

VÍTOR DE OLIVEIRA SILVA

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MEIO BIÓTICO E ABIÓTICO POR
Escherichia coli ISOLADAS DE MASTITE BOVINA NA PRESENÇA DE
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586f
2013

Silva, Vítor de Oliveira, 1986-
Formação de biofilmes em meio biótico e abiótico por
Escherichia coli isoladas de mastite bovina na presença de
antimicrobianos / Vítor de Oliveira Silva. – Viçosa, MG, 2013.
xiv, 70 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 63-69

1. Bovino de leite - Doenças. 2. Mastite. 3. *Escherichia coli*.
4. Reação de polimerase em cadeia. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20896

VÍTOR DE OLIVEIRA SILVA

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MEIO BIÓTICO E ABIÓTICO POR
Escherichia coli ISOLADAS DE MASTITE BOVINA NA PRESENÇA DE
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de abril de 2013.

Abelardo Silva Júnior
(Co-orientador)

Hilário Cuquetto Mantovani
(Co-orientador)

Andrey Pereira Lage

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira
(Orientadora)

A Deus,

A meus pais,

A todos que estiveram ao meu lado nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e iluminar meu caminho.

Aos meus pais, José Roberto da Silva e Zélia Maria de Oliveira Silva; e irmão, Felipe, por estarem ao meu lado e por me incentivar em todos os momentos.

À minha namorada, Luana, por me apoiar e estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, que me acolheu em seu laboratório durante toda a graduação e pós-graduação, que com sua sabedoria e carinho participou da minha formação humana e profissional.

Ao Fábio, Isabel, Cristian, João, David, Pricila, Pedro, Bernardo, Isis e Lucas, amigos e colegas do LDBAC e LIPOA, pela amizade e pelos bons momentos vividos.

A minha estagiária Larissa, que me auxiliou na realização dos experimentos.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV, em especial ao Luiz Carlos e Marquinhos, por toda disposição em todos os momentos em que precisei.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise, em especial a Karla e Arthur, pelo auxílio e dedicação.

A toda a minha família, pelo incentivo e carinho.

À Rosi e a Beth, por toda atenção e dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária, pela minha formação profissional.

A CAPES pela bolsa de mestrado, que foi fundamental para o meu sustento e permanência em Viçosa.

A todas as pessoas, que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização dessa dissertação de mestrado.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA

Vítor de Oliveira Silva, filho de José Roberto da Silva e Zélia Maria de Oliveira Silva, nasceu em 11 de novembro de 1986, na cidade de Governador Valadares, estado de Minas Gerais.

Em maio de 2006, iniciou seus estudos acadêmicos na Universidade Federal de Viçosa, MG, no curso de Bioquímica. Em outubro de 2007 iniciou seu estágio voluntário no Laboratório de Doenças Bacterianas, DVT/UF, onde desenvolveu sua iniciação científica e projeto de monografia entre julho de 2009 a junho de 2010, em um projeto de doutorado do aluno Fábio Alessandro Pieri, que resultou em um depósito de patente para um composto com atividade antimicrobiana contra bactérias da placa dental canina. Em janeiro de 2010 graduou-se como bacharel em Bioquímica.

Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, e em abril de 2013 submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS	8
3.1 OBJETIVO GERAL	8
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. MATERIAIS E MÉTODOS	8
4.1 GEL DE ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO – PFGE.....	9
4.2 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR).....	9
4.2.1 <i>Oligonucleotídeos</i>	10
4.3 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES PARA ESTOCAGEM	11
4.4 PREPARO DOS ANTIMICROBIANOS	11
4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA - MIC.....	11
4.6 PRODUÇÃO DE BIOFILMES NA PRESENÇA DE ANTIMICROBIANOS	12
4.6.1 <i>Avaliação quantitativa - Espectrofotometria</i>	12
4.6.2 <i>Avaliação qualitativa - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> ..	13
4.7 PERFIS DE EXPRESSÕES DOS GENES <i>LUXS</i> , <i>FLIC</i> , <i>CSGA</i> , <i>FIMA</i> E <i>GAPA</i> EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA	14
4.7.1 <i>Inoculação em superfície abiótica</i>	14
4.7.2 <i>PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)</i>	14
Preparação das amostras para qRT-PCR.....	14
Extração de RNA.....	15
Quantificação de RNA.....	16
Síntese de cDNA.....	16
Reação de PCR em tempo real	16

Análise estatística	17
4.8 ENSAIO DE ADESÃO/INVASÃO DE <i>E. COLI</i> EM CULTIVO DE CÉLULAS MAC-T..	17
4.8.1 <i>Cultivo das células MAC-T</i>	17
4.8.2 <i>Quantificação das células de E. coli</i>	18
4.8.3 <i>Coloração diferencial das bactérias</i>	19
4.9 PERFIS DE EXPRESSÕES DOS GENES <i>LUXS</i> , <i>FLIC</i> , <i>CSGA</i> , <i>FIMÁ</i> E <i>GAPÁ</i> EM CULTIVO CELULAR	19
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8. APÊNDICE	56
APENDICE A	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Genes, oligonucleotídeos e tamanho dos <i>amplicons</i> utilizados para reação de PCR convencional e PCR em tempo real quantitativa	10
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Agrupamento filogenético de 27 isolados de <i>E. coli</i> obtidos de leite mastítico utilizando o padrão de bandas gerado pelo PFGE pela digestão com a enzima <i>Xba</i> I e resultado da PCR dos genes de virulência relacionados ao biofilme	22
Figura 2. Formação de biofilmes em quatro isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de ampicilina, enrofloxacin, gentamicina e cotrimoxazol.....	25
Figura 3. Células de <i>E. coli</i> 5 aderidas (fraco produtor de biofilme) após 24 horas de incubação em caldo BHI com antimicrobianos. Magnitude: 3000x.....	27
Figura 4. Células de <i>E. coli</i> 51 aderidas (forte produtor de biofilme) após 24 horas de incubação em caldo BHI com antimicrobianos. Magnitude: 5000x.....	28
Figura 5. Células de <i>E. coli</i> 5 aderidas (fraco produtor de biofilme) após 1 h de incubação em cultivo celular com antimicrobianos e visualizadas em microscopia confocal	32
Figura 6. Células de <i>E. coli</i> 51 aderidas (forte produtor de biofilme) após 1 h de incubação em cultivo celular com antimicrobianos e visualizadas em microscopia confocal	33
Figura 7. Perfis de expressões do gene <i>luxS</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos	36
Figura 8. Perfis de expressões do gene <i>luxS</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos	37
Figura 9. Perfis de expressões do gene <i>fliC</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos	39
Figura 10. Perfis de expressões do gene <i>fliC</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos.	40

Figura 11. Perfis de expressões do gene <i>csgA</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos.....	42
Figura 12. Perfis de expressões do gene <i>csgA</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos	43
Figura 13. Perfis de expressões do gene <i>fimA</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos	45
Figura 14. Perfis de expressões do gene <i>fimA</i> em isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos em quatro isolados de <i>E. coli</i> produtores de biofilme isolados de leite bovino mastítico ...	25
Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônias/mL de <i>E. coli</i> produtores de biofilme obtidos de leite bovino com mastite no ensaio de adesão/invasão às células alveolares da glândula mamária bovina na presença de diferentes antimicrobianos	30

RESUMO

SILVA, Vítor de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Formação de Biofilmes em Meio Biótico e Abiótico por *Escherichia coli* Isoladas de Mastite Bovina na Presença de Antimicrobianos.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e Hilário Cuquetto Mantovani.

Escherichia coli é um micro-organismo de origem ambiental altamente adaptativo e sua habilidade em formar biofilmes em determinadas condições pode ser fundamental para sua resistência a tratamentos com antimicrobianos. O objetivo desse estudo foi avaliar os perfis de expressões dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* envolvidos com a formação de biofilmes em *E. coli* obtidos de leite mastítico na presença de antimicrobianos em meio biótico e abiótico. Foi avaliado o perfil genético de 27 isolados por meio de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) com a digestão enzimática *Xba*I. Quatro isolados de *E. coli*, dois fortes produtores de biofilmes (GPB) e dois fracos produtores (FPB) que possuíam os genes da sintase do autoindutor-2 (*luxS*), flagelina (*fliC*), subunidade maior da fímbria curli (*csgA*) e subunidade maior da fímbria do tipo I (*fimA*) foram selecionados por PCR convencional. Foi avaliada a concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos para realização dos demais testes com a concentração de ½ MIC. A produção de biofilme foi detectada na presença de antimicrobianos e visualizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Foram realizados ensaios de adesão/invasão de células bacterianas em cultivo de células alveolares mamárias bovinas (MAC-T) na presença de antimicrobianos, quantificados em UFC/mL, e visualizadas por meio de microscopia confocal. Posteriormente, foram analisados os perfis de expressão dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* em diferentes tempos e em superfície de inoculação abiótica e biótica. Nove (I a IX) grupos filogenéticos diferentes com similaridade >90 % foram identificados pelo PFGE. Os resultados revelaram a presença de *luxS*, *fimA* e *csgA* em todos os 27 isolados, enquanto o gene *fliC* foi detectado em 16. As MICs variaram entre 0,05 a 8 µg/mL, sendo os maiores valores obtidos para gentamicina (8 µg/mL) e para ampicilina (6 µg/mL). A enrofloxacin e o cotrimoxazol induziram a formação de biofilme em pelo menos um isolado FPB, ampicilina e gentamicina em um GPB. Também foi observado efeito redu-

tor da enrofloxacina e cotrimoxazol em pelo menos um isolado GPB. Não foi observado aumento na capacidade de adesão/invasão dos isolados de *E. coli* na presença de antimicrobianos, no entanto observou-se aumento na internalização do isolado FPB quando tratado com os antimicrobianos através da microscopia confocal. Os quatro genes foram diferencialmente expressos quando submetidos à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC dos antimicrobianos com alterações da ordem de 1,5-22 vezes. O crescimento em superfície biótica favoreceu a expressão dos genes *luxS* e *fimA* em relação à abiótica. A concentração subinibitória dos antimicrobianos estudados foi capaz de induzir a formação de biofilmes por alguns isolados, além de induzir a invasão às células hospedeiras, situação que poderia estar ocorrendo *in vivo*, resultando em um reservatório de bactéria no úbere do animal, o que poderia explicar também, o crescente aumento de casos de mastites persistentes nos rebanhos.

ABSTRACT

SILVA, Vítor de Oliveira, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Biofilm Formation on Abiotic and Biotic environments by *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitis in the Presence of Antimicrobials.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Abelardo Silva Júnior and Hilário Cuquetto Mantovani.

Escherichia coli is a microorganism of environmental origin that is highly adaptive; its ability to form biofilms under certain conditions can be critical to its resistance to antimicrobial treatments. The aim of this study was to evaluate the expression profiles of the genes *luxS* (autoinducer synthase-2), *fliC* (flagellin), *csgA* (large subunit of the fimbriae curli) and *fimA* (largest subunit type I fimbriae), which are involved in biofilm formation, in *E. coli* obtained from mastitic milk in the presence of antimicrobials on abiotic and biotic environments. The genetic profile of 27 isolates was evaluated by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) with *XbaI* enzyme digestion. Four isolates of *E. coli*, two strong biofilm producers (GBP) and two weak producers (WBP) which possessed the genes *luxS*, *fliC*, *csgA* and *fimA*, were selected by conventional PCR. The minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials was assessed for performing other tests at the concentration of $\frac{1}{2}$ MIC. The biofilm production was detected in the presence of antimicrobials and visualized through scanning electron microscopy (SEM). Assay of adhesion/invasion of bacterial cells in bovine mammary alveolar cell (MAC-T) culture in the presence of antimicrobials was quantified in CFU/mL and visualization was achieved by confocal microscopy. Subsequently, the expression profiles of the genes *luxS*, *fliC*, *csgA* and *fimA* were analyzed at different times after inoculation on abiotic and biotic surfaces. Nine (I to IX) different phylogenetic groups with similarity > 90% were identified by PFGE. The results revealed the presence of the genes *luxS*, *fimA* and *csgA* in all 27 isolates, whereas the *fliC* gene was only detected in 16. The MICs ranged from 0.05 to 8 $\mu\text{g/mL}$, with the highest values obtained for gentamicin (8 $\mu\text{g/mL}$) and ampicillin (6 $\mu\text{g/mL}$). Enrofloxacin and cotrimoxazole induced biofilm formation in at least one isolated WBP, and ampicillin and gentamicin in one isolated GBP. Also, the reducing effect of enrofloxacin and cotrimoxazole was observed in at least one isolated GBP. There was no increase in the ability of ad-

hesion/invasion of the isolates of *E. coli* in the presence of antibiotics, but an increase in the internalization of the WBP isolate when treated with antimicrobials was observed through confocal microscopy. The four genes were differentially expressed when exposed to $\frac{1}{2}$ MIC concentrations of antimicrobials with changes in the order of 1.5 to 22 times. The growth on the biotic surface favored the expression of *luxS* and *fimA* genes in relation to abiotic surfaces. The sub-inhibitory concentrations of the antimicrobials studied were able to induce the formation of biofilms by some isolates, as well as inducing invasion into host cells, which is a situation that might be occurring *in vivo*. This could result in a reservoir of bacteria in the udder of the animal, which could explain the increase in cases of persistent mastitis in herds.

1. INTRODUÇÃO

E. coli é um importante agente etiológico causador de infecções intramamárias em ruminantes e estão associados, principalmente, à mastite clínica e ambiental. Entretanto, tem sido demonstrado que alguns isolados de *E. coli* possuem uma maior capacidade em aderir e replicar no tecido mamário podendo determinar infecções persistentes no hospedeiro. Estimam-se perdas da ordem de bilhões de litros de leite por ano decorrentes da mastite na bovinocultura. Além das implicações econômicas, há que se considerar ainda a importância na saúde pública, uma vez que o leite e seus derivados, podem se tornar potenciais veículos de transmissão de patógenos e toxinas, além do risco de sua contaminação com resíduos de antimicrobianos utilizados para o seu tratamento.

Estudos demonstram que a terapia com antimicrobianos não vem obtendo resultados satisfatórios no controle da mastite. Isto é evidenciado pelo aumento de isolados resistentes aos antimicrobianos e pelo crescente número de casos de mastites recorrentes, muitas vezes causados pelo mesmo isolado bacteriano. Uma das recentes hipóteses para explicar este fato é a capacidade de micro-organismos formarem biofilmes no tecido da glândula mamária, desenvolvendo assim uma resistência à maioria dos agentes antimicrobianos e às defesas do sistema imunológico. Biofilmes são comunidades estruturadas de micro-organismos altamente organizados no interior de uma matriz de exopolissacarídeos, aderidos a uma superfície viva ou inerte com função de proteger o micro-organismo de ambientes de estresse e estão diretamente associados à redução da eficácia dos tratamentos à base de antimicrobianos, terapia usada no tratamento da mastite. Além disso, há evidências que determinados antimicrobianos usados no tratamento podem estimular a produção de biofilmes pelos micro-organismos.

Este estudo tem como objetivo avaliar os perfis de expressões de quatro genes envolvidos na formação de biofilmes de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico na presença de antimicrobianos usados na terapia dessa doença em meio biótico e abiótico, visando estudar a influência desses antimicrobianos na expressão desses genes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Mastite designa os fenômenos inflamatórios, mais comumente de natureza infecciosa, que acometem a glândula mamária dos mamíferos (Bradley, 2002). Trata-se de uma enfermidade de cunho multifatorial que tem nas inter-relações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos os fatores determinantes para sua ocorrência (LeBlanc et al., 2006).

Epidemiologicamente, a mastite bovina divide-se em mastite contagiosa e ambiental (Andrews et al., 2008). Na mastite contagiosa os patógenos predominantes são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* spp. Na mastite ambiental os microorganismos mais frequentemente isolados são representados por bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus* spp. (Oliver et al., 2011).

A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente, de curta duração e, frequentemente, com manifestação sistêmica e com maior frequência nos períodos imediatamente pré- e pós-parto, coincidindo com um período de imunossupressão por qual passa o animal (Burvenich et al., 2003). No entanto, observam-se infecções intramamárias (IMI) clonais persistentes (Dopfer et al., 1999), com prevalência estimada entre 5 e 24 % de todos os casos de mastite causada por *E. coli* (Dopfer et al., 1999; Bradley e Green, 2001). É um problema de maior relevância em rebanhos com baixa prevalência de patógenos contagiosos e em vacas com contagem de células somáticas menores que 150.000 células/mL, sendo *E. coli* o agente mais importante e o mais frequentemente isolado nessa forma da doença (Bradley e Green, 2001; Oliver et al., 2011).

A preocupação com a mastite se justifica no sentido que se estima perdas da ordem de 35 bilhões de dólares anuais em todo o mundo (Huijps et al., 2009). Nos rebanhos brasileiros a prevalência estimada é de 20 a 38 % desta enfermidade que representa uma perda de produção entre 12 a 15 %, sendo a causa de perda econômica mais significativa no setor lácteo nacional. Devem ser contabilizados ainda os gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro e a diminuição do valor comercial dos animais (Santos e Fonseca, 2007). Costa (1999) estimou que os prejuízos decorrentes da mastite nos rebanhos brasilei-

ros eram da ordem de US\$332/vaca/ano o que representa cerca de dois a três bilhões de litros perdidos por ano. Mais especificamente, para a mastite clínica, Hogeveen et al. (2011) relatam que as perdas mundiais variam de €61 a €97 por vaca acometida por ano, entretanto, esses valores podem variar conforme o tipo de exploração, ambiente e o tipo de manejo do rebanho. Steeneveld et al. (2011) encontraram custos variando de US\$224 a US\$275 por animal/ano acometido pela mastite clínica em rebanhos holandeses. Além destas perdas, há ainda um risco potencial à saúde pública, visto que, a disseminação dos patógenos, via leite e derivados, embora rara na era da pasteurização, continua a ser um risco, principalmente em nichos de mercado de produtos lácteos não pasteurizados, comércio de leite informal ou durante falhas no processo de pasteurização (Altalhi e Hassan, 2009). Além disso, há uma preocupação crescente com o uso intensivo de antimicrobianos no tratamento e controle da mastite, preocupação esta devida ao aumento de linhagens bacterianas resistentes e a transferência de resíduos antimicrobianos para a cadeia alimentar (Andrews et al., 2008; Al-Hasan et al., 2009).

Estudo desenvolvido por Fernandes et al. (2011) no Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC), DVT/UFV, investigou a presença de fatores de virulência em *E. coli* isolados de mastite bovina, caracterizando-os quanto a produção de biofilme e verotoxina, resistência à atividade lítica do complemento sérico e a presença dos genes *f5*, *f41*, *f17*, *f165*, *eae*, *sta*, *lt1*, *lt2*, *cnf*, *cldt*, *pap*, *afa*, *sfa*, *saa*, *ehly*, *hly*, *ipaH*, *fimH*, *stb*, *cs31a*, *vt2*, *east1*, *kps* e *iucD* e avaliou a conexão entre esses fatores e a infecção utilizando ferramentas fenotípicas e genotípicas. Estes autores observaram que os isolados de *E. coli* são patógenos oportunistas com diferentes fatores de virulência indicando que não há patótipos específicos causadores da mastite. Estudos realizados por Kaipainen et al. (2002) e Bean et al. (2004) também obtiveram resultados semelhantes.

E. coli é um patógeno que apresenta uma grande variedade de linhagens e fatores de virulência. Métodos de genotipagem rápidos e discriminativos tem sido usados para determinar a relação clonal de isolados de surtos nosocomiais ou doméstico (Rotariu et al., 2010; Nagano et al., 2012). Tornou-se uma técnica padrão entre agências de saúde pública devido à sua precisão e reprodutibilidade entre diferentes laboratórios (Gautom, 1997). É um importante instrumento para conhecer a

origem das bactérias associadas aos casos de mastite ambiental adquiridos pelos rebanhos (Kanatani et al., 2012; Mezzatesta et al., 2012)

A grande diversidade genética desse micro-organismo está associada a diferentes mecanismos de adesão e colonização bacteriana (Croxen e Finlay, 2010). A adesão de micro-organismos às células hospedeiras é o primeiro passo na colonização da superfície do hospedeiro (Frost, 1975; Falkow, 1991; 1997; Finlay e Falkow, 1997). *E. coli* isolados de mastite são capazes de aderir a células epiteliais mamárias bovina em condições *in vitro*, podendo alcançar o interior dessas células onde podem escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro e formar um reservatório de infecção persistente (Dopfer et al., 2000). É possível que, após a adesão e invasão de células epiteliais mamárias, um reservatório de bactérias seja formado no úbere. Este reservatório poderia ser a fonte de casos recorrentes de mastite clínica durante infecções intramamárias (IMI) persistentes. Estudo realizado por Dogan *et al.* (2006) avaliou amostras de biópsia de uma vaca persistentemente infectada por *E. coli* através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), revelando a presença de bactérias dentro de células epiteliais mamárias e ducto mamário, fornecendo suporte à hipótese anteriormente levantada.

