

**JOÃO CARLOS MIGUEL COSTA**

**INFLUÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS, CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E  
VARIAÇÕES DE pH NA PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR ISOLADOS DE  
*Escherichia coli* OBTIDOS DE MASTITE BOVINA.**

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  
2011**

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

T

C837i  
2011

Costa, João Carlos Miguel, 1984-

Influência de antimicrobianos, concentrações de glicose e variações de ph na produção de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* obtidos de mastite bovina / João Carlos Miguel Costa. – Viçosa, MG, 2011.  
xiii, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 43-53.

1. Mastite. 2. Biofilmes. 3. Drogas - Resistência em microorganismos. 4. Bovino - Doenças. 5. Bactérias patogênicas. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2089692

**JOÃO CARLOS MIGUEL COSTA**

**INFLUÊNCIA DE ANTIMICROBIANOS, CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE E  
VARIAÇÕES DE pH NA PRODUÇÃO DE BIOFILMES POR ISOLADOS DE  
*Escherichia coli* OBTIDOS DE MASTITE BOVINA.**

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: 29 de junho de 2011.

---

Prof. Luís Augusto Nero  
(co-orientador)

---

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

---

Prof. Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
(orientadora)  
Presidente da Banca

***A Deus.***

***A meus pais, Maria Celeste e Carlos (in memoriam).***

***A minha noiva, Flávia.***

***A todos que acreditaram e tornaram real esta conquista...***

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Carlos Costa (*in memoriam*) e Maria Celeste Miguel Costa; e irmã, Mariana, pelos esforços imensuráveis despendidos para minha formação e por me estimularem sempre; vocês foram, são e sempre serão imprescindíveis para minha vida!

À minha noiva, Flávia Monteiro, por ser minha fonte de inspiração, amor, vida... Pelo futuro que nos aguarda.

À minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, que me iniciou na microbiologia com a qual trabalhei durante toda a graduação e pós-graduação e que muito contribuiu na minha formação humana e profissional.

A Isabel, Cristian (agregado), Vitor, Carol, Maria Alejandra, Pricila e David, amigos e colegas de LDBAC, pelo companheirismo e amizade dispensados.

Ao Fábio, pela imensa ajuda na finalização do mestrado e pela companhia nas tardes no DVT quando, ao sabor do inigualável café da Margô, tentávamos entender a complexidade existente entre amendoins e caveiras. Um dia ainda vamos entender...

A minha estagiária Isis, companheira das horas intermináveis de CMI.

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

A toda a minha família, em especial aos meus avós maternos João Miguel Filho e Hilda Calegaro pelo incentivo e carinho.

Ao Rogerinho do Xerox por vender fiado as inúmeras cópias de artigos, partes de livro e inclusive esta dissertação.

À Rosi, pelo apoio burocrático durante todo o curso de mestrado.

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

À querida cidade de Viçosa – MG, por ter sido meu lar durante 7 anos.

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

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamin pelo auxílio na realização da microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes e ao Laboratório de Microscopia e Microanálises da UFV pelo espaço e equipamentos cedidos.

A todos os que contribuíram com seus conhecimentos e experiências para esta conquista.

Muito Obrigado!

## **BIOGRAFIA**

João Carlos Miguel Costa, filho de Carlos Costa (in memorian) e Maria Celeste Miguel Costa, nasceu em 01 de maio de 1984, na cidade de Manhuaçu, estado de Minas Gerais.

Em março de 2004, iniciou seus estudos acadêmicos na Universidade Federal de Viçosa, MG, no curso de Medicina Veterinária. Em julho de 2008, pela mesma instituição, graduou-se Médico Veterinário.

Em agosto de 2009, 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 junho de 2011 submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação. Recentemente foi aprovado em concurso público para o cargo de Analista em Desenvolvimento Agropecuário do Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do estado do Espírito Santo - IDAF onde atuará nas frentes de defesa sanitária animal do estado.

## SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.2 Biofilmes .....	4
2.3 Mastite .....	8
3. OBJETIVOS .....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1 Isolados, meios de cultura e condições para estocagem.....	16
4.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC) .....	17
4.3 Condições nutricionais e ambientais envolvidas na produção de biofilmes .....	18
4.4 Perfil de resistência das células sésseis aos antimicrobianos .....	19
4.5 Antimicrobianos indutores de biofilmes.....	20
4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	21
4.7 Análise estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Determinação da concentração Mínima Inibitória (CMI).....	22
5.2 Concentrações de glicose e variações de pH envolvidos com a produção de biofilmes. ....	25
5.3 Resistência dos biofilmes aos antimicrobianos.....	28
5.4 Antimicrobianos indutores de biofilmes.....	33
5.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
6. CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação quanto à produção de biofilmes dos 27 isolados de <i>Escherichia coli</i> utilizados no experimento.....	17
Quadro 2. Concentrações de glicose e valores de pH dos meios mínimos utilizados no experimento.....	19

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desenvolvimento de biofilmes .....	7
Figura 2. Efeito das diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cotrimoxazol (Sut) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> , em caldo BHI.....	24
Figura 3. Efeito das diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) de ampicilina (Amp) sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> , em caldo BHI.....	24
Figura 4. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O550nm) pelos isolados nos 16 meios mínimos avaliados. ....	26
Figura 5. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas de gentamicina, comparadas com o controle(C).....	35
Figura 6. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas de enrofloxacina, comparadas com o controle(C).....	35
Figura 7. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas de cotrimoxazol, comparadas com o controle(C).....	36
Figura 8. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas de ceftiofur, comparadas com o controle(C).....	36

Figura 9. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) usadas de cefalexina, comparadas com o controle(C).....	37
Figura 10. Produção de biofilmes (médias da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações *( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) usadas de ampicilina, comparadas com o controle(C).....	37
Figura 11. Células aderidas (isolado 7, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI. Magnitude 1300X.....	39
Figura 12. Células aderidas (isolado 25, grande produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI. Magnitude: 1200X.....	39
Figura 13. Células aderidas (isolado 4, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em meio mínimo D2 (pH 6,5 e 3,5% de glicose). Magnitude: 1200X. ....	39
Figura 14. Células aderidas (isolado 12, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefalexina. Magnitude: 2300X.....	39
Figura 15. Produção de biofilmes por isolado 1, grande produtor de biofilmes após 24 horas de incubação em meio mínimo B1 (pH 5,5 e 0,5% de glicose) Magnitude: 1800X .....	40
Figura 16. Produção de biofilmes por isolado16, grande produtor de biofilmes após 24 horas de incubação em caldo BHI com 0,0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de enrofloxacina Magnitude: 2300X .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição (porcentagem) das CMI e perfil de resistência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> (n=27) provenientes de mastite clínica.....	25
Tabela 2. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de ampicilina para	

isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica .....	29
Tabela 3. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de ceftiofur para isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica .....	30
Tabela 4. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de ceftiofur para isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica .....	30
Tabela 5. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de cotrimoxazol para isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica.....	30
Tabela 6. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de enrofloxacin para isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica.....	31
Tabela 7. Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de gentamicina para isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica.....	31
Tabela 8. Taxa de recuperação celular média de células sésseis de sete isolados produtores de biofilmes de <i>Escherichia coli</i> provenientes de mastite clínica desagregadas das esferas de vidro submetidas às respectivas concentrações mínimas de erradicação de biofilmes – CMEB em cada antimicrobiano testado .....	32

## RESUMO

COSTA, João Carlos Miguel, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Influência de antimicrobianos, concentrações de glicose e variações de pH na produção de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* obtidos de mastite bovina.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Orientador: Luis Augusto Nero

