.

Jessica M. Gilbertie, Gizem Levent, Keri N. Norman, Javier Vinasco, H. Morgan Scott, Megan E. Jacob. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108822>.

Zachary T. Kern, Megan E. Jacob, Jessica M. Gilbertie, Shelly L. Vaden, Sara K. Lyle. 2018. <https://doi.org/10.1111/jvim.15231>.

G.A.D.K.K. Gunathilaka, W.A.P.M. Dewasmika, U.M. Sandaruwan, N.G.D.A.K. Neelawala, G.E.D. Madhumali, B.N. Dissanayake, M.A.R. Priyantha, D.V. P. Prasada, D.R.A. Dissanayake. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102123>.

Massella, Elisa, Federica Giacometti, Paolo Bonilauri, Cameron J. Reid, Steven P. Djordjevic, Giuseppe Merialdi, Cristina Bacci, Laura Fiorentini, Paola Massi, Lia Bardasi, and et al. 2021. "Antimicrobial Resistance Profile and ExPEC Virulence Potential in Commensal *Escherichia coli* of Multiple Sources" *Antibiotics* 10, no. 4: 351. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040351>.

Valentin Ageorges, Ricardo Monteiro, Sabine Leroy, Catherine M Burgess, Mariagrazia Pizza, Frédérique Chaucheyras-durand, Mickaël Desvaux, Molecular determinants of surface colonisation in diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC): from bacterial adhesion to biofilm formation, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 44, Issue 3, May 2020, Pages 314–350, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa008>.

Clermont, O., Dixit, O.V.A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E. and Gordon, D. (2019), Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*, 21: 3107-3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>.

Clermont, O., Condamine, B., Dion, S., Gordon, D.M. and Denamur, E. (2021), The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. *Environ Microbiol*, 23: 7139-7151. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15742>.

Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E. and Gordon, D.M. (2013), A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports*, 5: 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>.

Marília Salgado-Caxito, Julio A. Benavides, Aiko D. Adell, Antonio Carlos Paes, Andrea I. Moreno-Switt, Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats – A scoping review and meta-analysis, *One Health*, Volume 12, 2021,100236, ISSN 2352-7714, <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100236>.

Valat Charlotte, Drapeau Antoine , Beurlet Stéphanie , Bachy Véronique , Boulouis Henri-Jean , Pin Raphaëlle , Cazeau Géraldine , Madec Jean-Yves , Haenni Marisa. Pathogenic *Escherichia coli* in Dogs Reveals the Predominance of ST372 and the Human-Associated ST73 Extra-Intestinal Lineages. *Frontiers in Microbiology* VOL11, 2020, <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.00580>. DOI:10.3389/fmicb.2020.00580. ISSN:1664-302X.

Amy L. Wedley, Susan Dawson, Thomas W. Maddox, Karen P. Coyne, Gina L. Pinchbeck, Peter Clegg, Tim Nuttall, Miranda Kirchner, Nicola J. Williams, Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics, *Veterinary Microbiology*, Volume 199, 2017, Pages 23-30, ISSN 0378-1135, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.11.017>.

Marília Salgado-Caxito, Julio A. Benavides, Jose M. Munita, Lina Rivas, Patricia García, Fernando J.P. Listoni, Andrea I. Moreno-Switt, Antonio C. Paes, Risk factors associated with faecal carriage of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* among dogs in Southeast Brazil, *Preventive Veterinary Medicine*, Volume 190, 2021, 105316, ISSN 0167-5877, <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105316>.

Vega-Manriquez, X.D., Ubiarco-López, A., Verdugo-Rodríguez, A. *et al.* Pet dogs potential transmitters of pathogenic *Escherichia coli* with resistance to antimicrobials. *Arch Microbiol* 202, 1173–1179 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01828-9>.

Benavides, Julio A., Marília Salgado-Caxito, Andrés Opazo-Capurro, Paulina González Muñoz, Ana Piñeiro, Macarena Otto Medina, Lina Rivas, Jose Munita, and Javier Millán. 2021. "ESBL-Producing *Escherichia coli* Carrying CTX-M Genes Circulating among Livestock, Dogs, and Wild Mammals in Small-Scale Farms of Central Chile" *Antibiotics* 10, no. 5: 510. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050510>

Yang, Xi, Yannong Wu, Qian Liu, Hui Sun, Ming Luo, Yanwen Xiong, Andreas Matussek, Bin Hu, and Xiangning Bai. 2021. "Genomic Characteristics of Stx2e-Producing *Escherichia coli* Strains Derived from Humans, Animals, and Meats" *Pathogens* 10, no. 12: 1551. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121551>

Jontana Allkja, Thomas Bjarnsholt, Tom Coenye, Paul Cos, Adyary Fallarero, Joe J. Harrison, Susana P. Lopes, Antonio Oliver, Maria Olivia Pereira, Gordon Ramage, Mark E. Shirtliff, Paul Stoodley, Jeremy S. Webb, Sebastian A.J. Zaat, Darla M. Goeres, Nuno Filipe Azevedo, Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates, *Biofilm*, Volume 2, 2020, 100010, ISSN 2590-2075, <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100010>.

Coffey, B.M., Anderson, G.G. (2014). Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. In: Filloux, A., Ramos, J.L. (eds) *Pseudomonas Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*, vol 1149. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48.

Fei Zhao, Huanxin Yang, Dezhong Bi, Azad Khaledi, Mingqi Qiao, A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic *E. coli* isolated from urinary tract infections, *Microbial Pathogenesis*, Volume 144, 2020, 104196, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104196>.

Laure Surgers, Anders Boyd, Pierre-Marie Girard, Guillaume Arlet, Dominique Decré, Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *International Journal of Medical Microbiology*, Volume 309, Issue 1, 2019, Pages 13-18, ISSN 1438-4221, <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.10.008>.