E. coli é capaz de produzir biofilmes, um importante mecanismo de proteção e resistência a antimicrobianos (Melchior et al., 2006; Hoiby et al., 2010) e sob determinadas condições são capazes de aderir e interagir com superfícies vivas ou inertes, iniciando a reprodução celular (Burvenich et al., 2007). Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme (Fuquay, 2011). Estes representam provavelmente os mais importantes mecanismos de colonização e fixação pelos micro-organismos na natureza (Costerton et al., 1999; Fuquay, 2011). Biofilme é uma comunidade estruturada de micro-organismos organizados dentro de um complexo de estruturas e aderidos a uma superfície viva ou inerte (Costerton et al., 1999). Constitui um modo de proteção em ambientes de estresse e possui papel importante na virulência do micro-organismo (Van Houdt e Michiels, 2005).

Os biofilmes permitem que as bactérias sejam capazes de aderir às superfícies e ancorar em ambientes aquosos, de modo que as células adquirem vantagens específicas ao invadir os tecidos, tais como a resistência ao stress causado por an-

timicrobianos e forças de cisalhamento. Cada etapa na formação do biofilme requer a reprogramação da expressão gênica, e esta reprogramação ocorre em resposta às mudanças ambientais (Vidal et al., 1998; Pruss et al., 2006).

Desde o início da última década, vários estudos vêm sendo conduzidos no sentido de avaliar e caracterizar os biofilmes produzidos por diversas espécies bacterianas (Melchior et al., 2006; Dyer et al., 2007; Fuquay, 2011). O metabolismo, os fatores envolvidos na modulação, os genes responsáveis pelo desenvolvimento, bem como o mecanismo responsável pela comunicação (*quorum sensing*) entre células organizadas nos biofilmes têm sido, frequentemente, o alvo destes estudos (Dyer et al., 2007; Fuquay, 2011). Sabe-se que a produção de biofilmes está relacionada a inúmeros genes que, em resposta a estímulos externos, codificam diversas estruturas, como proteínas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS), envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento dos biofilmes (Domka et al., 2007; Dyer et al., 2007; Flemming et al., 2007; Landini, 2009).

Mecanismos de sinalização de célula para célula desempenham um papel na organização da comunidade microbiana. A regulação da expressão gênica em resposta à densidade de população de células é chamada de *quorum sensing* e envolve a produção de moléculas de sinalização extracelulares chamadas autoindutores, responsáveis pela coordenação da expressão gênica na população (Schauder et al., 2001). Em *E. coli* foi observado envolvimento de uma molécula semelhante ao autoindutor-2 (AI-2) produzido por *Vibrio harveyi*, cuja sintase é expressa pelo gene *luxS*, na formação de biofilme. Quando presente no meio extracelular em uma concentração limite é capaz de iniciar uma cascata de transduções de sinais que culmina com uma mudança no comportamento da população de células (Bassler, 1999; de Kievit e Iglewski, 2000).

Diferentes estruturas desempenham papéis importantes durante a formação de biofilme em diferentes fases na superfície bacteriana, por exemplo, os flagelos, em que o componente principal é codificado pelo gene *fliC* (flagelina), são responsáveis pela motilidade, impulsionando as células em direção à superfície favorável à colonização (Pruss et al., 2006). Além disso, os flagelos podem estar diretamente relacionados com a fixação permitindo que as bactérias alcancem a superfície a ser colonizada, facilitando a multiplicação e a disseminação (Pratt e Kolter, 1998). O processo de ligação irreversível requer que as células percam os flagelos e desen-

volvam organelas adesivas como a fimbria curli ou outras adesinas para fixação à superfície (Schembri et al., 2003). Pratt e Kolter (1998) observaram que mutantes de *E. coli* K-12 com a ausência ou a paralisação de flagelos são severamente prejudicados nos estágios iniciais da formação do biofilme. Além disso, foi verificado que a ausência da fimbria tipo I resulta em praticamente nenhuma fixação à superfície a ser colonizada, o que comprova sua importância para a interação inicial com superfícies abióticas. A fimbria do tipo I, cuja subunidade maior é expressa pelo gene *fimA*, é a adesina mais comum produzido por *E. coli* e medeia a adesão a glicoproteínas contendo manose encontradas nas superfícies de muitas células eucarióticas (Connell et al., 1996).

A fimbria curli, em que a subunidade principal é codificada pelo gene *csgA*, desempenha um papel importante na adesão de *E. coli* K-12 C600 quando em contato com o hospedeiro (Gophna et al., 2002), interagindo especificamente com proteínas da matriz tais como fibronectina, laminina e plasminogênio para iniciar a adesão e colonização (Olsen et al., 1989; Sjobring et al., 1994).

Até o presente momento, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de descobrir os genes diferencialmente expressos durante a formação de biofilme por *E. coli* através da técnica de *microarrays* de DNA (Schembri et al., 2003; Beloin et al., 2004; Ren et al., 2004; Domka et al., 2007). No entanto, pouco se sabe sobre a indução de biofilme por agentes antimicrobianos usados no tratamento de doenças.

Assim, os biofilmes têm sido alvos de preocupação nas áreas de medicina e odontologia, ocorrendo principalmente em razão do sangue, linfa e outros fluidos corpóreos representarem excelentes meios de cultivo para os micro-organismos. Estima-se que biofilmes estejam envolvidos em 65% das infecções humanas de origem bacteriana (Nascimento et al., 2007). Os dispositivos médicos que apresentam colonização por biofilmes, como os cateteres, são os responsáveis diretos pelo fracasso de muitos dos tratamentos tradicionais (Sepandj et al., 2003; Soto et al., 2007), em razão dos micro-organismos aderidos apresentarem maior resistência aos agentes antimicrobianos comumente usados na clínica médica (Smith e Hunter, 2008). Estudos *in vitro* demonstram que células bacterianas organizadas em biofilmes, sésses, tornaram-se de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células em livres dispersas no

meio, planctônicas, dos mesmos isolados (Hoiby et al., 2010; Shafahi e Vafai, 2010; Antunes et al., 2011). Estudo realizado por Costa (2011) no LDBAL/DVT/UFV verificou que as células sésseis de *E. coli* isolados de mastite foram até 2500 vezes mais resistentes ao tratamento com antimicrobianos em relação às células planctônicas. Dados epidemiológicos sugerem que mais de 40 % dos casos de mastite foram recorrentes após o fim do tratamento (Hillerton e Berry, 2005).

O tratamento com antimicrobianos é somente capaz de eliminar células planctônicas, deixando as formas sésseis vivas para propagação quando o tratamento cessar (Schwarz et al., 2001). Além disso, há evidências que determinados antimicrobianos podem estimular a produção de biofilmes pelos micro-organismos (Melchior et al., 2006; Bradley e Green, 2009; Costa et al., 2012). Três classes de antimicrobianos, incluindo tetraciclina, quinopristina-dalfopristina e eritromicina, estimulam a expressão de genes *ica* envolvidos na produção de biofilmes por *Staphylococcus epidermidis* (Melchior et al., 2006; Oliveira et al., 2007). Chen et al. (2010) observaram indução dos genes *acrA*, *agn43*, *csgA*, *csgD*, *ompF* and *pgaA*, envolvidos na resistência a antimicrobianos e na produção de biofilmes, em isolados de *E. coli* obtidos de suínos sob diferentes concentrações de aminoglicosídeos. Em estudo anterior, Hoffman et al. (2005) demonstraram que concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos, como gentamicina, tobramicina e amicacina, induzem a produção de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* isoladas de pacientes com fibrose cística. Em trabalhos desenvolvidos por Costa (2011) e Costa et al. (2012) no LDBAC, DVT/UFV, verificaram-se que concentrações subinibitórias de gentamicina (aminoglicosídeo) e enrofloxacina (quinolona) os quais são usados no tratamento da mastite clínica induzem a formação de biofilmes por *E. coli* isolados de mastite.

Tendo em vista implicações econômicas na bovinocultura brasileira e mundial, da representatividade que *E. coli* tem nos casos clínicos e do possível envolvimento dos biofilmes nos casos de mastite persistente e/ ou recorrente, o conhecimento dos perfis de expressões dos genes *fliC*, *csgA*, *fimA* e *luxS*, os quais são responsáveis pela adesão inicial e pela motilidade das células bacterianas no estágio inicial da formação do biofilme e a avaliação da capacidade de adesão/invasão de *E. coli* às células alveolares mamárias bovina (MAC-T) na presença de antimicrobianos usados no tratamento da mastite, fornecerá informações para o delineamento de novos

tratamentos ou sinergismos com os tradicionais para obtenção de resultados satisfatórios no controle da mastite.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os perfis de expressões dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* envolvidos com a formação de biofilmes por *E. coli* produtores de biofilme isolados de leite mastítico na presença de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar o perfil genético de isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico bovino através do gel de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- Avaliar a presença dos genes *fliC*, *csgA*, *fimA* e *luxS* em 27 isolados de *E. coli* produtores de biofilmes para seleção de quatro isolados (dois fracos e dois fortes produtores de biofilme);
- Avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos e verificar a produção de biofilme dos isolados selecionados quando submetidos a antimicrobianos na concentração de $\frac{1}{2}$ MIC;
- Determinar os perfis de expressão dos genes *fliC*, *csgA*, *fimA* e *luxS* de células de *E. coli* em meio biótico e abiótico na presença e ausência de diferentes antimicrobianos e comparar a influência dessas superfícies;
- Determinar a adesão/invasão de células de *E. coli* em cultivo de células MAC-T na presença de diferentes antimicrobianos;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de Doenças Bacterianas (LDBAC), Virologia Animal (LVA), Biologia Molecular (BIOMOL), pertencentes ao Departamento de Veterinária (DVT) e no Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM), todos localizados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UFV (C.E.U.A.) sob o protocolo 336/2011.

4.1 Gel de eletroforese em campo pulsado – PFGE

O perfil genético de 27 isolados de *E. coli* provenientes de amostras de leite bovino com mastite clínica de sete fazendas leiteiras localizadas nas regiões de Viçosa e Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais, Brasil, classificados segundo a produção de biofilme (Fernandes et al., 2011), foi comparado através da técnica de PFGE realizada de acordo com Moreira et al. (2009) e Chang e Chui (1998). Plugs de DNA cromossomal foram preparados utilizando 10^8 células de *E. coli* e tratados com 50 unidades de enzima de restrição *Xba*I (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O marcador Lambda (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) foi utilizado como padrão de peso molecular de 48,5- 1.018,5 kb. Os fragmentos foram separados utilizando o sistema CHEF-Dr III (BioRadLaboratories, Hercules, CA, EUA) durante 17 h, a 120°C com um pulso inicial de 2 s, e um pulso final de 20 s; ângulo 120°C; a 6 V/s. Após a separação, o gel foi corado com GelRed™ NucleicAcidStain (1X) durante 1 h e fotografado em sistema captura de imagem L-PIX HE (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

Os pulsetypes foram comparados dentro do software BioNumerics (versão 6.6, AppliedMaths NV, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando o coeficiente de Dice com tolerância 5 % e algoritmo de média aritmética de grupo pareado não ponderado (UPGMA). Os isolados que apresentaram similaridade > 90 % foram considerados grupos homogêneos.

4.2 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Foi avaliada a presença dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* nos 27 isolados de *E. coli*, para selecionar quatro isolados, dois fracos produtores de biofilme (FPB), isolados 5 e 30, e dois fortes produtores de biofilme (GBP), isolados 51 e 53, que continham os quatro genes. As reações de PCR de colônia foram realizadas utilizando o reagente PCR Master Mix (Promega BioSystems, Inc., Seoul, Coréia do Sul). Os oligonucleotídeos estão descritos no quadro 1. Uma reação contendo 25 µL foi constituída de 12,5 µL PCR Master Mix (2X), 1 µL (10 mM) de oligonucleotídeo *forward*, 1 µL (10 mM) oligonucleotídeo *reverse*, três a quatro colônias da bactéria e 10,5 µL de *nuclease-free water* (Promega BioSystems, Inc., Seoul, Coréia do Sul). O ciclo do PCR foi conduzido a 94°C por 4 min, depois 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg seguido pela etapa final de extensão a 72°C por

4 min e foi conduzido utilizando o termociclador 96 x 0,2 mL, com gradiente (Axygen Scientific, Union City, CA, E.U.A.). Foi utilizada *E. coli* K-12 como controle positivo e *nuclease-free water* como controle negativo. Foi realizado o sequenciamento no Laboratório de Genômica localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicado a Agropecuária (BIOAGRO)/UFV de dois isolados para a confirmação dos *amplicons* obtidos.

Os *amplicons* foram visualizado por eletroforese em gel de agarose 1 % (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.) em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) corado com 1 µL GelRed™ Nucleic Acid Stain (6X) (BiotiumInc, Hayward, CA, EUA) para cada 5 µL DNA utilizando-se radiação UV em sistema captura de imagem L-PIX HE.

4.2.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos específicos para cada gene, incluindo o controle endógeno *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-BLAST, disponível no endereço http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, utilizando as sequências de referências de *E. coli* depositadas no GenBank para cada gene como mostrado no quadro 1. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa, E.U.A).

Quadro 1 – Genes, oligonucleotídeos e tamanho dos *amplicons* utilizados para reação de PCR convencional e PCR em tempo real quantitativa.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
<i>luxS</i>	F.: 5' ATGAGCAGCGTGTGCTGATGC 3' R.: 5' CAACGAGTGCATCTGGTAAGTGC 3'	122
<i>fliC</i>	F.: 5' ATTAACAGCGCGAAGGATGACG 3' R.: 5' TACCGTCAGTTCACGCACACG 3'	180
<i>csgA</i>	F.: 5' GATCTGACCCAACGTGGCTTTCG 3' R.: 5' GATGAGCGGTCGCGTTGTTACC 3'	178
<i>fimA</i>	F.: 5' CTCTGGCAATCGTTGTTCTGTTCG 3' R.: 5' GCAAGCGGCGTTAACAACCTTCC 3'	119
<i>gapA</i> *	F.: 5'GATTACATGGCATACTG3' R.: 5'CAGACGAACGTTCAAGTCAA3'	244

luxS: Gene da sintase do autoindutor 2; *fliC*: gene da flagelina; *csgA*: Gene da subunidade maior da fimbria curli; *fimA*: Gene da subunidade maior da fimbria do tipo I; *gapA*: Gene da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; * Controle endógeno da PCR em tempo real quantitativa.

4.3 Meios de cultura e condições para estocagem

Selecionados aleatoriamente os quatro isolados contendo os genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA*, esses foram armazenados em microtubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Powai, Mumbai, Índia) acrescido de 20 % de glicerol e estocados a -80°C.

Como ponto de partida para a execução das diversas etapas do experimento, tomou-se como base a concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL das culturas de *E. coli*. Para isso, colônias de cada isolado foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo BHI pré-aquecido à 37°C e agitados a 2000 rpm até atingir o valor de 0,3 de absorvância¹, determinada por meio de espectrometria (Bio-tech ELx800, Winooski, E.U.A.) em comprimento de onda de 550 nm. A partir dessa concentração, quando necessário, diluições subsequentes foram realizadas a fim de se atingir a concentração adequada para a realização de cada uma das etapas do experimento.

4.4 Preparo dos antimicrobianos

Previamente foram preparadas soluções estoques, na concentração de 50 mg/mL, dos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cotrimoxazol, enrofloxacin e gentamicina obtidos em farmácia de manipulação (Formullarium Farmácia de Manipulação) e empregados no tratamento da mastite clínica. Estas soluções foram novamente diluídas, de forma seriada (sem base definida), em água destilada para as diferentes concentrações utilizadas, filtradas em membrana com poro de 0,22 µm de diâmetro (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Alemanha), alíquotadas e armazenados à temperatura de -20°C até o momento das análises, respeitados os períodos de viabilidade destas drogas.

4.5 Concentração inibitória mínima - MIC

Os quatro isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos entre as faixas de 1 a 10 µg/mL, 0,1 a 1 µg/mL e 0,01 a 0,10 µg/mL, quando necessário, para a obtenção da MIC conforme Moreira et al. (2005) com modificações. Para isso, 190 µL de cultura de cada isolado, diluída a $6,6 \times 10^5$ UFC/mL, foram adicionadas aos orifícios de placas de microtitulação de 96 orifícios

¹ 0.3 de absorvância corresponde a uma concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL de *Escherichia coli* neste experimento.

(Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, E.U.A.), juntamente com 60 µl das soluções dos antimicrobianos, em diferentes concentrações. O caldo BHI no volume de 190 µL acrescido de 60 µL das soluções antimicrobianas nas diferentes concentrações foi usado como controle negativo. Para o controle positivo, utilizou-se 190 µl das culturas diluídas juntamente com 60 µL de água destilada autoclavada.

O crescimento dos isolados foi acompanhado em um aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan® Plus-MKII, Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, E.U.A.) com comprimento de onda (λ) de 550 nm em intervalos de tempo de uma em uma hora até a estabilização dos valores. A curva de crescimento foi construída com a média estabelecida das triplicatas e plotada em programa Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, E.U.A.). A MIC foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que impediu o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária do controle positivo. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Produção de biofilmes na presença de antimicrobianos

4.6.1 Avaliação quantitativa - Espectrofotometria

Para a execução deste experimento foi utilizada a concentração subinibitória igual a $\frac{1}{2}$ MIC de cada antimicrobiano. Estudos mostram que antimicrobianos presentes em concentrações sub-MIC, podem induzir significativamente a formação de biofilme em diversas espécies bacterianas *in vitro* (Hoffman et al., 2005; Kaplan et al., 2011; Dong et al., 2012). Além disso, há o fato de que as bactérias são expostas a concentrações sub-MIC dos antimicrobianos durante o início e o final de um regime de dosagem (entre as doses) ou de forma contínua durante a terapia de baixa dose (Odenholt, 2001).

O procedimento foi realizado segundo a metodologia de Stepanovic et al. (2000) com modificações. Um volume de 190 µl de cultura diluída em meio BHI a $6,6 \times 10^5$ UFC/ml de cada isolado juntamente com 60 µl de solução de cada antimicrobiano foi adicionado aos orifícios de placas de microtitulação de 96 orifícios. Para o controle positivo, empregou-se 190 µl de cultura adicionada de 60 µl de água destilada autoclavada e para o controle negativo, foi utilizado 190 µl de caldo BHI adicionado de 60 µl de solução antimicrobiana. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e a quantificação da produção dos biofilmes foi analisada pela medida de

absorvância. Os orifícios da placa foram lavados três vezes com água destilada autoclavada e secos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 250 µl de metanol (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e permaneceram durante 15 min. Após secagem, os orifícios foram corados com cristal violeta (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 min e lavados com água destilada autoclavada, e novamente, secos a temperatura ambiente. Finalmente foram acrescidos 250 µl de ácido acético glacial 33 % (Chemco, Campinas, Brasil) por orifício.

A formação do biofilme foi medida por absorvância, em um aparelho leitor de ELISA, com comprimento de onda (λ) de 550 nm. A formação de biofilme foi avaliado comparando-se a densidade óptica do tratamento com o controle (sem antimicrobiano). O orifício contendo apenas BHI foi usado como controle negativo. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.6.2 Avaliação qualitativa - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A metodologia utilizada foi adaptada a partir de Abdi-Ali et al. (2006). Foram preparados cupons de poliestireno medindo 5x5 mm, simulando a superfície das placas de microtitulação utilizadas. Os cupons, anteriormente às análises, foram higienizados da seguinte maneira: imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2 % durante 30 min; lavagem em água destilada autoclavada; imersão em álcool 70 %; lavagem em água destilada autoclavada. Após higienização, foram secos por 5 min e expostos à radiação ultravioleta (UV) por 20 min em cabine de fluxo laminar.