*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 da mastite com antimicrobianos. Estudou-se 27 isolados de *E. coli* produtores de biofilmes obtidos de leite mastítico. Os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade a antimicrobianos usados no tratamento da mastite, tanto para as células planctônicas, por meio da avaliação da concentração mínima inibitória – CMI quanto para as sésseis, pela avaliação da concentração mínima de erradicação de biofilmes - CMEB. Todos os isolados foram cultivados em meios mínimos contendo diferentes valores de pH e concentrações de glicose visando investigar a influência desses fatores na produção de biofilmes. De mesmo modo submeteu-se os isolados às CMI para verificar a possível indução dessas concentrações na produção dos biofilmes. Foram escolhidos quatro isolados, grandes e fracos produtores de biofilmes, para serem analisados por microscopia eletrônica de varredura – MEV. Os resultados obtidos revelaram uma alta taxa de sensibilidade, confirmada pela avaliação da CMI, na qual apenas quatro (14,8%) isolados obtiveram valores da CMI elevados, variando de 4 a 10 µg/mL, sendo classificados como resistentes. Entretanto, para os demais isolados (85,2%) os valores foram menores, variando de 0,125 a 2 µg/mL, classificados como sensíveis. A avaliação de CMEB indicou que a concentração dos antimicrobianos necessária para eliminar as células sésseis variou de 100 µg/mL a 500 µg/mL. Gentamicina e enrofloxacin foram indutores da produção de biofilmes, respectivamente nas concentrações de 0,0312 e 0,0125 µg/mL. Os valores de CMEB foram significativamente maiores nos isolados grandes e moderados produtores de biofilmes em relação aos isolados fraco produtores biofilmes ( $p < 0,001$ ). Não houve correlação entre os valores de CMEB e CMI ( $p > 0,05$ ). A produção de biofilmes foi maior ( $p <$

0,001) nos meios mínimos com pouca disponibilidade de glicose (0,5%) e valores de pH mais distantes da neutralidade (pH 5,5 e 8,5) em relação aos meios mínimos ricos em glicose (2,5% e 3,5%) e com valores de pH próximos da neutralidade (pH 6,5 e 7,5). A presença dos biofilmes foi confirmada nos isolados submetidos à MEV por meio da visualização de células aderidas e da presença de matriz extracelular, caracterizando a arquitetura dos biofilmes. O conhecimento das condições da produção de biofilmes em isolados de *E. coli* causadores de mastite é uma importante ferramenta para se estabelecer estratégias de controle e tratamentos mais eficientes.

## ABSTRACT

COSTA, João Carlos Miguel, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Influence of antimicrobials, glucose concentrations and pH variations in biofilm production by isolates of Escherichia Coli isolated from bovine mastitis.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Adviser: Luis Augusto Nero.

*Escherichia coli* is a microorganism of environmental origin highly adaptive and its ability to form biofilms under certain conditions may be critical for their resistance to antimicrobial treatments, which makes *E. coli* an important causative agent of mastitis. We studied 27 isolates of *E. coli* producing biofilms obtained from clinical mastitis belong to the collection of the Federal University of Viçosa. The isolates were tested for sensitivity to antibiotics used to treat mastitis, both for planktonic cells, by assessing the minimal inhibitory concentration - MIC as for the sessile, assessing the minimal biofilm eradication concentration - MBEC. In addition, all isolates were grown in minimal media containing different pH values and glucose concentrations and to assess the influence of these factors in producing biofilms. Similarly underwent the isolates at concentrations of antimicrobial sub-inhibitory to verify the possible induction of these doses on the formation of biofilms. Four isolates were chosen, large and weak biofilm producers, to be analyzed by scanning electron microscopy - SEM. The results revealed a high rate of sensitivity, confirmed by the evaluation of MIC, in which only four (14.8%) isolates had high MIC values ranging from 4 to 10 µg / mL and were classified as resistant. However, for the remaining isolates (85.2%) were lower, ranging from 0.125 to 2 µg/mL classified as sensitive. The evaluation of MBEC indicated that the concentration of antibiotic required to eliminate the sessile cells ranged from the 100 µg/mL 500 µg/mL. Gentamicin and enrofloxacin were possible inducers of biofilm formation, respectively, at 0.0312 and 0.0125 µg / mL. MBEC values were significantly higher in isolated large and moderate-producing biofilms in relation to isolated weak biofilm producers ( $p < 0.001$ ). There was no correlation between the values of MCEC and MIC ( $p > 0.05$ ). The biofilm production was higher ( $p < 0.001$ ) in minimal media with limited glucose (0.5%) and pH values further away from neutrality (pH 5.5 and pH 8, 5) in relation to the minimum means-rich