Katongole, P., Nalubega, F., Florence, N.C. et al. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infect Dis* 20, 453 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05186-1>.

Beebout CJ, Eberly AR, Werby SH, Reasoner SA, Brannon JR, De S, Fitzgerald MJ, Huggins MM, Clayton DB, Cegelski L, Hadjifrangiskou M 2019. Respiratory Heterogeneity Shapes Biofilm Formation and Host Colonization in Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 10:10.1128/mbio.02400-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.02400-18>.

Henly EL, Dowling JAR, Maingay JB, Lacey MM, Smith TJ, Forbes S. 2019. Biocide Exposure Induces Changes in Susceptibility, Pathogenicity, and Biofilm Formation in

Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:10.1128/aac.01892-18. <https://doi.org/10.1128/aac.01892-18>.

Qvortrup Katrine, Hultqvist Louise Dahl, Nilsson Martin, Jakobsen Tim Holm, Jansen Charlotte Uldahl, Uhd Jesper, Andersen Jens Bo, Nielsen Thomas E., Givskov Michael, Tolker-Nielsen Tim. Small Molecule Anti-biofilm Agents Developed on the Basis of Mechanistic Understanding of Biofilm Formation. *Frontiers in Chemistry*, VOL 7, 2019, <https://www.frontiersin.org/journals/chemistry/articles/10.3389/fchem.2019.00742>, DOI:10.3389/fchem.2019.00742, ISSN:2296-2646.

Hiroshi Ogasawara, Toshiyuki Ishizuka, Shuhei Hotta, Michiko Aoki, Tomohiro Shimada and Akira Ishihama. Novel regulators of the *csgD* gene encoding the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology Society*, Volume 166, Issue 9, 2020, <https://doi.org/10.1099/mic.0.000947>.

Wang Lei, Zhang Kang, Zhang Kai, Zhang Jingyan, Fu Jingjing, Li Jie, Wang Guibo, Qiu Zhengying, Wang Xuezhi, Li Jianxi. Antibacterial Activity of *Cinnamomum Camphora* Essential Oil on *Escherichia coli* During Planktonic Growth and Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology*, VOL 11, 2020, <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.561002>, DOI:10.3389/fmicb.2020.561002, ISSN:1664-302X.

G.A.D.K.K. Gunathilaka, W.A.P.M. Dewasmika, U.M. Sandaruwan, N.G.D.A.K. Neelawala, G.E.D. Madhumali, B.N. Dissanayake, M.A.R. Priyantha, D.V. P. Prasada, D.R.A. Dissanayake, Biofilm-forming ability, antibiotic resistance and phylogeny of *Escherichia coli* isolated from extra intestinal infections of humans, dogs, and chickens, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 105, 2024, 102123, ISSN 0147-9571, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102123>.

Ballash GA, Mollenkopf DF, Diaz-Campos D, van Balen JC, Cianciolo RE, Wittum TE. Pathogenomics and clinical recurrence influence biofilm capacity of *Escherichia coli* isolated from canine urinary tract infections. *PLoS ONE* 17(8): e0270461. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270461>.

F.M. Siqueira, S. De Carli, C.E. Lopes, L. Machado, T.R. Vieira, Á.G. Pöppl, M.R.I. Cardoso, A. Zaha, Non-lactose-fermenting uropathogenic *Escherichia coli* from dogs: virulence profile characterization, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 72, Issue 5, 1 May 2021, Pages 596–603, <https://doi.org/10.1111/lam.13454>.

Karahutová, Livia, René Mandelík, and Dobroslava Bujňáková. 2021. "Antibiotic Resistant and Biofilm-Associated *Escherichia coli* Isolates from Diarrheic and Healthy Dogs" *Microorganisms* 9, no. 6: 1334. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061334>.

Jessica M. Gilbertie, Gizem Levent, Keri N. Norman, Javier Vinasco, H. Morgan Scott, Megan E. Jacob, Comprehensive phenotypic and genotypic characterization and comparison of virulence, biofilm, and antimicrobial resistance in urinary *Escherichia coli* isolated from canines, *Veterinary Microbiology*, Volume 249, 2020, 108822, ISSN 0378-1135, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108822>.

Fernandes, Vera, Eva Cunha, Telmo Nunes, Elisabete Silva, Luís Tavares, Luísa Mateus, and Manuela Oliveira. 2022. "Antimicrobial Resistance of Clinical and Commensal *Escherichia coli* Canine Isolates: Profile Characterization and Comparison of Antimicrobial Susceptibility Results According to Different Guidelines" *Veterinary Sciences* 9, no. 6: 284. <https://doi.org/10.3390/vetsci9060284>.

Ribeiro, R. A. C., Olimpia Gomes, D., Queiroz, C. L., Araújo, C. de M. C., Costa, P. B., Crivellenti, S. B.-C., Crivellenti, L. Z., & Lima, A. M. C. (2022). Canine Cystitis - Biofilm Formation by Bacterial Isolates. *Acta Scientiae Veterinariae*, 50. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.119810>

Camila Azevedo Moni, Maria Eduarda Dias, Cassiane Elisabete Lopes, Franciele Maboni Siqueira, *Escherichia coli* isolated from pyometra and cystitis in the same animal exhibit a wide phenotypic similarity, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 135, Issue 5, May 2024, *lxae108*, <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae108>.

Dishan, A., Hizlisoy, H., Barel, M., Disli, H. B., Gungor, C., Ertas Onmaz, N., ... Yildirim, Y. (2022). Biofilm formation, antibiotic resistance and genotyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail chicken meats. *British Poultry Science*, 64(1), 63–73. <https://doi.org/10.1080/00071668.2022.2116697>.