A MEV foi executada para dois isolados escolhidos aleatoriamente (um FPB e um GPB) cultivados em caldo BHI contendo o antimicrobiano indutor da formação de biofilme, de acordo com os resultados do item 4.6.1. Como controle utilizou-se a cultura do micro-organismo em caldo BHI sem adição de antimicrobiano. Os cupons foram colocados em placas de poliestireno de 24 orifícios contendo 920 µL de cultura de cada isolado, diluída a $5,4 \times 10^5$ UFC/mL adicionados aos orifícios das placas para obtenção de uma concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, juntamente com 80 µL das soluções dos antimicrobianos, para obtenção de uma concentração final igual a $\frac{1}{2}$ MIC. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e, após a incubação, os cupons foram fixados em glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por um período de 2 h em temperatura ambiente.

Após a fixação, os cupons foram tratados com tetróxido de ósmio a 1 % (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, E.U.A.) por uma hora a temperatura ambiente, seguidos

de desidratação em álcool 30, 50, 70, 80, 95 e 100 % por 10 min, sendo a última etapa repedita três vezes, secagem em ponto crítico (Balzers CPD 030, Bal-Tec A.G., Balzers, Liechtenstein), montagem em suporte de alumínio e cobertura com ouro em “sputter coater” (Balzers SCA 010, Bal-Tec A.G., Balzers, Liechtenstein). Na sequência, o material foi analisado em microscópio eletrônico de varredura (1430VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, Reino Unido) em diferentes magnitudes de aumento.

4.7 Perfis de expressões dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA*, *fimA* e *gapA* em superfície abiótica

4.7.1 Inoculação em superfície abiótica

Placas de poliestireno de 24 orifícios foram utilizadas para inoculação de *E. coli*. Para isso, 920 µL de cultura de cada isolado, diluída a $5,4 \times 10^5$ UFC/mL, foram adicionados aos orifícios das placas para obtenção de uma concentração final de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL, juntamente com 80 µL das soluções dos antimicrobianos para obtenção de uma concentração final igual a $\frac{1}{2}$ MIC. O caldo BHI no volume de 920 µL acrescido de 80 µL das soluções antimicrobianas nas diferentes concentrações foi usado como controle negativo. Para o controle positivo, utilizou-se 920 µL das culturas diluídas a $5,4 \times 10^5$ UFC/mL, juntamente com 80 µL de água destilada autoclavada. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. As amostras incubadas a 37°C por 24 h conforme Costa et al. (2012). Amostras do sobrenadante foram colhidas nos tempos 0, 6, 12 e 24 h e das células aderidas no tempo 24 h para serem processadas para qRT-PCR, conforme descrito no item 4.7.2.

4.7.2 PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR)

Preparação das amostras para qRT-PCR

Para realização da qRT-PCR, tanto as células bacterianas presentes no sobrenadante, quanto as aderidas/invadidas foram submetidas à extração de RNA após o tempo de incubação.

Os sobrenadantes foram coletados utilizando micropipeta e transferidos para microtubos de 1,5 mL. Tanto a camada de células bacterianas aderidas na superfície de poliestireno como as células bacterianas aderidas/invadidas à camada de células MAC-T foram lavadas três vezes com PBS para remoção das células não aderidas

(Dopfer et al., 2000). Em seguida foram submetidas ao processo de extração de RNA.

Extração de RNA

O RNA total foi obtido utilizando solução de TRIzol (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.), conforme as recomendações do fabricante. As células coletadas do sobrenadante foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 2 min e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado, às células bacterianas aderidas e às células bacterianas aderidas/invasoras à camada de células MAC-T foram adicionados 750 μ L do reagente TRIzol, que foi homogeneizado e incubado por 5min a temperatura ambiente. Foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) e o tubo foi homogeneizado vigorosamente por 15 seg, e incubado à temperatura ambiente por 3 min. O tubo foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C e após a centrifugação, a mistura ficou separada em três partes: no fundo do tubo uma fase avermelhada (fenol+clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior, onde estava contido o RNA. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e onde foram adicionados 380 μ L de álcool isopropílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), sendo a proporção de meio mililitro para cada mililitro de TRIzol utilizado. O tubo foi incubado a temperatura ambiente por 10 min e centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 min a 4°C . O RNA precipitado formou um *pellet* em forma de gel no fundo e nas paredes do tubo. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado uma vez com etanol 75° (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, E.U.A.) a 4°C , sendo a proporção de um mililitro por mililitro de TRIzol utilizado. O tubo foi misturado e centrifugado a $7500 \times g$ por 5 min a 4°C . No fim do procedimento o *pellet* foi secado a temperatura ambiente por 5 min. Por fim, o RNA foi dissolvido em 20 μ L de água tratada com *DEPC-treated Water* (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.) passando a solução pela ponteira algumas vezes e incubado por 10 min a 37°C . O RNA eluído foi tratado com DNase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) a 37°C por 10 min e foi realizado uma análise de PCR convencional e RT-PCR utilizando os *primers* específicos (Quadro 1). A falta de um produto de PCR na amostra tratada com DNase foi utilizada como um critério para indicar que os produtos amplificados no ensaio subsequentes não foram derivados de traços de DNA genômico. Uma reação paralela, que incluiu DNA genômico de *E. coli* foi executada como um controle positivo para a reação de PCR. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição.

Quantificação de RNA

Na sequência foi realizado a quantificação do RNA total pela medida de absorvância utilizando o espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, E.U.A.) segundo as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada com a visualização dos fragmentos em gel de agarose a 1 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE).

Síntese de cDNA

Após a constatação da qualidade e pureza do RNA, a transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita com a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.), de acordo com as recomendações do fabricante. Em microtubos estéreis de 0,2 mL foi adicionado 300 ng de RNA total, 100 ng (0,5 µL) de *primer randômico hexamer* (Fermentas Inc., Maryland, E.U.A.), 1 µL da mistura de desoxirribonucleotídeos (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, E.U.A.) a 10 mM e 10,5 µL de *nuclease-free water*, a mistura foi incubada a 65°C por 5 min e em seguida, foi submetida ao frio por um minuto. Em seguida foram adicionados 4 µL de 5X *First-Strand Buffer* (Invitrogen, Washington, DC, E.U.A.), 2 µL de DTT (0,1 M) (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.), 40 unidades (1 µL) *RNaseOUT*[®] (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.) e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 min. Posteriormente, foram adicionadas 200 unidades (1µL) da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Grand Island, NY, E.U.A.) e as amostras foram incubadas a 25°C por 10 min, 37°C por 50 min e em seguida, para uma reação de inativação, a 70°C por 15 min. As amostra de cDNA foram armazenadas em *freezer* -20°C.

Reação de PCR em tempo real

As reações foram realizadas em placas com 48 micros compartimentos individuais em quadruplicatas, no equipamento *Eco*[™] *Real-Time PCR System* (Illumina Inc., San Diego, CA, E.U.A.) e foi utilizado o *kit Maxima*[®] *SYBR*[®] *Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas Inc., Maryland, E.U.A.) segundo o manual de instrução do fabricante.

Para cada reação da PCR em tempo real foram utilizados 10 µL de *MIX* (2X); 1 µL de cada oligonucleotídeo na concentração final de 100 nM; 7 µL de água *nuclease-free*, 1 µL de cDNA na concentração de, aproximadamente, 15 ng/µL, totali-

zando 20 µL por reação. O sistema de PCR em tempo real foi programado da seguinte forma: incubação por 2 min a 50°C, seguida de ativação da polimerase por 10 min a 95°C. Após este pré-tratamento, as amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições: 95°C por 30 seg, 60°C por um minuto. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (95°C por 15 seg, 55°C por 15 seg e 95°C por 15 seg) para a geração da curva de *melting*. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e/ou dímero de oligonucleotídeos. PCR em tempo real foi realizado simultaneamente para os genes alvos e para o controle endógeno (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os resultados dos valores médios do Cts foram utilizados para calcular a expressão gênica relativa dos genes alvos através do método comparativo utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Análise estatística

Os resultados da reação de PCR em tempo real foram analisados no software GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, E.U.A.). Os dados das amostras de um planejamento de um experimento fatorial no delineamento experimental inteiramente casualizado, onde a variável resposta é quantitativa, foi utilizada a análise de variância (*two-way ANOVA*) para verificação da significância estatística dos fatores (antimicrobiano, tempo). Para comparação múltipla de médias foi utilizado o teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5 % ($P=0,05$).

4.8 Ensaio de adesão/invasão de *E. coli* em cultivo de células MAC-T

4.8.1 Cultivo das células MAC-T

A linhagem de células alveolares mamárias bovina (MAC-T) doadas gentilmente pelo Dr. Yung-Fu Chang, do Colégio de Medicina Veterinária da Universidade de Cornell, Ithaca, NY, E.U.A., foi cultivada em frasco de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated - Life Sciences, Big Flats, NY, E.U.A.) em meio de manutenção (Huynh et al., 1991). Este constituído de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, E.U.A.) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), penicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂ por 24 h. O crescimento das células foi visualizado e acompanhado em

um microscópio invertido Olympus IX70 (Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japão).

4.8.2 Quantificação das células de *E. coli*

Para quantificar o total de bactérias intracelulares e aderidas à superfície das células MAC-T, foi utilizada a metodologia adotada por Almeida et al. (1996) e Dopfer (2000) com algumas modificações. Na fase estacionária, previamente detectada, as bactérias foram centrifugadas, lavadas duas vezes com um mililitro de tampão fosfato salina (PBS) (Laborclin - Produtos Para Laboratórios Ltda, Paraná, Brasil), pH 7,4, e o *pellet* foi ressuspensão em PBS. As monocamadas confluentes de células MAC-T (3×10^5 células) obtidas em placas de 24 orifícios foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com uma multiplicidade de infecção (MOI), a proporção de bactérias em relação ao número de células, de 100. As amostras foram incubadas em DMEM suplementado com 10 % de FBS com a adição de antimicrobianos, para obtenção de uma concentração final igual a $\frac{1}{2}$ MIC, a 37°C com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂. Foi realizado teste de citotoxicidade dos antimicrobianos à concentração de 10 µg/mL sobre as células MAC-T. Em placas de 24 orifícios com as monocamadas confluentes de células MAC-T (3×10^5 células) formadas, foram incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂ em DMEM suplementado com 10 % de FBS com a adição de antimicrobianos. A determinação da citotoxicidade foi avaliada de forma qualitativa através do exame microscópico das células para verificação de mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana.

Após uma hora de incubação as células foram lavadas três vezes com PBS e tratadas com 1 mL/orifício de tampão de lise contendo 0,25 % de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) e 0,25 % de Triton X-100 (Amersham, Arlington Heights, IL, E.U.A.) em PBS durante 10 min. Os lisados de células MAC-T foram diluídos em série e plaqueados em ágar BHI, e as colônias foram enumeradas após incubação durante 24 h. A adesão/invasão foi expressa em UFC/ml recuperadas por orifício da placa de cultivo. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Foi utilizado como controle placas de 24 orifícios com células MAC-T incubadas juntamente com as bactérias sem antimicrobianos.

4.8.3 Coloração diferencial das bactérias

Foi realizado o mesmo procedimento de infecção descrito no item 4.8.2. Após uma hora de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com PBS adicionado 10 % de FBS por 5 min para bloqueio de ligações não específicas. Após incubação, as células foram fixadas com formaldeído 3,7 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) durante 15 min. A coloração por imunofluorescência das bactérias foi realizada como descrito por Ramarao et al. (2000) e Dogan et al. (2006) com modificações. As células foram tratadas com anticorpo policlonal de coelho anti-*E. coli* (B65001R, Biondesign, Saco, ME, E.U.A.) diluído 1:50 em PBS com FBS 10 % (anticorpo primário) por 30 min a temperatura ambiente. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS. As bactérias extracelulares foram coradas com isotiocianato de fluoresceína (FITC)-conjugado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (F0382, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) diluído 1:100 em PBS com FBS 10 % (anticorpo secundário) e incubadas por 30min no escuro. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS. As células foram tratadas com PBS contendo 0,1 % de Triton X-100 (Amersham, Arlington Heights, IL, E.U.A.) por 15 min para permeabilização das células MAC-T. Foram realizadas mais três lavagens com PBS e, em seguida, foi realizado novo bloqueio utilizando PBS com FBS 10% por 5 min. As bactérias intracelulares foram tratadas com anticorpo policlonal de coelho anti-*E. coli* (B65001R, Biondesign, Saco, ME, E.U.A.) diluído 1:50 em PBS com FBS 10 % (anticorpo primário) por 30min a temperatura ambiente. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS. As células foram coradas com isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)-conjugado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (T677, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.) diluído 1:50 em PBS com FBS 10 % (anticorpo secundário) por 30min. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS.

Após a coloração, as lamínulas foram fixadas em lâmina de vidro com esmalte. As células foram visualizadas em um microscópio confocal de varredura a Laser (LSM510 META, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, E.U.A.).

4.9 Perfis de expressões dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA*, *fimA* e *gapA* em cultivo celular

As células MAC-T foram cultivadas em placa para cultura de células de 24 orifícios em meio de manutenção e visualizadas em um microscópio invertido Olympus

IX70. A camada celular foi lavada três vezes com um mililitro de PBS para remoção das células não aderidas a superfície da placa de cultivo. Uma MOI igual a 100 UFC em suspensão em DMEM do inóculo foi adicionada sobre a superfície da camada celular pré-formada. As amostras foram incubadas em DMEM suplementado com 10 % de FBS com a adição de antimicrobianos, para obtenção de uma concentração final de $\frac{1}{2}$ MIC, a 37°C com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂. Amostras das células aderidas foram colhidas nos tempos 0 h, 30 min, 1 h e 2 h e processadas para qRT-PCR, conforme descrito no item 4.6.2.

4.10 Análise estatística

Para avaliar se os dados obtidos no trabalho seguem a distribuição normal, empregou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Foi realizado teste de Kruskal-Wallis para identificar possíveis diferenças entre o número de UFC/mL obtidas do ensaio de adesão/invasão dos diferentes antimicrobianos testados. Posteriormente, empregou-se o teste de Dunn's para localizar as diferenças entre os grupos. Foi realizado, separadamente, o teste de Mann-Whitney para identificar possíveis diferenças entre o número de UFC/mL obtidas do ensaio de adesão/invasão entre os fracos e fortes produtores de biofilme.

Foi realizada uma análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*) para identificar possíveis diferenças entre a produção de biofilmes pelos isolados submetidos às diferentes concentrações de antimicrobianos. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de Tukey, necessário para localizar as diferenças entre os grupos.

Os testes foram realizados em três repetições e o nível de significância adotado foi de 5 % ($P=0,05$). Para a realização dos referidos testes estatísticos foi empregado o software GraphPad Prism® 5.

A comparação da influência da superfície de interface do poliestireno e da camada celular MAC-T foi realizada por meio de estatística descritiva, avaliando-se através das médias de expressão obtidas os efeitos causados por essas superfícies aos perfis de expressão dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* em *E. coli* produtores de biofilme isolados de leite bovino com mastite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

E. coli é um patógeno que apresenta um grande número de linhagens e diversos fatores de virulência associados. A digestão enzimática forneceu fragmentos que variaram de 50,5 kb a 485 kb (Figura 1). Dois isolados, 1 e 5, de *E. coli* foram excluídos do ensaio pois não foi possível observar a formação de bandas, o que poderia ter sido causado pela presença de capsula, dificultando a ação da enzima de restrição. Com base nos padrões da PFGE, observou-se grande heterogeneidade entre os isolados obtidos de leite oriundos de animais com mastite clínica. Foram identificados nove (I a IX) grupos filogenéticos diferentes com similaridade >90%. Srinivasan et al. (2007) identificaram 85 padrões genéticos diferentes a partir de 135 isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico de rebanhos da raça holandesa do estado de Nova York, USA. Dopfer et al. (1999) relataram que 63% dos *E. coli* isolados de mastite também apresentaram diferentes genótipos.

Os resultados mostraram que os isolados de *E. coli* estudados obtidos de leite bovino mastítico são geneticamente diferentes quanto submetidas a PFGE/*Xba*I, indicando possivelmente diferentes origens geográficas. Apenas em dois grupos, III e VI, foram observados agrupamentos de isolados FPB e moderados produtores de biofilmes (MPB), respectivamente (Figura 1). Os demais grupos apresentaram diversidade em relação à produção de biofilmes e aos genes de virulência associados. *E. coli* 21 (MPB) apresentou maior distância em relação aos demais, portanto foi agrupado separadamente, obtendo um coeficiente de similaridade menor que 72%, portanto, não foi epidemiologicamente relacionado aos outros isolados, o que sugere que este isolado origina-se de uma fonte diferente dos demais. Estes resultados foram publicados na revista *Canadian Journal Of Microbiology* sob o título “Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producers isolates obtained from mastitic milk” (Apêndice A).

A presença dos genes *luxS*, codificador da enzima sintase do autoindutor-2, *fimA*, codificador da subunidade maior da fímbria do tipo I, e *csgA*, codificador da subunidade maior da fímbria curli, foi observada em todos os 27 isolados analisados.

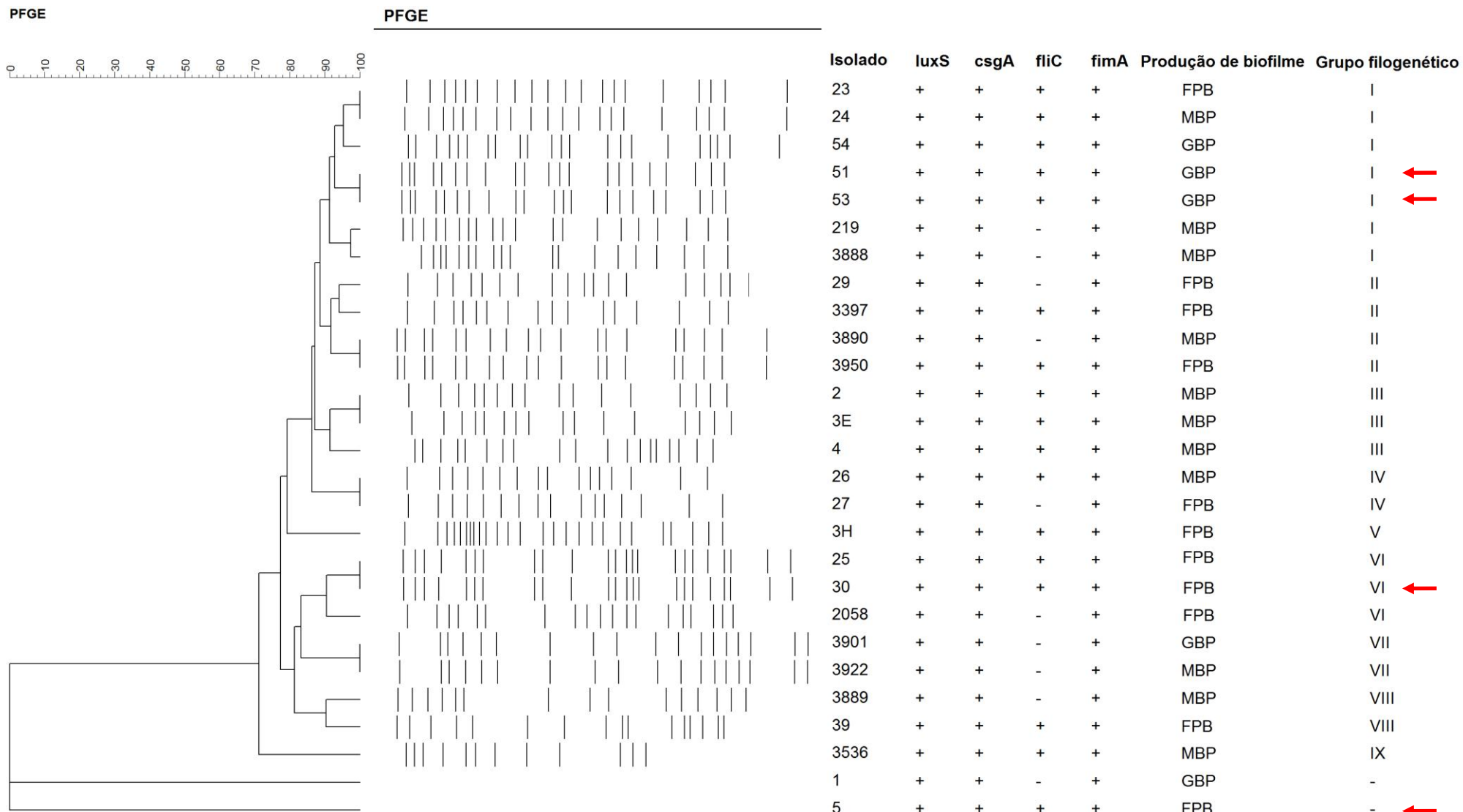


Figura 1. Agrupamento filogenético de 27 isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico utilizando o padrão de bandas gerado pelo PFGE pela digestão com a enzima *Xba*I e resultado da PCR dos genes de virulência relacionados ao biofilme. Os isolados utilizados nos experimentos estão indicados com uma seta vermelha. GBP: Forte produtor de biofilme; MPB: Moderado produtor de biofilme; FPB: Fraco produtor de biofilme.

O gene *fliC*, codificador da flagelina, foi encontrado em 16 isolados. Embora os produtos destes genes estejam ligados ao desenvolvimento de biofilmes, verificou-se neste estudo que a presença destes não está relacionada com a capacidade de produção de biofilme. Isso sugere que outros fatores e/ou eventos podem estar ligados à produção de biofilmes, como sinais ambientais e/ou genes responsáveis pela regulação da expressão ao nível molecular desses genes (O'Toole et al., 2000; Sharma et al., 2010). Além disso, mutações também podem estar envolvidas. Roe et al. (2001) observaram em *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC) O157 uma deleção de 16 pb na região de regulação gênica do gene *fimA* a qual impossibilitava a expressão desse gene.

A importância desses genes no processo de formação de biofilme foi estudada por muitos pesquisadores. Surette et al. (1999) identificaram a presença do gene *luxS* em *Vibrio harveyi*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, sendo altamente conservada entre essas espécies. Há evidências de que o produto da catálise enzimática desse gene, o AI-2, está envolvido com a produção de biofilme. Este fato foi observado por Gonzalez Barrios et al. (2006) em que a adição do AI-2 ao meio de crescimento levou a um aumento de 30 vezes na biomassa de biofilme de *E. coli* K-12 MG1655, indicando que essa molécula é capaz de induzir a produção de biofilme. As fímbrias de tipo I são encontradas em cerca de 70% das linhagens de *E. coli* (Ørskov et al., 1982), no entanto, foi verificada a presença do gene *fimA* em todos os isolados pesquisados neste estudo. Pratt e Kolter (1998) verificaram que a fímbria do tipo I e flagelos são importantes para o processo inicial de formação de biofilme, uma vez que a ausência de uma dessas estruturas leva a uma grande perda na capacidade de formação de biofilme. Neste estudo, apenas 16 isolados apresentaram o gene *fliC*, sendo observado 3/5 GPB, 5/11 MPB e 8/11 FPB. Essa distribuição sugere que a presença do flagelo não seria um fator essencial à formação de biofilme, mas uma combinação de fatores. Os resultados da fímbria curli estão de acordo com pesquisa realizada por Maurer et al. (1998) e Delicato et al. (2003) que observaram a presença do gene *csgA* em todos os isolados analisados, sugerindo sua ubiquidade entre linhagens de *E. coli*, sendo sua presença fator importante para a colonização da superfície primária e, possivelmente, subsequente desenvolvimento de biofilme.

Foram observados valores da MIC variando entre 0,125 a 8 µg/mL para os quatro isolados analisados (Tabela 1). Os maiores valores foram obtidos para gentamicina, variando entre 1,0 e 8 µg/mL, e ampicilina, entre 4,0 e 6 µg/mL. Para os demais, os valores da MIC obtidos foram baixos, variando de 0,05 a 0,125 µg/mL para enrofloxacina e 0,5 a 1 µg/mL para cotrimoxazol. *E. coli* 30 (FPB) foi o isolado que apresentou maiores valores da MIC ao conjunto de antimicrobianos testados. A partir destes dados foram estabelecidos os valores da ½ MIC para cada antimicrobiano testado.

O ensaio para avaliar a produção de biofilme na presença de antimicrobianos revelou efeito indutor sobre alguns isolados ($P < 0,05$), como observado na figura 2. A indução foi diferente entre os isolados, até mesmo dentro dos grupos formados pelos fracos e fortes produtores. Observou-se indução na produção de biofilme na presença da ampicilina e gentamicina em *E. coli* 51 (GPB) ($P < 0,05$) (Figura 2C) e enrofloxacina em dois isolados FPB, *E. coli* 5 e 30 ($P < 0,05$) (Figura 2A e 2B). No entanto, a enrofloxacina também causou redução significativa na capacidade de produção de biofilme em *E. coli* 53 (GPB) ($P < 0,05$) (Figura 2D). Na presença de cotrimoxazol, tanto aumento, verificado no *E. coli* 30 (Figura 2A), quanto efeito redutor, *E. coli* 51 e *E. coli* 53 (Figura 2C e 2D), foram observados na formação de biofilme ($P < 0,05$).

Boehm et al. (2009) verificaram indução na formação de biofilme em linhagens derivadas de *E. coli* K-12 MG1655 por β-lactâmicos (ampicilina, amoxicilina e penicilina G), por fluorquinolonas (enoxacina e ciprofloxacina) e por sulfametoxazol, uma sulfonamida presente no antimicrobiano cotrimoxazol. Boehm et al. (2009) também não observaram indução na formação de biofilme pela gentamicina, contudo, outros aminoglicosídeos, como apramicina e amicacina, apresentaram efeito indutor. Neste trabalho, foi observado efeito indutor da gentamicina na *E. coli* 51. O trimetropim, componente do antimicrobiano cotrimoxazol, também não apresentou efeito indutor. Essa diferença entre os resultados encontrados pode ser atribuída a diferenças das linhagens utilizadas. Em estudos anteriores, Costa (2011) e Costa et al. (2012) verificaram que concentrações subinibitórias de gentamicina (aminoglicosídeo) e enrofloxacina (quinolona), os quais são usados no tratamento da mastite clínica, induzem a formação de biofilmes em *E. coli* isolados de mastite.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC) dos antimicrobianos em quatro isolados de *E. coli* produtores de biofilme isolados de leite bovino mastítico

Isolado	Produção de biofilmes	Antimicrobiano (µg/mL)			
		Ampicilina	Enrofloxacina	Gentamicina	Cotrimoxazol
<i>E. coli</i> 5	FPB	4,0	0,2	8,0	0,5
<i>E. coli</i> 30	FPB	6,0	0,125	8,0	1,0
<i>E. coli</i> 51	GPB	6,0	0,05	1,0	1,0
<i>E. coli</i> 53	GPB	6,0	0,03	1,0	0,5

FPB: Fraco produtor de biofilme; GPB: Forte produtor de biofilme.

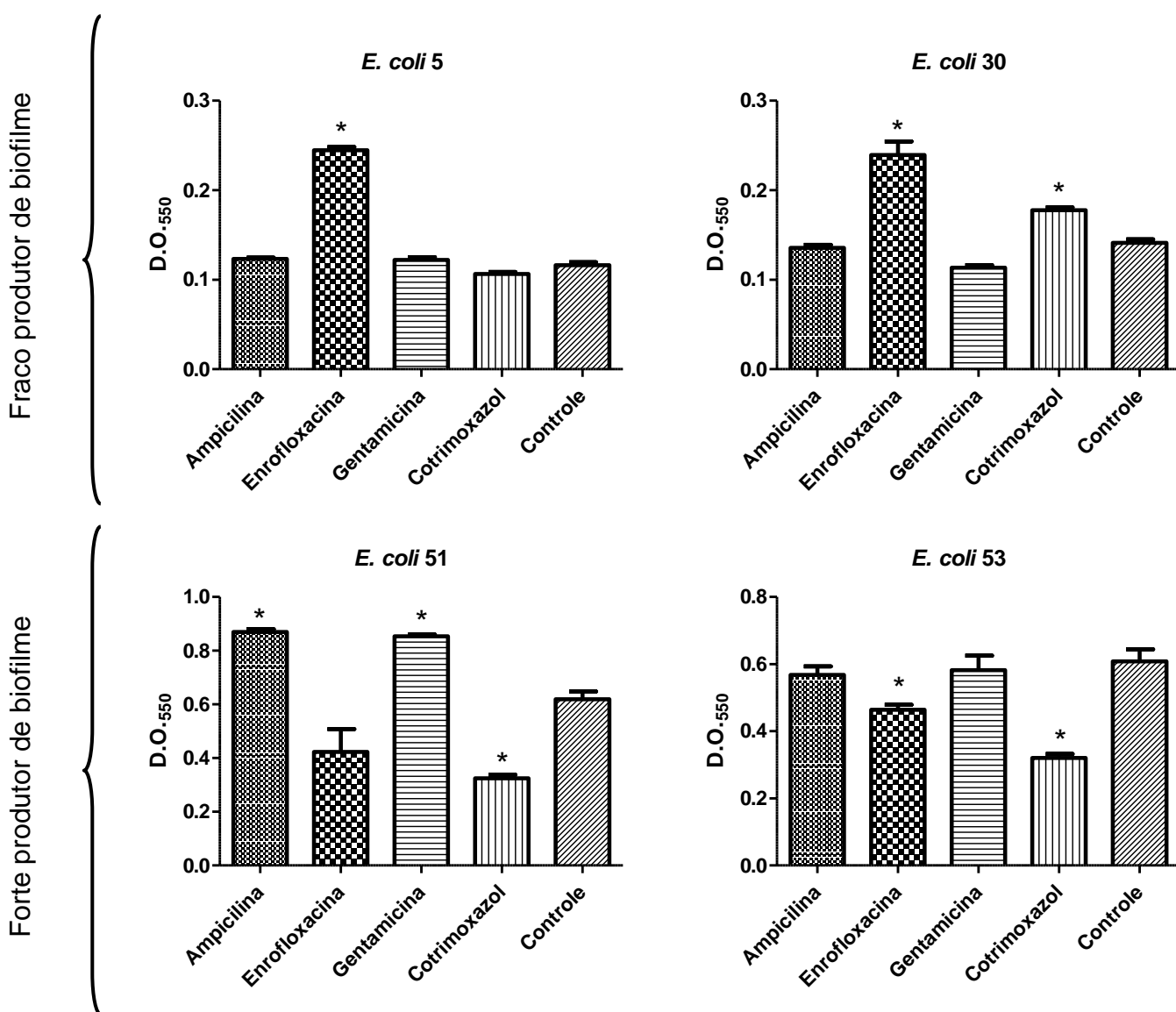


Figura 2. Formação de biofilmes em quatro isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC de ampicilina, enrofloxacina, gentamicina e cotrimoxazol. Controle: Crescimento na ausência de antimicrobiano. * Significativo a $P < 0,05$.

Hoffman et al. (2005) também demonstraram que concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos, como gentamicina, tobramicina e amicacina, induzem a produção de biofilmes em *E. coli* K-12.

Os dados do presente estudo confirmam os resultados obtidos por Costa (2011), nos quais antimicrobianos presentes em concentração sub-MIC, podem induzir significativamente a formação de biofilme em *E. coli* obtidas de leite mastítico *in vitro*. Esse fato pode ter relevância clínica porque as bactérias são expostas a concentrações sub-MIC dos antimicrobianos durante o início e o final de um regime de dosagem (entre as doses) ou de forma contínua durante a terapia de baixa dose (Odenholt, 2001).

A análise da MEV confirmou os resultados observados na indução da formação de biofilme em *E. coli* FPB e GPB quando submetidos a dose subinibitória dos antimicrobianos. Além disso, foram observadas diferenças entre os estágios de desenvolvimento do biofilme, sendo verificadas diferenças entre a quantidade de células aderidas como, também, na produção de matriz extracelular (Figuras 3 e 4). As micrografias dos biofilmes formados pela *E. coli* 5 (FPB) revelaram a presença de células aderidas à superfície, porém, em nenhuma delas demonstrou-se formação visível de matriz extracelular, tanto no controle (Figura 3A) quanto na presença de antimicrobianos (Figuras 3B e 3C). Em relação à *E. coli* 51 (GPB), no tratamento com gentamicina observa-se o biofilme com uma maior biomassa, sendo possível observar um número visualmente maior de células bacterianas aderidas e quantidades expressivas de estruturas de aspecto fibroso e disforme, possivelmente fibras de exopolissacarídeos (EPS), envolvendo as células (Figura 4B). No entanto, não foi observado o mesmo efeito do antimicrobiano ampicilina sobre o desenvolvimento do biofilme da *E. coli* 51, mostrando que a maturação do biofilme pode depender do mecanismo de ação do antimicrobiano, pois observou-se a formação de uma estrutura com maior complexidade (biofilme maduro) na presença de gentamicina, um inibidor da síntese protéica, em relação a ampicilina, que atua sobre a síntese da parede celular. Analisando a figura 4B é possível observar protuberâncias e camadas que são característicos da arquitetura tridimensional dos biofilmes bacterianos (Flint et al., 2011).

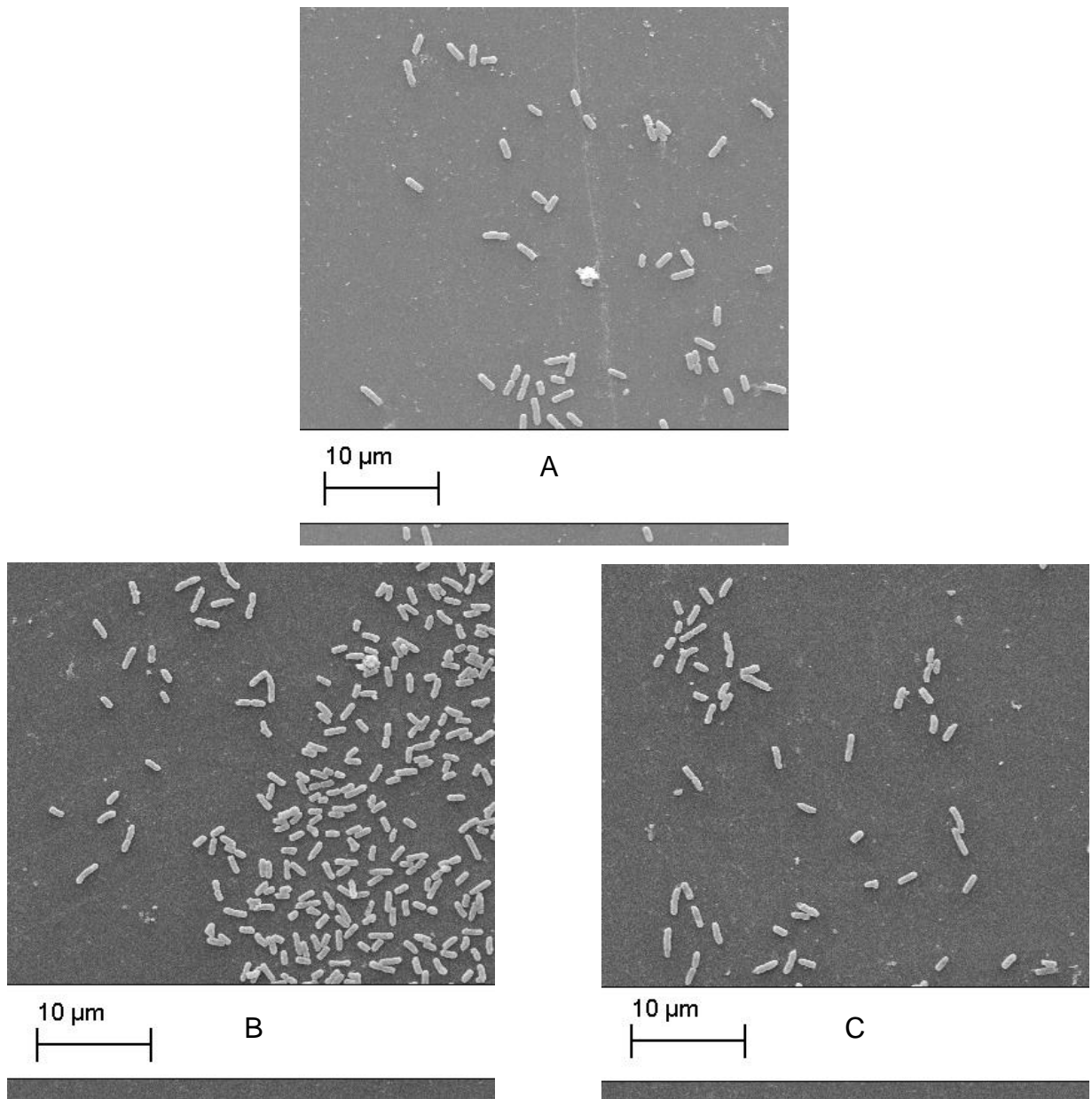


Figura 3. Células de *E. coli* 5 aderidas (fraco produtor de biofilme) após 24 horas de incubação em caldo BHI com antimicrobianos. Magnitude: 3000x. (A) Controle (sem antimicrobianos); (B) Enrofloxacina $\frac{1}{2}$ MIC; (C) Cotrimoxazol $\frac{1}{2}$ MIC.

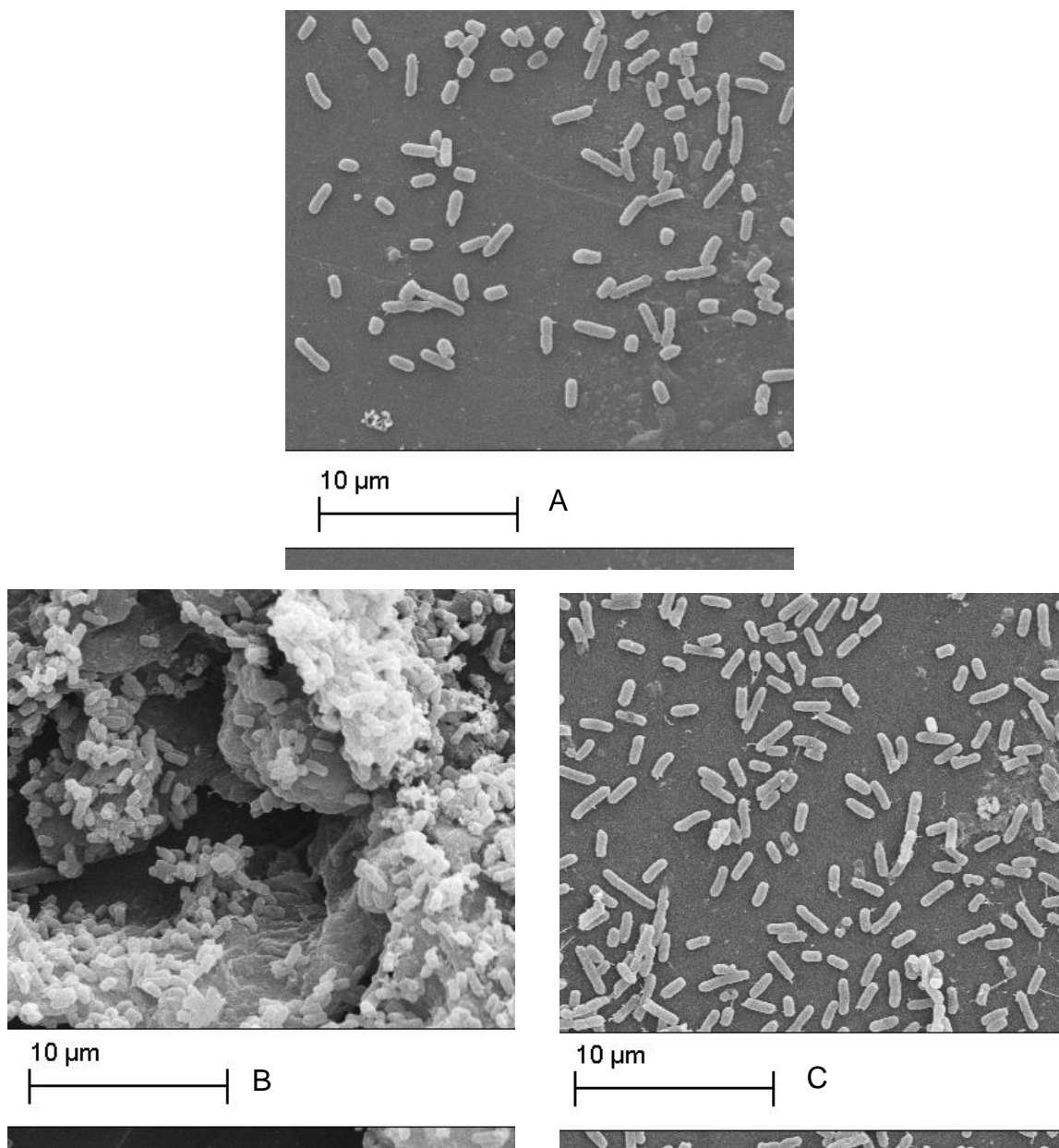


Figura 4. Células de *E. coli* 51 aderidas (forte produtor de biofilme) após 24 horas de incubação em caldo BHI com antimicrobianos. Magnitude: 5000x. (A) Controle (sem antimicrobianos); (B) Gentamicina ½ MIC; (C) Ampicilina ½ MIC.

Estes resultados confirmam os dados obtidos por Costa (2011) e Costa et al. (2012) que observaram apenas a presença de células aderidas à superfície para isolados FPB após 24 h de crescimento na presença de antimicrobianos, sem a formação visível de matriz extracelular, e a formação de estruturas complexas pelos isolados GPB. Segundo Steinberger e Holden (2004), a produção de matriz extracelular varia em função da espécie bacteriana, do isolado e das condições de crescimento, fato que pode ser observado em *E. coli* 51 (GPB) quando tratado com gentamicina, onde formou-se biofilmes com maiores biomassas e em *E. coli* 5 (FPB) uma quantidade mínima a qual foi visualizada pela MEV.

Chen et al. (2010) também verificaram uma grande produção de matriz extracelular em *E. coli* (GPB) obtidos de suínos sob a superfície de sílica gel de uso médico, fato que não foi verificado quando se utilizou isolados FPB. Santos (2009) também encontrou resultados semelhantes aos obtidos pelo presente trabalho, sendo visualizadas apenas células aderidas para os isolados FPB e células envoltas por intensa formação de EPS para os isolados de *S. aureus* GPB obtidos de leite armazenado em tanques de refrigeração.

Não foi observado aumento significativo na capacidade de adesão/invasão dos isolados de *E. coli* às células MAC-T na presença de antimicrobianos (Tabela 2). Não houve efeito citotóxico dos antimicrobianos testados à concentração de 10 µg/mL sobre as células MAC-T.

Isolados GPB apresentaram maior adesão/invasão em relação aos FPB quando tratados sem a adição de antimicrobianos, diferentemente dos resultados obtidos por Dogan et al. (2006) em que não foi observado diferença ($P < 0,05$) entre a adesão/invasão de isolados de *E. coli* obtidos de mastite persistente e não-persistente. Assim, pode-se inferir que a maior capacidade de adesão do isolado *E. coli* 51 (GPB) pode favorecer o desenvolvimento de biofilme na glândula mamária, propiciando o surgimento de um reservatório dessa bactéria no úbere do animal, o que justificaria os casos de mastite recorrente causados pela mesma linhagem bacteriana, como observado por Bradley e Green (2001) e Dopfer et al. (1999).

As imagens obtidas por microscopia confocal (Figura 5 e 6) confirmaram os resultados obtidos pelo ensaio de adesão/invasão em que *E. coli* 51 (GPB) apresentou maior número de células aderidas em relação a *E. coli* 5 (FPB).

Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônias/mL de *E. coli* produtores de biofilme obtidos de leite bovino com mastite no ensaio de adesão/invasão às células alveolares da glândula mamária bovina na presença de diferentes antimicrobianos

Isolado	Produção de biofilme	Antimicrobiano				
		Controle	Ampicilina	Enrofloxacina	Cotrimoxazol	Gentamicina
<i>E. coli</i> 5	FPB	$4,50 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$	$2,20 \times 10^5 \pm 5,3 \times 10^4$	$1,90 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^4$	$4,10 \times 10^5 \pm 4,2 \times 10^4$	$5,00 \times 10^5 \pm 5,7 \times 10^4$
<i>E. coli</i> 30	FPB	$3,13 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^4$	$2,15 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^3$	$4,37 \times 10^5 \pm 8,5 \times 10^4$	$1,20 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$
<i>E. coli</i> 51	GPB	$3,06 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$	$5,95 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^4$	$7,34 \times 10^5 \pm 3,3 \times 10^4$	$8,18 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4$	$7,41 \times 10^5 \pm 2,9 \times 10^4$
<i>E. coli</i> 53	GPB	$1,83 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^5$	$6,78 \times 10^5 \pm 3,7 \times 10^4$	$6,92 \times 10^5 \pm 4,5 \times 10^4$	$5,78 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^4$	$6,55 \times 10^5 \pm 3,8 \times 10^4$

FPB: Fraco produtor de biofilme; GPB: Forte produtor de biofilme. * Significativo a $P < 0,05$.

Analisando as imagens pode-se inferir que um dos fatores para essa maior capacidade de adesão/invasão esteja envolvido com a presença de flagelos, pois observou-se a formação dessas estruturas na *E. coli* 51 (GPB) o que não é observado na *E. coli* 5 (FPB). As figuras 5B e 5C revelaram aumento visível na internalização da *E. coli* 5 (FPB) quando tratada com os quatro antimicrobianos, o que sugere uma indução no processo de internalização causada pelo antimicrobiano presente no meio. Em nenhum momento foi observado internalização da *E. coli* 51 (GPB), tanto no controle (Figura 6A) quanto nas culturas tratadas com os quatro antimicrobianos (Figura 6B e 6C), o que indica que essa capacidade de internalização não está relacionada apenas à capacidade de adesão bacteriana, como observado por Dogan et al. (2006). Contudo, o tempo de incubação de 1 h poderia não ter sido suficiente para que a *E. coli* 51 (GPB) ativasse seu processo de internalização. Observou-se que um maior tempo de incubação com MOI igual a 100 inviabilizou a recuperação das células MAC-T, pois causou morte celular, ocorrendo desprendimento das mesmas dos fundos da placa de cultivo.

Estes resultados mostram que algumas linhagens de *E. coli* são capazes de se internalizarem, o que pode possibilitar o escape da ação dos antimicrobianos presentes no meio, além de fornecer uma vantagem de sobrevivência, permitindo resistir melhor à detecção e eliminação pelos mecanismos de defesa do sistema imune inato e adaptativo, e tem sido descrita para agentes patogênicos mamários tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* (Matthews et al., 1994; Calvinho e Oliver, 1998; Lammers et al., 1999). Dopfer et al. (2000) foi um dos primeiros a observar a invasão de culturas de células MAC-T por linhagens de *E. coli* associadas a mastite, sugerindo que este fenômeno seja responsável pelo desenvolvimento de um reservatório de *E. coli* durante a patogênese de IMI crônicas.

As expressões dos genes *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* de *E. coli* durante o crescimento do biofilme foram diferentes do observado no controle. Ocorrem alterações da ordem 1,5-22 vezes na expressão dos genes, sendo variável de acordo com a capacidade de produção de biofilme, o gene alvo e os diferentes tempos de coleta dos dados.

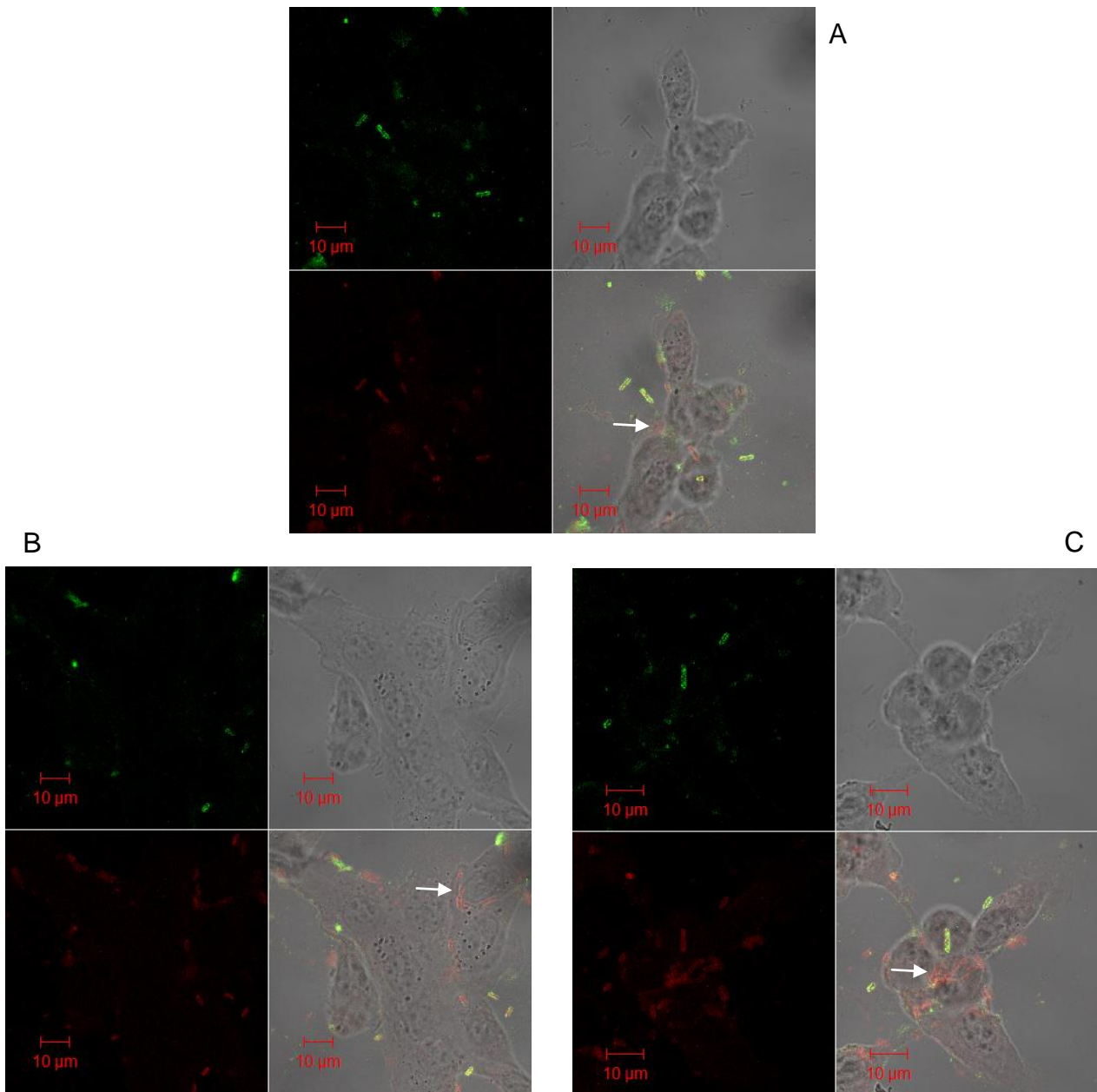


Figura 5. Células de *E. coli* 5 aderidas (fraco produtor de biofilme) após 1 h de incubação em cultivo celular com antimicrobianos e visualizadas em microscopia confocal. (A) Controle (sem antimicrobianos); (B) Ampicilina à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC; (C) Enrofloxacin à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC. As setas brancas indicam células de *E.coli* internalizadas.

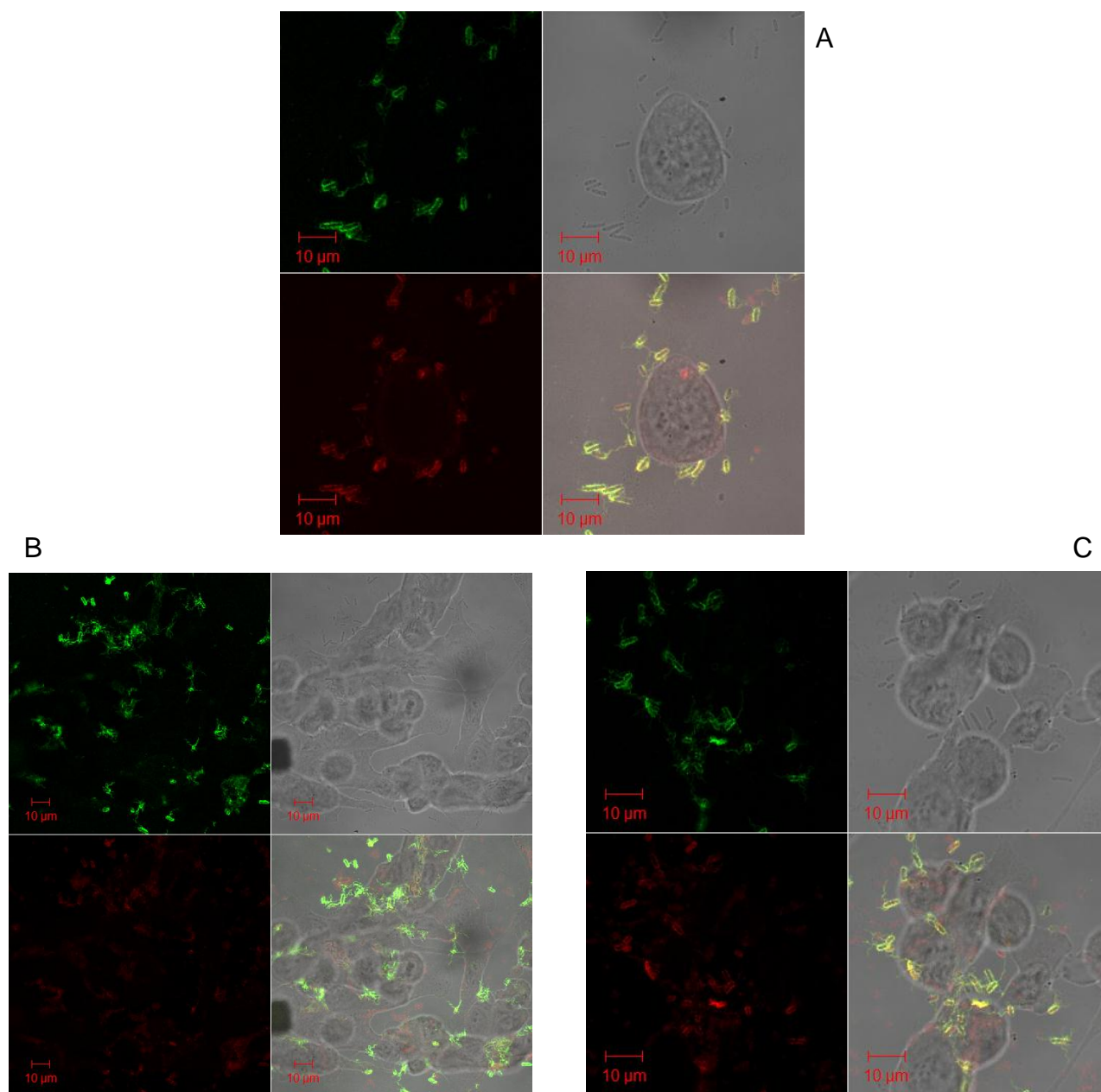


Figura 6. Células de *E. coli* 51 aderidas (forte produtor de biofilme) após 1 h de incubação em cultivo celular com antimicrobianos e visualizadas em microscopia confocal. (A) Controle (sem antimicrobianos); (B) Cotrimoxazol à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC; (C) Gentamicina à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC.

Uma regulação positiva foi verificada na maioria dos perfis de expressões dos genes tratados com concentrações de $\frac{1}{2}$ MIC dos antimicrobianos testados. Observou-se aumento na expressão do gene *luxS* nas células planctônicas na presença dos antimicrobianos testados, tanto em isolados FPB como em GPB em diferentes tempos (Figura 7A, 7B, 7C e 7D), sendo o maior aumento entre os tempos 12 e 24 h. As células sésseis também apresentaram grande aumento na expressão do gene *luxS*, sendo observada a maior expressão no tratamento da *E. coli* 51 com enrofloxacin, atingindo um valor igual a 22 vezes ($P < 0,05$) maior em relação ao controle não tratado (Figura 7C). Diferente dos resultados encontrados para a expressão do gene *luxS* em superfície abiótica, as células bacterianas aderidas ao cultivo celular na presença dos antimicrobianos testados apresentaram aumento na expressão durante todos os tempos (0,5, 1 e 2 h) de forma regular (Figura 8A, 8B, 8C e 8D), podendo ter sido causado tanto pela interação com as células MAC-T quanto por sinais ambientais, como pH, disponibilidade de nutrientes, concentração de O_2 e concentração de CO_2 , presentes no meio (Mekalanos, 1992).

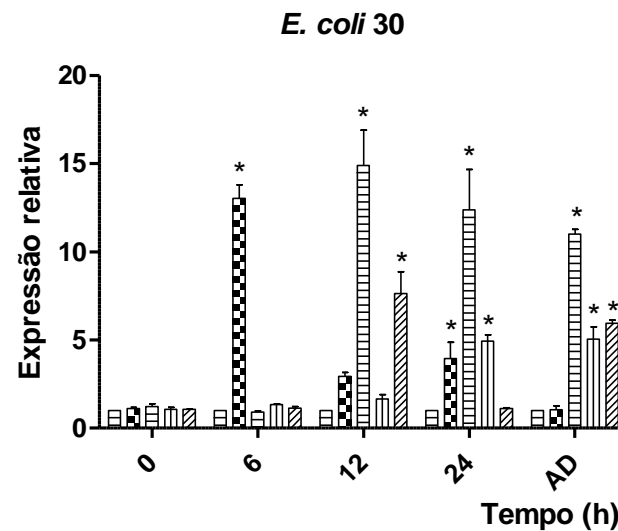
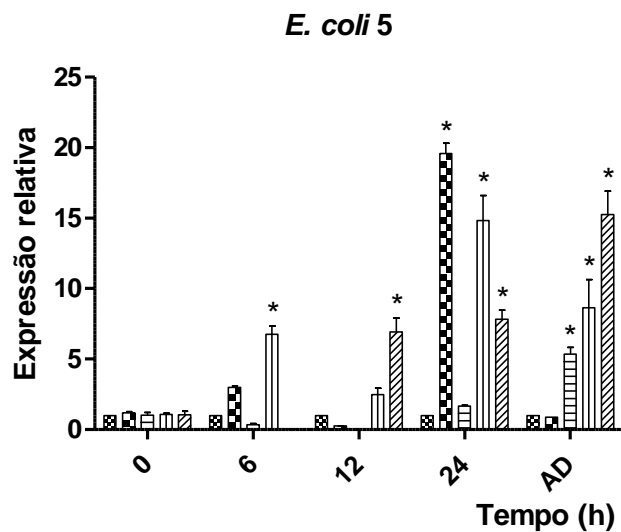
A indução observada na expressão do gene *luxS*, no entanto, não apresentou uma relação entre o aumento na expressão desse gene e a indução na formação de biofilme ou adesão/invasão ao cultivo de células MAC-T, pois o gene é expresso tanto em condições que induziram a formação biofilme quanto nas que reduziram. Este fato foi observado para *E. coli* 30 e 51 quando tratados com enrofloxacin e gentamicina ($P < 0,05$), respectivamente, onde observa-se aumento na expressão do gene *luxS* (Figuras 7B e 7C) com concomitante aumento na formação de biofilme (Figuras 2B e 2C). Observou-se também em *E. coli* 51 e 53 quando tratados com cotrimoxazol ($P < 0,05$), um aumento na expressão do gene *luxS* (Figuras 7C e 7D) mesmo com a diminuição na formação de biofilme (Figuras 2C e 2D).

Os resultados desse estudo estão em concordância com os dados observados por Domka et al. (2007) que verificaram em linhagens de *E. coli* K-12 BW25113 em um sistema de fluxo contínuo em meio Luria–Bertani (LB) que as concentrações intracelulares AI-2 em biofilmes e em células em suspensão podem variar em diferentes tomadas de tempo. Observa-se que esse gene é diferencialmente expresso quando submetido a dose subinibitória de antimicrobianos, em superfície abiótica ou em cultivo celular. No entanto, não foi possí-

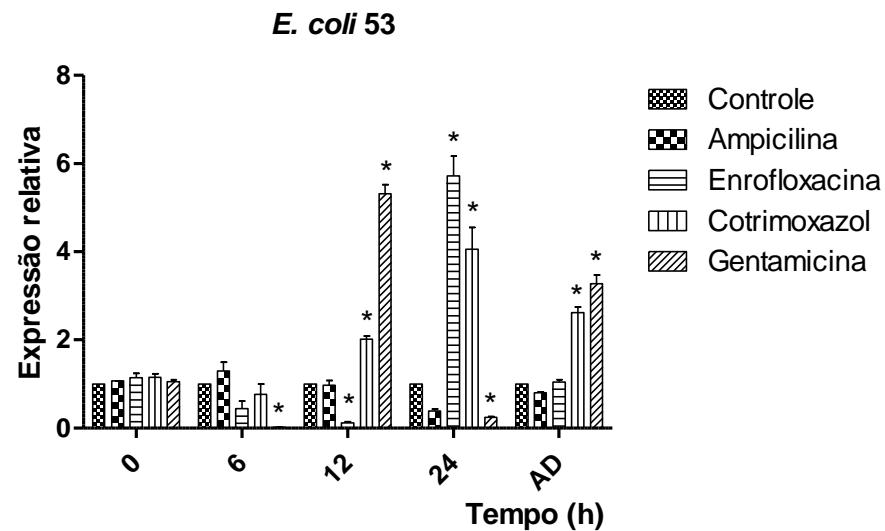
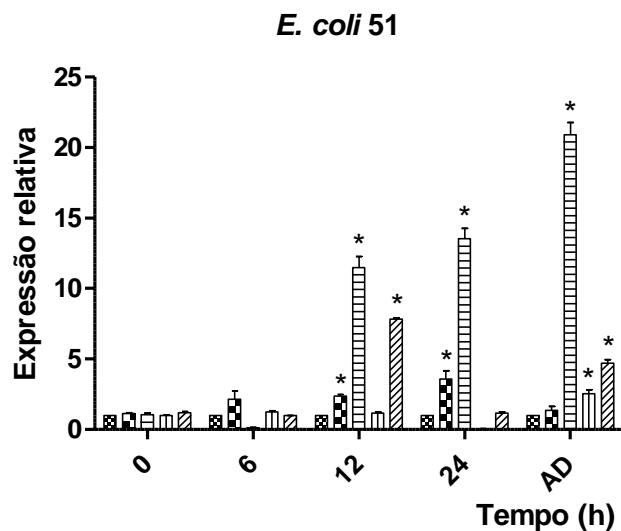
vel associar o aumento da expressão da sintase do AI-2 com a indução na formação de biofilme mesmo com estudo comprovando que o aumento na concentração de AI-2 causa um aumento na formação do biofilme (Gonzalez Barrios et al., 2006). Uma possível explicação para este fato seria que apesar do aumento da sintase do AI-2 intracelular, o produto final poderia não estar sendo sintetizado, pois os intermediários necessários para a síntese do AI-2, proteína transportadora de acil acilado (acil-ACP) ou acil-CoA que fornecem a cadeia acil enquanto S-adenosilmetionina (SAM) fornece a unidade de lactona homoserina (More et al., 1996; Jiang et al., 1998), podem não estar disponíveis para a catálise enzimática.

Superfície Abiótica

Fraco produtor de biofilme



Forte produtor de biofilme



- Controle
- Ampicilina
- Enrofloxacina
- Cotrimoxazol
- Gentamicina

Figura 7. Perfis de expressões do gene *luxS* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de 1/2 MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos. (AD) Células sésseis após 24 h. * Significativo a $P < 0,05$.

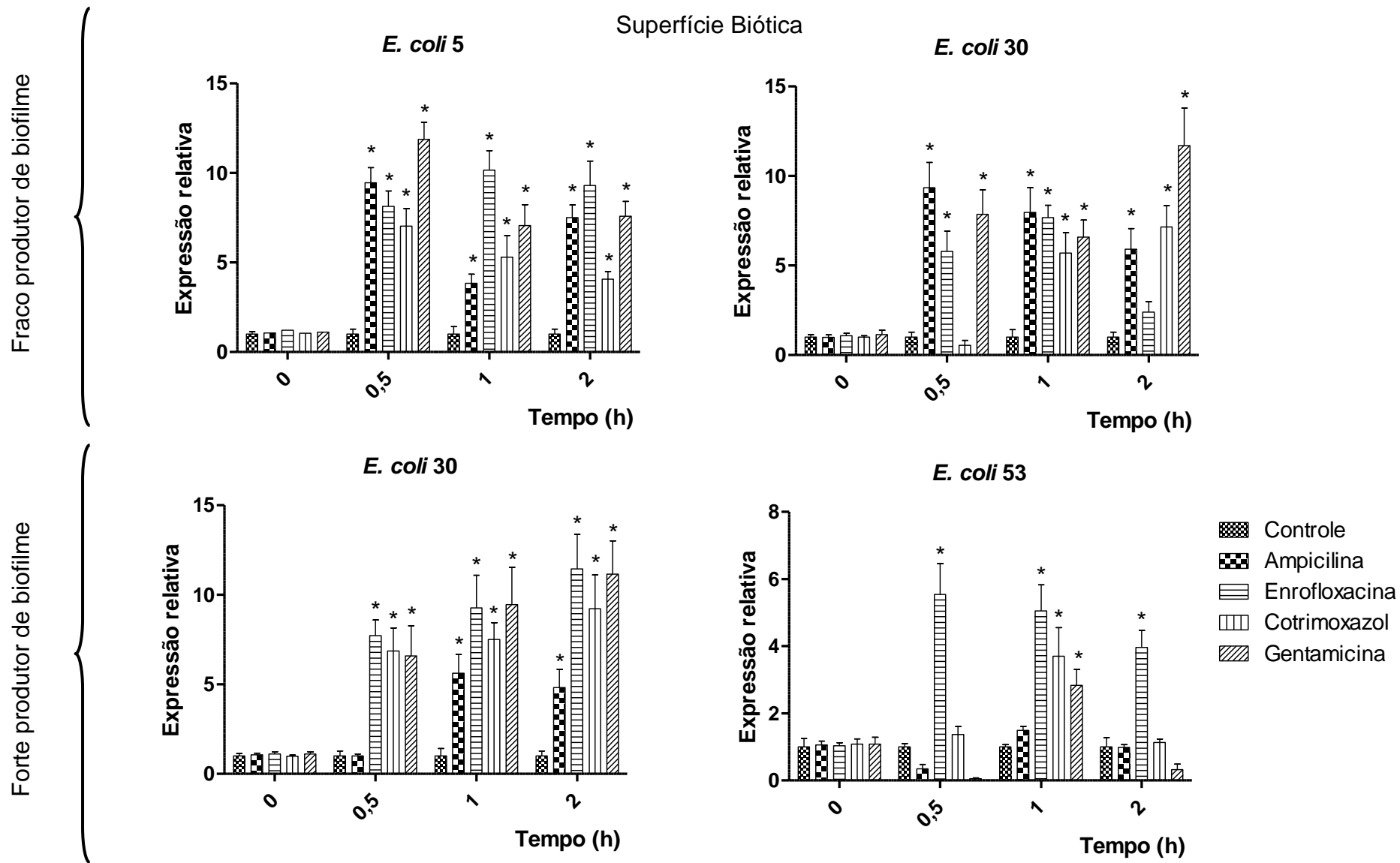


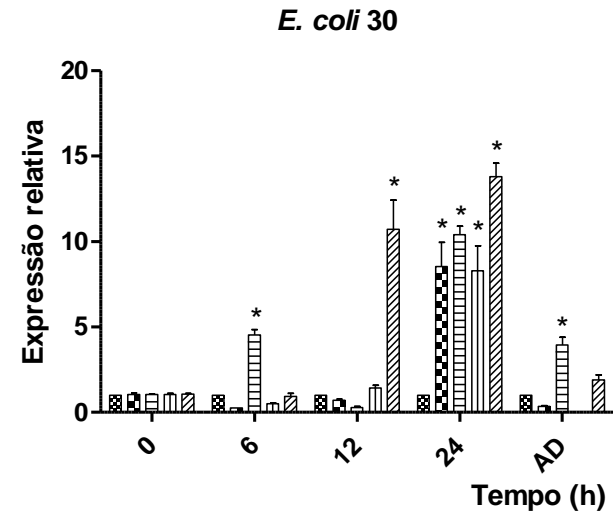
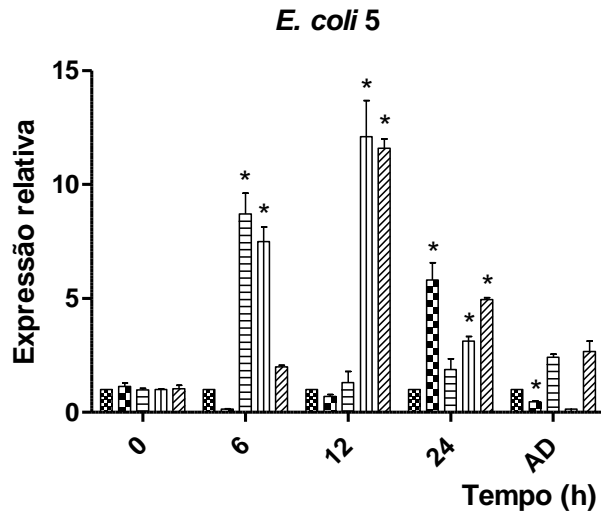
Figura 8. Perfis de expressões do gene *luxS* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de 1/2 MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos.* Significativo a $P < 0,05$.

Assim como para o gene *luxS*, observou-se aumento na expressão do gene *fliC* na presença dos antimicrobianos testados nas células planctônicas em FPB e GPB produtores de biofilme em diferentes tempos (Figura 9A, 9B, 9C e 9D), sendo observado maior aumento entre os tempos 12 e 24 h, com o maior valor de expressão relativa observado igual a 13 vezes ($P < 0,05$) para a *E. coli* 5 quando tratado com cotrimoxazol (Figura 9A). Ao contrário do observado para as células planctônicas, as células sésseis apresentaram baixa expressão da flagelina, o que era esperado, pois as células se encontram fixas sobre a superfície, não necessitando se locomover. A expressão do gene *fliC* em células bacterianas aderidas ao cultivo celular apresentou resultados semelhantes aos encontrados em superfície abiótica, com aumento na expressão durante todos os tempos (0,5, 1 e 2 h) (Figura 10A, 10B, 10C e 10D).

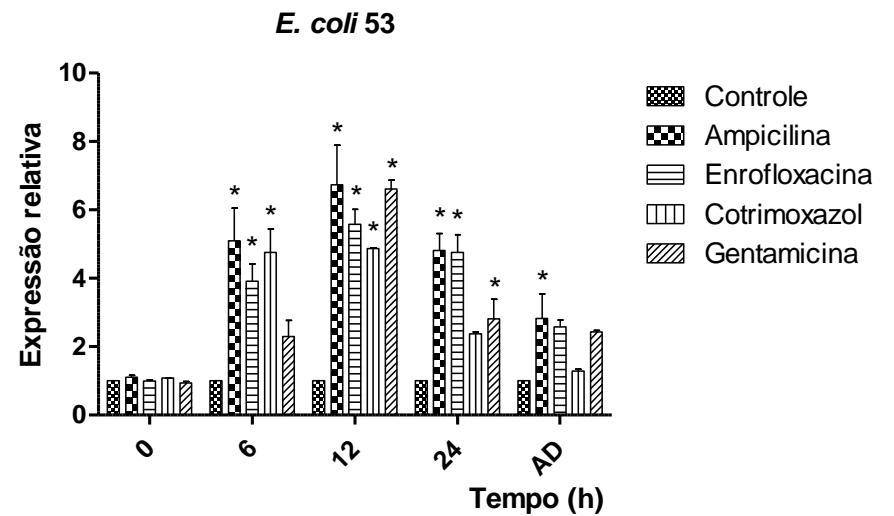
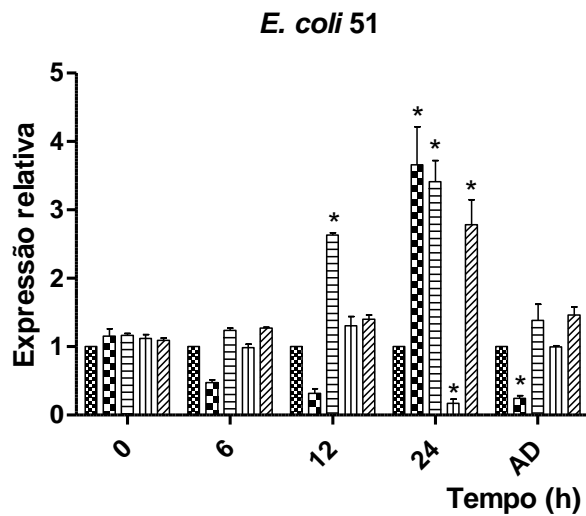
Resultados semelhantes foram encontrados por Domka et al. (2007) que observaram grande indução de genes flagelares, sendo verificado aumento de até 10 vezes no perfil de expressão do operon de biossíntese flagelar *flgB-CEF*. A ausência ou paralisação dos flagelos podem levar a uma grande diminuição na formação de biofilme, pois dificulta o alcance das células a superfície a ser colonizada. Além disso, supõe-se que os flagelos possam facilitar o processo de dispersão, permitindo que as células se espalhem ao longo da superfície (Pratt e Kolter, 1998). Ao contrário do observado Domka et al. (2007), no presente estudo a expressão do gene flagelar manteve-se praticamente inalterada em relação às células presentes no biofilme, estando de acordo com os resultados obtidos por Sauer et al. (2002) que não observou motilidade durante a maturação do biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*.

Superfície Abiótica

Fraco produtor de biofilme



Forte produtor de biofilme



- Controle
- Ampicilina
- Enrofloxacin
- Cotrimoxazol
- Gentamicina

Figura 9. Perfis de expressões do gene *fliC* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de 1/2 MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos. (AD) Células sésseis após 24 h. * Significativo a $P < 0,05$.

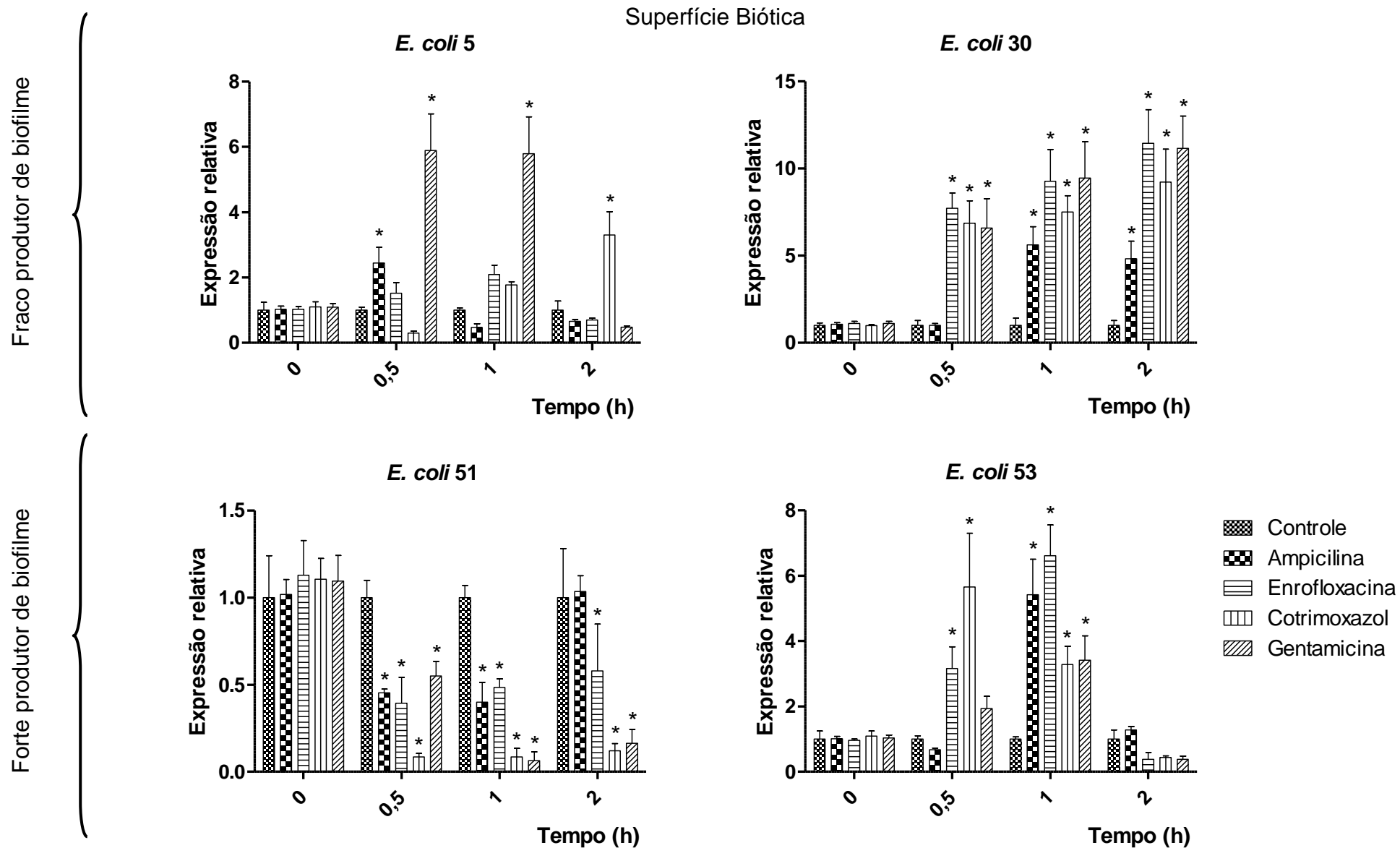


Figura 10. Perfis de expressões do gene *fliC* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de 1/2 MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos. * Significativo a $P < 0,05$.

A expressão do gene *csgA* apresentou aumento na presença dos antimicrobianos testados nas células planctônicas em FPB e GPB em relação ao controle em diferentes tempos, sendo observado maior aumento no tempo 24 h (Figura 11A, 11B, 11C e 11D), com expressão igual a 13 vezes ($P < 0,05$) para a *E. coli* 5 quando tratado com gentamicina a $\frac{1}{2}$ MIC (Figura 11A). Verificou-se também grande atividade desse gene nas células sésseis, chegando a alcançar 5 vezes ($P < 0,05$) para a *E. coli* 30 quando tratado com enrofloxacin (Figura 11B). A expressão do gene *csgA* em células bacterianas aderidas ao cultivo celular apresentou resultados semelhantes aos encontrados em superfície abiótica (Figura 12A, 12B, 12C e 12D), com aumento na expressão durante todos os tempos (0,5, 1 e 2 h).

Os resultados mostram que ocorreu indução na expressão da subunidade maior da fimbria curli antes mesmo do início da fixação à superfície inerte, indicando possuir um papel importante para o aumento da fixação bacteriana. Pesquisas mostraram que a fimbria curli é necessária para a formação de biofilme e para a autoagregação bacteriana (Vidal et al., 1998; Prigent-Combaret et al., 2000). A presença de antimicrobianos no meio de crescimento forneceu condições que favoreceram a expressão desse gene, fato que pode auxiliar no surgimento do biofilme, pois esta estrutura é essencial para a adesão inicial à superfície a ser colonizada, além de mediar a interação célula-célula em linhagens *E. coli* K-12 quando submetidas a estresse nutricional (Prigent-Combaret et al., 2000). Ao contrário do observado por Schembri et al. (2003) que avaliaram a expressão gênica de *Escherichia coli* K-12 MG1655 através de *microarray* utilizando um sistema de fluxo em meio mínimo com 0,2% de glicose, neste estudo os flagelos e a fimbria curli apresentaram aumento na expressão, variando de 1,5-13 vezes, o que poderia ter sido ocasionado pela diferença na composição do meio de crescimento, pelo modelo de formação de biofilme e pelos isolados utilizados.

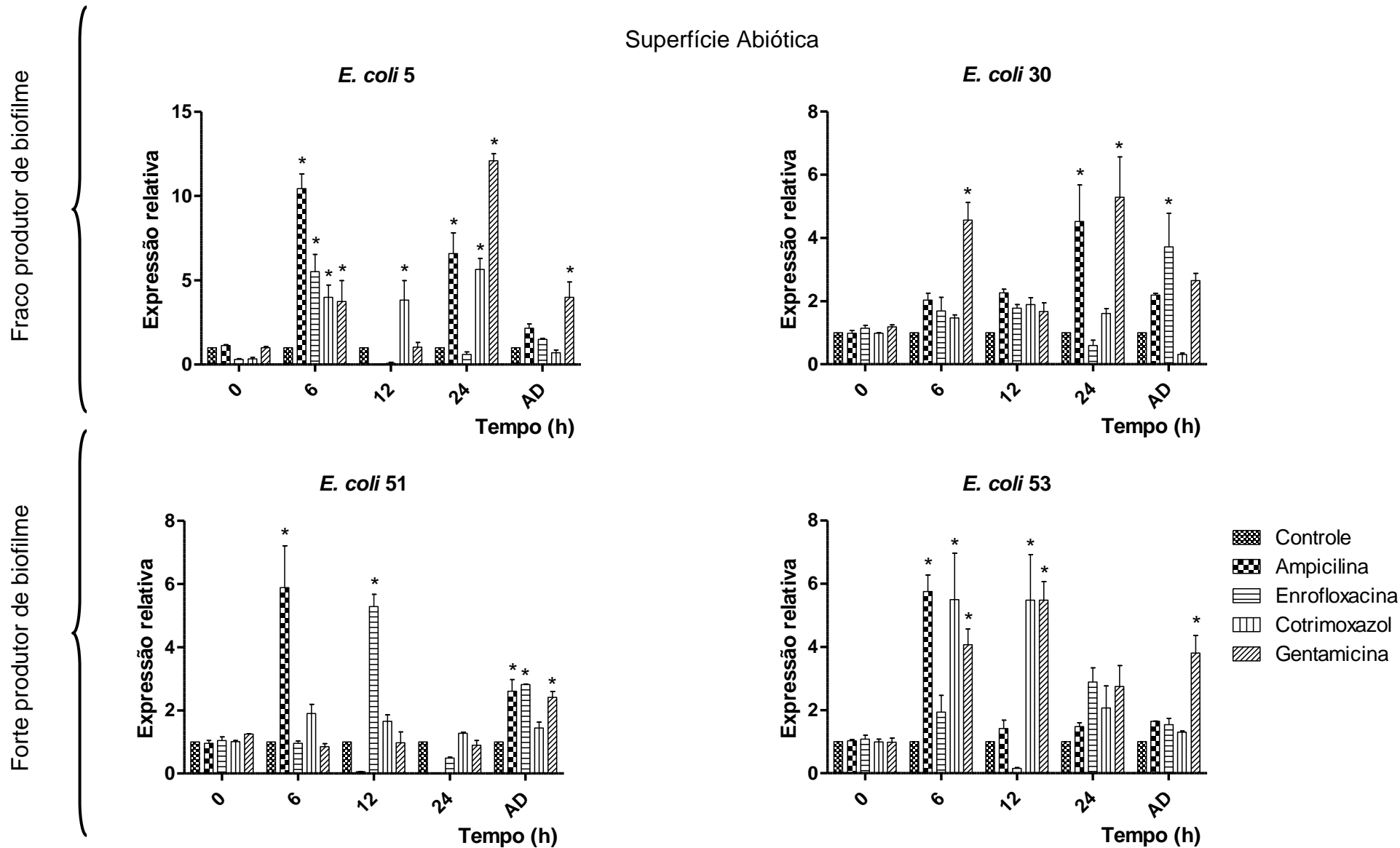


Figura 11. Perfis de expressões do gene *csgA* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos. (AD) Células sésseis após 24 h * Significativo a $P < 0,05$.

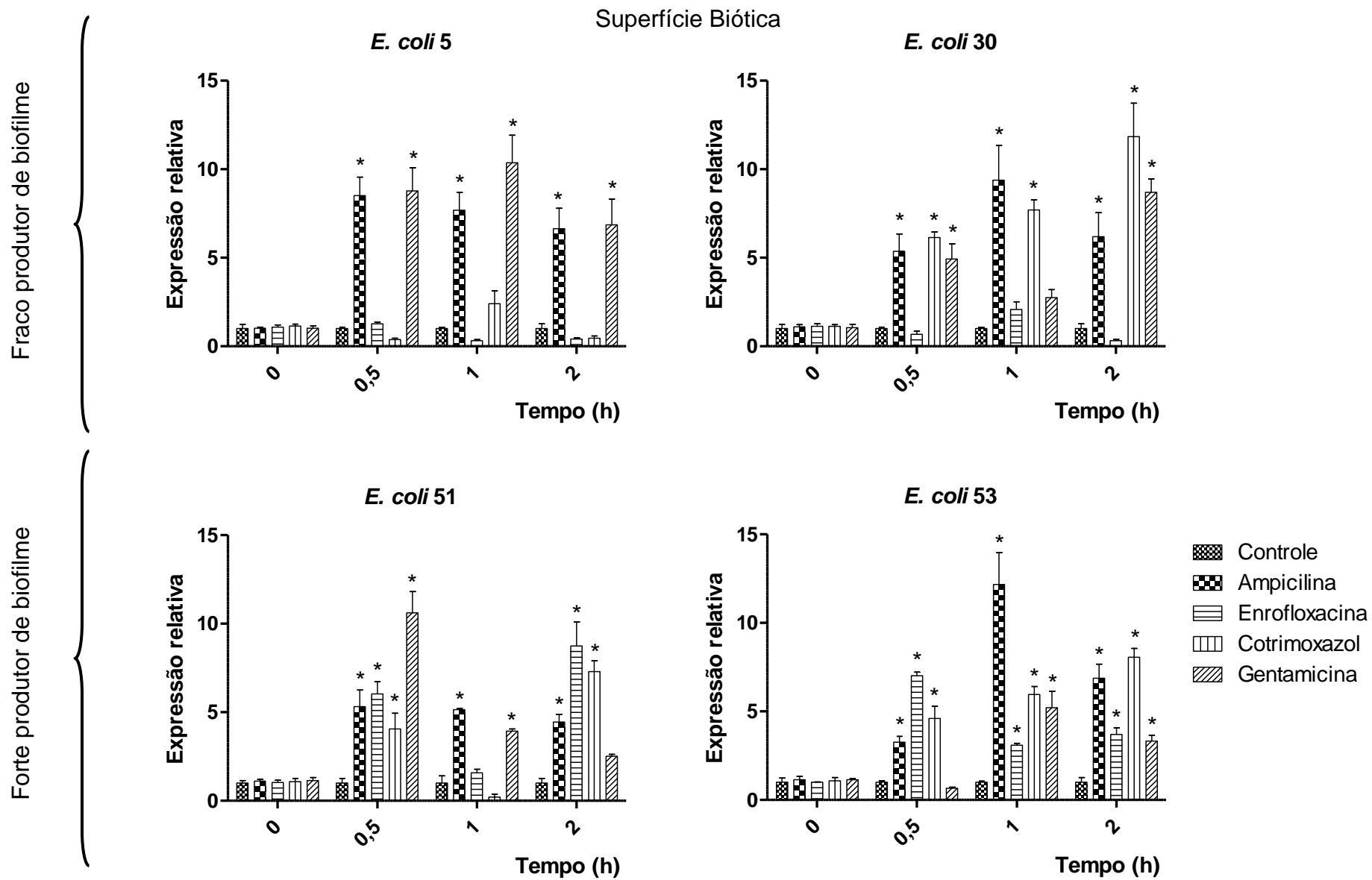


Figura 12. Perfis de expressões do gene *csgA* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de ½ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos. * Significativo a $P < 0,05$.

Como observado para os genes *luxS* e *fliC*, a expressão do gene *fimA* apresentou aumento nas células planctônicas em FPB e GPB em diferentes tempos, sendo observado maior aumento nos tempos 12 e 24 h (Figura 13A, 13B, 13C e 13D). Os antimicrobianos que mais induziram a expressão foram a ampicilina e gentamicina, com o maior valor de expressão relativa observada igual a 22 vezes ($P < 0,05$) para a *E. coli* 5 quando tratado com gentamicina (Figura 13A) e 8 vezes para a *E. coli* 51 com ampicilina (Figura 13C). Nas células sésseis foi verificada baixa atividade desse gene. A expressão do gene *fimA* em células bacterianas aderidas ao cultivo celular apresentou maior expressão quando comparado aos encontrados em superfície abiótica (Figura 14A, 14B, 14C e 14D), com aumento na expressão durante todos os tempos (0,5, 1 e 2 h). Essa diferença pode ter ocorrido devido a presença de glicoproteínas na superfície das células MAC-T que podem ter estimulado a expressão desse gene, uma vez que as fímbrias do tipo I medeiam a adesão a glicoproteínas contendo manose encontradas nas superfícies de muitas células eucarióticas (Connell et al., 1996).

Os resultados mostram que o gene da subunidade maior da fímbria do tipo I apresentou aumento na sua expressão quando submetidas à dose subinibitória de antimicrobianos tanto nos casos de indução da formação de biofilme, como observado na *E. coli* 51 quando tratado com gentamicina (Figura 2C) quanto nos casos de inibição, como observado para a *E. coli* 53 quando tratado com cotrimoxazol (Figura 2D). Contudo, o aumento na expressão do gene *fimA* nos casos que ocorreram indução na formação de biofilme foi muito superior ao encontrado quando o antimicrobiano causou inibição na formação de biofilme, alcançando um aumento de até 16 vezes, indicando possível envolvimento dessa estrutura na fixação inicial e autoagregação bacteriana. Estudos observaram a indução do gene fimbrial *fimA* em células planctônicas durante o processo de formação de biofilme por *E. coli* (Schembri et al., 2003; Domka et al., 2007). Domka et al. (2007) através dos dados de *microarray* observaram aumento de até 9 vezes no gene *fimA*, como também foi observada repressão de até 16 vezes em alguns isolados submetidos ao mesmo tratamento. Os resultados são compatíveis com os observados nesse experimento, sendo necessários mais estudos para esclarecer o papel da fímbria do tipo I na formação de biofilmes por *E. coli*.

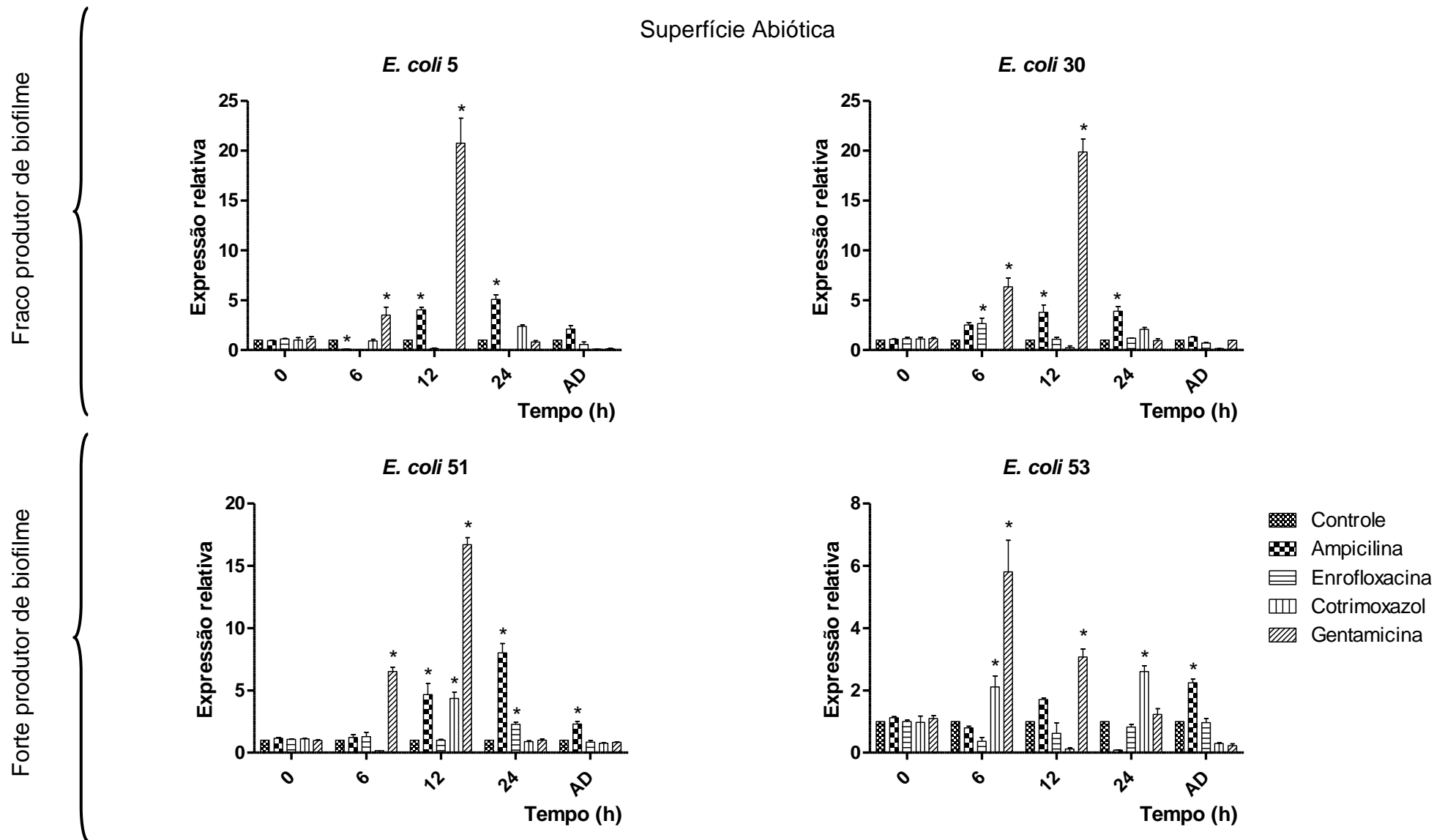


Figura 13. Perfis de expressões do gene *fimA* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC de antimicrobianos cultivados em superfície abiótica em diferentes tempos. (AD) Células sésseis após 24 h. * Significativo a $P < 0,05$.

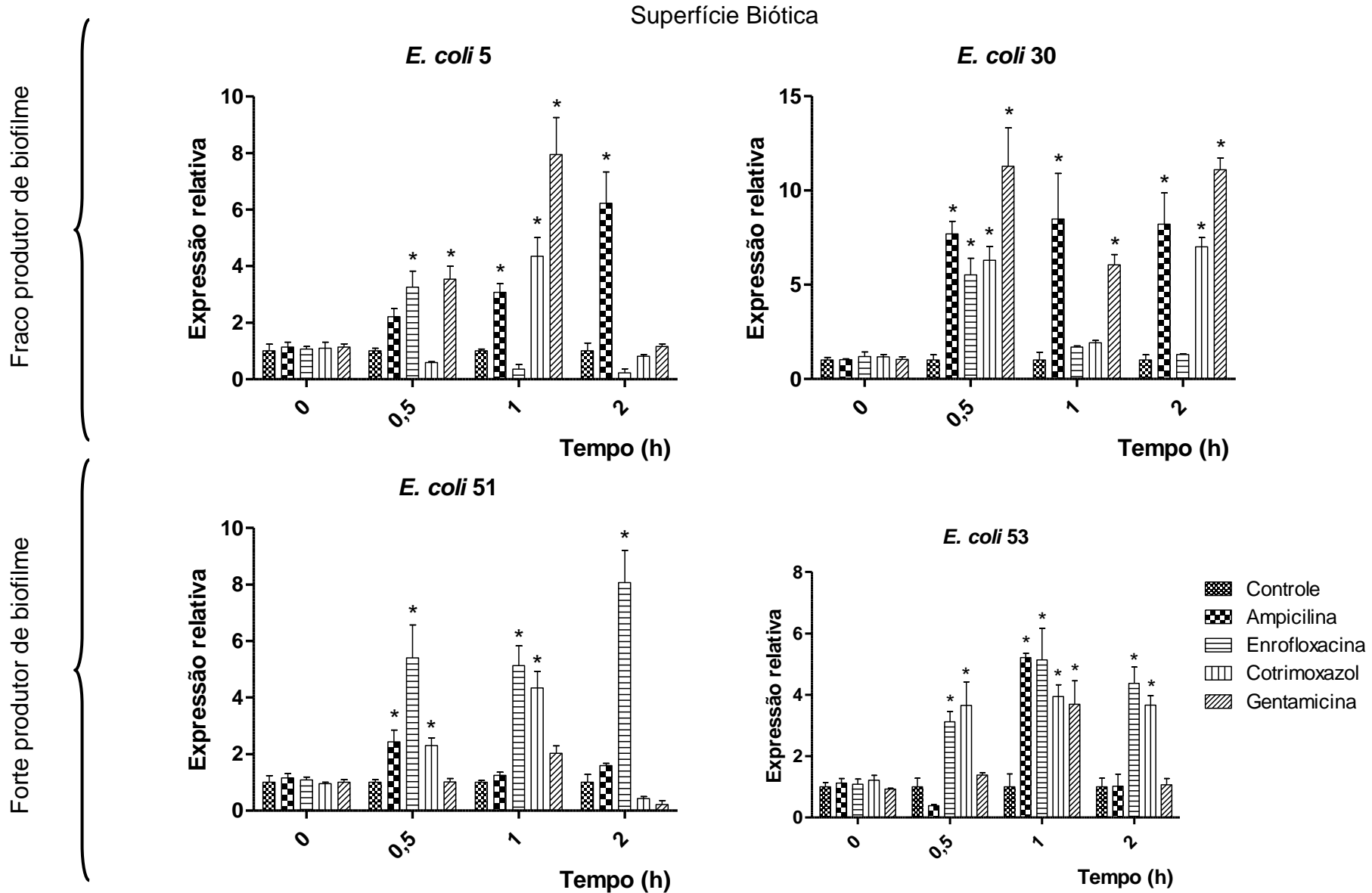


Figura 14. Perfis de expressões do gene *fimA* em isolados de *E. coli* produtores de biofilme submetidos à concentração de 1/2 MIC de antimicrobianos cultivados em superfície celular em diferentes tempos. * Significativo a $P < 0,05$.

A avaliação do perfil genético realizado através do PFGE revelou que as bactérias não compartilham da mesma origem. Não foi possível associar a capacidade de produção de biofilmes com a presença/ausência de genes relacionados e com os *pulsetypes* gerados, mostrando que as linhagens de *E. coli* causadoras de mastite ambiental apresentam diferentes patótipos.

Os resultados deste estudo mostraram que genes envolvidos na adesão (*csgA* e *fimA*), motilidade (*fliC*) e *quorum sensing* (*luxS*) foram significativamente mais expressos na presença de agentes antimicrobianos à concentração de ½ MIC durante o desenvolvimento de biofilme em *E. coli* obtidos de leite mastítico bovino. Não foi possível associar a expressão dos genes estudados com a indução ou redução da formação de biofilme ou com a adesão/invasão das células MAC-T, mostrando que outros fatores podem estar associados. Um deles poderia ter sido ausência do produto gênico final funcional, seja um mensageiro químico ou uma proteína, que necessite da expressão de diversos genes para a formação da estrutura funcional. Esse fato pode ser observado no gene *fliC* que apresentou aumento em sua expressão em um isolado FPB, no entanto não foi observada visualmente o flagelo (Figura 5A, 5B e 5C). O flagelo necessita de aproximadamente 49 genes e cerca de 2% do total de energia da célula para sintetizar e movimentar essas estruturas de forma funcional em *E. coli* (Macnab, 1996).

Além disso, observou-se que os genes *luxS* e *fimA* apresentaram comportamento diferente em relação as superfícies de cultivo utilizadas podendo ter sido causado tanto pela interação com as células MAC-T quanto por sinais ambientais como pH, disponibilidade de nutrientes, concentração de O₂ e concentração de CO₂, presentes no meio (Mekalanos, 1992).

Os dados obtidos do ensaio de indução de biofilme juntamente com o ensaio de adesão/invasão de células de *E. coli* ao cultivo celular mostrou que deve-se reforçar os cuidados na escolha do tratamento antimicrobiano correto para infecções intramamárias em bovinos, pois verificou-se que a concentração subinibitória de antimicrobianos é capaz de induzir a formação de biofilmes por alguns isolados, além de induzir a invasão às células hospedeiras. Esses fatos poderiam estar ocorrendo em animais *in vivo*, fornecendo mecanismos para evadir do sistema imune e da ação do antimicrobiano. Isso é preocupante, tendo em vista estes mecanismos de proteção podem propiciar o surgimento de

um reservatório dessa bactéria no úbere do animal, o que explicaria o crescente aumento de casos de mastites persistentes nos rebanhos.

6. CONCLUSÃO

- PFGE revelou que os isolados bacterianos apresentam diferentes perfis genéticos, não compartilhando a mesma origem;
- Os genes *luxS*, *csgA* e *fimA* estão presentes em todos isolados bacterianos estudados, enquanto o gene *fliC* está presente em apenas alguns isolados;
- Não foi possível associar o perfil genético com a capacidade de produção de biofilmes e com a presença/ausência de genes;
- Os antimicrobianos, ampicilina, enrofloxacina, gentamicina e cotrimoxazol, são capazes de induzir a formação de biofilme em isolados de *E. coli* obtidos de leite mastítico;
- Genes envolvidos na adesão (*csgA* e *fimA*), motilidade (*fliC*) e quorum sensing (*luxS*) foram significativamente mais expressos na presença agentes antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite à concentração de $\frac{1}{2}$ MIC;
- Não foi possível associar a expressão destes genes com a indução ou redução da formação de biofilme ou com a adesão/invasão das células MAC-T;
- Os gene *luxS* e *fimA* apresentaram comportamento diferente em relação as superfícies de cultivo;
- Os antimicrobianos testados não aumentam a capacidade de isolados *E. coli* obtidos de leite mastítico em aderir/invadir células MAC-T, no entanto são capazes de induzir a internalização em alguns isolados;
- Os gene *luxS*, *fliC*, *csgA* e *fimA* são diferencialmente expressos quando submetidos a concentração subinibitória de antimicrobianos;

- Fortes e fracos produtores de biofilme apresentam relevância clínica, pois aumentam a formação de biofilmes e internalização, respectivamente, na presença de antimicrobianos usados no tratamento da mastite por *E. coli*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MEHR, M.; AGHA ALAEI, Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 3, p. 196-200, 2006.
- AL-HASAN, M. N.; LAHR, B. D.; ECKEL-PASSOW, J. E.; BADDOUR, L. M. Antimicrobial resistance trends of *Escherichia coli* bloodstream isolates: a population-based study, 1998-2007. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 1, p. 169-74, Jul 2009.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, v. 20, n. 10, p. 913-917, 2009.
- ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Medicina Bovina: Doenças e Criação de Bovinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.
- ANTUNES, A. L. S.; BONFANTI, J. W.; PEREZ, L. R. R.; PINTO, C. C. F.; FREITAS, A. L. P. D.; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 51-55, 2011.
- BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, n. 6, p. 582-7, Dec 1999.
- BEAN, A.; WILLIAMSON, J.; CURSONS, R. T. Virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from mastitic milk. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 51, n. 6, p. 285-7, Aug 2004.
- BELOIN, C.; VALLE, J.; LATOUR-LAMBERT, P.; FAURE, P.; KZREMINSKI, M.; BALESTRINO, D.; HAAGENSEN, J. A.; MOLIN, S.; PRENSIER, G.; ARBEILLE, B.; GHIGO, J. M. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. **Mol Microbiol**, v. 51, n. 3, p. 659-74, Feb 2004.
- BOEHM, A.; STEINER, S.; ZAEHRINGER, F.; CASANOVA, A.; HAMBURGER, F.; RITZ, D.; KECK, W.; ACKERMANN, M.; SCHIRMER, T.; JENAL, U. Second messenger signalling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress. **Mol Microbiol**, v. 72, n. 6, p. 1500-16, Jun 2009.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet J**, v. 164, n. 2, p. 116-28, Sep 2002.
- BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 5, p. 1845-9, May 2001.
- _____. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 5, p. 1941-53, May 2009.
- BURVENICH, C.; BANNERMAN, D. D.; LIPPOLIS, J. D.; PEELMAN, L.; NONNECKE, B. J.; KEHRLI, M. E., JR.; PAAPE, M. J. Cumulative physiological

events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. **J Dairy Sci**, v. 90 Suppl 1, p. E39-54, Jun 2007.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Vet Res**, v. 34, n. 5, p. 521-64, Sep-Oct 2003.

CALVINHO, L. F.; OLIVER, S. P. Invasion and persistence of *Streptococcus dysgalactiae* within bovine mammary epithelial cells. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 3, p. 678-86, Mar 1998.

CHANG, N.; CHUI, L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 1, p. 275-9, May 1998.

CHEN, C.; LIAO, X.; JIANG, H.; ZHU, H.; YUE, L.; LI, S.; FANG, B.; LIU, Y. Characteristics of *Escherichia coli* biofilm production, genetic typing, drug resistance pattern and gene expression under aminoglycoside pressures. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 30, n. 1, p. 5-10, Jul 2010.

CONNELL, I.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 18, p. 9827-32, Sep 3 1996.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1999.

COSTA, J. C.; ESPESCHIT IDE, F.; PIERI, F. A.; BENJAMIN LDOS, A.; MOREIRA, M. A. Increased production of biofilms by *Escherichia coli* in the presence of enrofloxacin. **Vet Microbiol**, v. 160, n. 3-4, p. 488-90, Dec 7 2012.

COSTA, J. C. M. **Influência de antimicrobianos, concentrações de glicose e variações de pH na produção de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico**. Viçosa/MG: 2011. 67 p. (Mestre) - Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 21 1999.

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

DE KIEVIT, T. R.; IGLEWSKI, B. H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infect Immun**, v. 68, n. 9, p. 4839-49, Sep 2000.

DELICATO, E. R.; DE BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Vet Microbiol**, v. 94, n. 2, p. 97-103, Jul 1 2003.

DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P.; SIMPSON, K.; SCHUKKEN, Y. H. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Vet Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 270-82, Sep 10 2006.

DOMKA, J.; LEE, J.; BANSAL, T.; WOOD, T. K. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. **Environ Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 332-46, Feb 2007.

DONG, L.; TONG, Z.; LINGHU, D.; LIN, Y.; TAO, R.; LIU, J.; TIAN, Y.; NI, L. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 5, p. 390-5, May 2012.

DOPFER, D.; ALMEIDA, R. A.; LAM, T. J.; NEDERBRAGT, H.; OLIVER, S. P.; GAASTRA, W. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. **Vet Microbiol**, v. 74, n. 4, p. 331-43, Jun 12 2000.

DOPFER, D.; BARKEMA, H. W.; LAM, T. J.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 1, p. 80-5, Jan 1999.

DYER, J. G.; SRIRANGANATHAN, N.; NICKERSON, S. C.; ELVINGER, F. Curli production and genetic relationships among *Escherichia coli* from cases of bovine mastitis. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 1, p. 193-201, Jan 2007.

FALKOW, S. Bacterial entry into eukaryotic cells. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1099-102, Jun 28 1991.

_____. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. **J Clin Invest**, v. 100, n. 2, p. 239-43, Jul 15 1997.

FERNANDES, J. B.; ZANARDO, L. G.; GALVAO, N. N.; CARVALHO, I. A.; NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **J Vet Diagn Invest**, v. 23, n. 6, p. 1146-52, Nov 2011.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 2, p. 136-69, Jun 1997.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". **J Bacteriol**, v. 189, n. 22, p. 7945-7, Nov 2007.

FLINT, J.; PALMER, P.; BREMER, B.; SEALE, J.; BROOKS, D.; LINDSAY, S. B. Biofilm Formation. In: FUQUAY, J. W. (Ed.). **Encyclopedia of dairy sciences**. Boston, MA: Elsevier, 2011.

FROST, A. J. Selective adhesion of microorganisms to the ductular epithelium of the bovine mammary gland. **Infect Immun**, v. 12, n. 5, p. 1154-6, Nov 1975.

FUQUAY, J. W. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Boston, MA: Elsevier, 2011.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 11, p. 2977-80, Nov 1997.

GONZALEZ BARRIOS, A. F.; ZUO, R.; HASHIMOTO, Y.; YANG, L.; BENTLEY, W. E.; WOOD, T. K. Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). **J Bacteriol**, v. 188, n. 1, p. 305-16, Jan 2006.

GOPHNA, U.; OELSCHLAEGGER, T. A.; HACKER, J.; RON, E. Z. Role of fibronectin in curli-mediated internalization. **FEMS Microbiol Lett**, v. 212, n. 1, p. 55-8, Jun 18 2002.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow--a tradition or an archaism. **J Appl Microbiol**, v. 98, n. 6, p. 1250-5, 2005.

HOFFMAN, L. R.; D'ARGENIO, D. A.; MACCOSS, M. J.; ZHANG, Z.; JONES, R. A.; MILLER, S. I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1171-5, Aug 25 2005.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. Economic aspects of mastitis: new developments. **N Z Vet J**, v. 59, n. 1, p. 16-23, Jan 2011.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 4, p. 322-32, Apr 2010.

HUIJPS, K.; HOGEVEEN, H.; LAM, T. J.; HUIRNE, R. B. Preferences of cost factors for mastitis management among Dutch dairy farmers using adaptive conjoint analysis. **Prev Vet Med**, v. 92, n. 4, p. 351-9, Dec 1 2009.

HUYNH, H. T.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): an in vitro model for bovine lactation. **Exp Cell Res**, v. 197, n. 2, p. 191-9, Dec 1991.

JIANG, Y.; CAMARA, M.; CHHABRA, S. R.; HARDIE, K. R.; BYCROFT, B. W.; LAZDUNSKI, A.; SALMOND, G. P.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. In vitro biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-butanoyl-L-homoserine lactone. **Mol Microbiol**, v. 28, n. 1, p. 193-203, Apr 1998.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Vet Microbiol**, v. 85, n. 1, p. 37-46, Feb 26 2002.

KANATANI, J. I.; ISOBE, J.; KIMATA, K.; SHIMA, T.; SHIMIZU, M.; KURA, F.; SATA, T.; WATAHIKI, M. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama Prefecture, Japan. **J Infect Chemother**, Dec 27 2012.

KAPLAN, J. B.; JABBOURI, S.; SADOVSKAYA, I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. **Res Microbiol**, v. 162, n. 5, p. 535-41, Jun 2011.

LAMMERS, A.; NUIJTEN, P. J.; KRUIJT, E.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; VECHT, U.; SMITH, H. E.; VAN ZIJDERVELD, F. G. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. **Vet Microbiol**, v. 67, n. 2, p. 77-89, Jun 15 1999.

LANDINI, P. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. **Res Microbiol**, v. 160, n. 4, p. 259-66, May 2009.

LEBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 4, p. 1267-79, Apr 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

MACNAB, R. M. Flagella and motility. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella*. v. 1. Washington, DC: **American Society for Microbiology Press**, 1996. p. 123-145.

MATTHEWS, K. R.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Bovine mammary epithelial cell invasion by *Streptococcus uberis*. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5641-6, Dec 1994.

MAURER, J. J.; BROWN, T. P.; STEFFENS, W. L.; THAYER, S. G. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 106-118, Jan-Mar 1998.

MEKALANOS, J. J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. **J Bacteriol**, v. 174, n. 1, p. 1-7, Jan 1992.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? **Vet J**, v. 171, n. 3, p. 398-407, May 2006.

MEZZATESTA, M. L.; D'ANDREA, M. M.; MIGLIAVACCA, R.; GIANI, T.; GONA, F.; NUCLEO, E.; FUGAZZA, G.; PAGANI, L.; ROSSOLINI, G. M.; STEFANI, S. Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 2, p. 160-6, Feb 2012.

MORE, M. I.; FINGER, L. D.; STRYKER, J. L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A.; WINANS, S. C. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1655-8, Jun 14 1996.

MOREIRA, M. A.; OLIVEIRA, J. A.; TEIXEIRA, L. M.; MORAES, C. A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Vet Microbiol**, v. 109, n. 1-2, p. 75-81, Aug 10 2005.

MOREIRA, M. A. S.; RODRIGUES, P. P. C. F.; TOMAZ, R. S.; DE MORAES, C. A. Multidrug Efflux Systems in *Escherichia Coli* and *Enterobacter Cloacae* Obtained from Wholesome Broiler Carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 241-247, Apr-Jun 2009.

NAGANO, N.; NAGANO, Y.; TOYAMA, M.; KIMURA, K.; TAMURA, T.; SHIBAYAMA, K.; ARAKAWA, Y. Nosocomial spread of multidrug-resistant group B streptococci with reduced penicillin susceptibility belonging to clonal complex 1. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 4, p. 849-56, Apr 2012.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 17, p. 108-113, 2007.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

ODENHOLT, I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. **Int J Antimicrob Agents**, v. 17, n. 1, p. 1-8, Jan 2001.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Vet Microbiol**, v. 124, n. 1-2, p. 187-91, Sep 20 2007.

OLIVER, S. P.; PIGHETTI, G. M.; ALMEIDA, R. A. Mastitis Pathogens **Environmental Pathogens**. Knoxville: Academic Press, 2011. p. 4170.

OLSEN, A.; JONSSON, A.; NORMARK, S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. **Nature**, v. 338, n. 6217, p. 652-5, Apr 20 1989.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; BIRCH-ANDERSEN, A.; KLEMM, P.; SVANBORG-EDEN, C. Seminars in Infectious Disease. New York: Thieme-Stratton Inc., 1982. p. 97-103.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol**, v. 30, n. 2, p. 285-93, Oct 1998.

PRIGENT-COMBARET, C.; PRENSIER, G.; LE THI, T. T.; VIDAL, O.; LEJEUNE, P.; DOREL, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. **Environ Microbiol**, v. 2, n. 4, p. 450-64, Aug 2000.

PRUSS, B. M.; BESEMANN, C.; DENTON, A.; WOLFE, A. J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 188, n. 11, p. 3731-9, Jun 2006.

RAMARAO, N.; GRAY-OWEN, S. D.; BACKERT, S.; MEYER, T. F. Helicobacter pylori inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. **Molecular Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1389-1404, Sep 2000.

REN, D.; BEDZYK, L. A.; THOMAS, S. M.; YE, R. W.; WOOD, T. K. Gene expression in Escherichia coli biofilms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, n. 4, p. 515-24, May 2004.

ROE, A. J.; CURRIE, C.; SMITH, D. G.; GALLY, D. L. Analysis of type 1 fimbriae expression in verotoxigenic Escherichia coli: a comparison between serotypes O157 and O26. **Microbiology**, v. 147, n. Pt 1, p. 145-52, Jan 2001.

ROTARIU, O.; SMITH-PALMER, A.; COWDEN, J.; BESSELL, P. R.; INNOCENT, G. T.; REID, S. W.; MATTHEWS, L.; DALLAS, J.; OGDEN, I. D.; FORBES, K. J.; STRACHAN, N. J. Putative household outbreaks of campylobacteriosis typically comprise single MLST genotypes. **Epidemiol Infect**, v. 138, n. 12, p. 1744-7, Dec 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007.

SANTOS, S. S. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite**. Jaboticabal: 2009. p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **J Bacteriol**, v. 184, n. 4, p. 1140-54, Feb 2002.

SCHAUDER, S.; SHOKAT, K.; SURETTE, M. G.; BASSLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Mol Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 463-76, Jul 2001.

SCHEMBRI, M. A.; KJAERGAARD, K.; KLEMM, P. Global gene expression in Escherichia coli biofilms. **Mol Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 253-67, Apr 2003.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 6, p. 431-437, 2001.

SEPANDJ, F.; CERI, H.; GIBB, A. P.; READ, R. R.; OLSON, M. Biofilm infections in peritoneal dialysis-related peritonitis: comparison of standard MIC and MBEC in evaluation of antibiotic sensitivity of coagulase-negative staphylococci. **Perit Dial Int**, v. 23, n. 1, p. 77-9, Jan-Feb 2003.

SHAFABI, M.; VAFAI, K. Synthesis of biofilm resistance characteristics against antibiotics. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 53, n. 15-16, p. 2943-2950, 2010.

SHARMA, V. K.; BEARSON, S. M.; BEARSON, B. L. Evaluation of the effects of sdiA, a luxR homologue, on adherence and motility of Escherichia coli O157 : H7. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 5, p. 1303-12, May 2010.

SJOBRING, U.; POHL, G.; OLSEN, A. Plasminogen, absorbed by Escherichia coli expressing curli or by Salmonella enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). **Mol Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 443-52, Nov 1994.

SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 8, p. 966-73, Aug 2008.

SOTO, S. M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, J. A.; HORCAJADA, J. P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **J Urol**, v. 177, n. 1, p. 365-8, Jan 2007.

SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; NGUYEN, L. T.; HEADRICK, S. I.; SCHUKKEN, Y. H.; OLIVER, S. P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Vet Microbiol**, v. 124, n. 3-4, p. 319-28, Oct 6 2007.

STEENEVELD, W.; VAN WERVEN, T.; BARKEMA, H. W.; HOGEVEEN, H. Cow-specific treatment of clinical mastitis: an economic approach. **J Dairy Sci**, v. 94, n. 1, p. 174-88, Jan 2011.

STEINBERGER, R. E.; HOLDEN, P. A. Macromolecular composition of unsaturated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source. **Biofilms**, v. 1, n. 01, p. 37-47, 2004.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-9, Apr 2000.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 4, p. 1639-44, Feb 16 1999.

VAN HOUTDT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Res Microbiol**, v. 156, n. 5-6, p. 626-33, Jun-Jul 2005.



VIDAL, O.; LONGIN, R.; PRIGENT-COMBARET, C.; DOREL, C.; HOOREMAN, M.; LEJEUNE, P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. **J Bacteriol**, v. 180, n. 9, p. 2442-9, May 1998.

8. APÉNDICE

Apendice A

11/04/13


Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producers isolates obtained from mastitic milk - Canadian Journal of Microbiology

OpenArticle
You've got options

[Login](#) [Register](#) [Shibboleth](#) [Mobile](#) [Cart](#)


[Advanced Search](#)
 [All Journals](#)



Canadian Journal of Microbiology

Home Journals Books Authors Librarians Societies About Us Contact Help
Français

Home > Journals > Canadian Journal of Microbiology > List of Issues > Volume 0, Number 1a, > Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producers isolates obt...



Browse the Journal

- List of issues
- e-First articles
- Current issue
- Most read articles
- Most cited articles
- Sample issue
- Special issues
- Author index
- Subscriptions
- Pricing
- Subscribe
- Recommend to librarians
- For authors
- Benefits and services
- Instructions to authors
- Submit a paper
- Permission forms
- Reprints & permissions
- Alerts & RSS
- e-Alerts

Learn more about the
ADVANTAGES
of publishing in an
NRC Research Press
journal

Get the latest
NEWS
from
NRC Research Press
journals

Article TOC Next»

Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producers isolates obtained from mastitic milk

Vitor Oliveira Silva, Isis de Freitas Espeschit, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Published on the web 01 April 2013.

Canadian Journal of Microbiology, 10.1139/cjm-2013-0053

[PDF \(214 K\)](#)

[PDF-Plus \(195 K\)](#)

[Also read](#)

ABSTRACT in this paper ▾

Escherichia coli is capable of producing several virulence factors involved in the pathophysiology of bovine mastitis. Cell surface structures such as flagella, pili and other outer membrane adhesins are considered essential for biofilm formation on abiotic surfaces. The aim of this study was characterize the molecular profile of *E. coli* isolates obtained from mastitic milk using the technique of PFGE and evaluating results within the pulsotypes formed with the presence of virulence genes involved in biofilm production. Twenty-seven *E. coli* biofilm producing isolates were obtained from mastitic milk samples belonging to Brazilian Agricultural Research Corporation; these were analyzed by PFGE. We identified nine (1 to IX) different phylogenetic groups with similarity of 90% and the presence of fimA (large subunit of the fimbriae type 1) and csgA gene (large subunit of curli fimbriae) were observed in all isolates. Sixteen isolates had the gene flhC (flagellin). Evaluation of the genetic profile carried out through the PFGE showed that the bacteria do not share the same origin. It was not possible to associate the biofilm production capacity with the presence/absence of related genes. Therefore, strains of environmental mastitis-causing *E. coli* present different pathotypes.

Article Tools

[SHARE](#) [f](#) [t](#) [e](#) [...](#)

[Add to Favorites](#)

[Download Citation](#)

[Email a Colleague](#)

[Reprints & Permissions](#)

[Citation Alerts](#)

Article History

Received January 21, 2013

Information for
Advertisers

Looking for a career in Science?
Visit STM Careers

Environmental Reviews

Quarterly
for
2013

CSP Publishing Services

Your trusted partner
in publishing

www.CSPpublishingservices.com