glucose (2,5% and 3.5%) and pH close to neutrality (pH 6.5 and 7,5). The presence of biofilms was confirmed in isolates submitted to the SEM, through visualization of adhered cells and the presence of exopolysaccharides, characterizing the typical architecture of biofilms. The knowledge of the characteristics of biofilm production in isolates of *E. coli* causing mastitis is an important tool for establishing more efficient treatment strategies.

## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* é um importante agente etiológico causador de infecções intramamárias em ruminantes e estão associados, principalmente, à mastite clínica no rebanho leiteiro. Estimam-se perdas da ordem de bilhões de litros de leite por ano decorrentes da mastite na bovinocultura (HUIJPS et al., 2009). 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, desde as últimas décadas, a terapia com antimicrobianos não vem obtendo resultados satisfatórios no controle da mastite. Esse fato é evidenciado pelo aumento de isolados resistentes aos antimicrobianos e pelo crescente número de casos de mastites recorrentes e persistentes, muitas vezes causados pelo mesmo isolado bacteriano (LIPMAN et al., 2004; MELCHIOR et al., 2006; HØIBY et al.; 2010). Uma das hipóteses para explicar o aparecimento de infecções recidivantes é a habilidade dos micro-organismos formarem biofilmes na superfície do tecido da glândula mamária infectada, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos.

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 (COSTERTON et al., 1999; MELCHIOR et al., 2006). Sendo a administração de antimicrobianos a metodologia mais empregada no tratamento da mastite, a presença dos biofilmes pode constituir um grande obstáculo ao tratamento e controle da enfermidade nos rebanhos.

Estudos recentes demonstraram que, além de não terem ação efetiva, os antimicrobianos podem inclusive, em doses subnibitórias, estimular a

produção de biofilmes (HOFFMAN et al., 2005; CHEN et al., 2010). No Brasil, apesar do crescente número de trabalhos relacionados com micro-organismos produtores de biofilmes na área médica humana e industrial, ainda são poucos os estudos na medicina veterinária. Devido a escassez de estudos, a importância do estado de Minas Gerais como maior produtor de leite do país e a relevância que *E. coli* possui nos aspectos econômicos, sociais e de saúde pública, foi realizado este trabalho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* Gram-negativa, anaeróbia facultativa e com capacidade de fermentar lactose. Baseada na diferença antigênica das estruturas do antígeno-O, antígeno-K (capsular) e antígeno-H (flagelar), os isolados podem ser divididos em sorotipos ou sorovares O:H:K (LEHTOLAINEN et al 2004). Mais de 700 tipos antigênicos ou cepas são conhecidos baseados nos antígenos das cadeias O, H e K (BURVENICH et al., 2003). Apesar de seu papel como comensal, algumas cepas de *E. coli* são capazes de causar grande variedade de doenças, devido à sua habilidade em adquirir genes de virulência por transferência horizontal (KAPER et al., 2008). Dentre estas doenças, a mastite é uma das mais importantes para a bovinocultura leiteira em todo o mundo.

Os isolados obtidos dos animais com mastite são bastante similares àquelas encontradas nas fezes (BURVENICH *et al.*, 2003; BETTELHEIM et al, 2005). Há uma grande variedade de sorotipos, no entanto, as regiões centrais da parede celular e o lipídeo A do LPS são comuns a todos os sorotipos e da família *Enterobacteriaceae* em geral (BURVENICH et al., 2003). *E. coli* produz vários fatores de virulência envolvidos na fisiopatologia da mastite bovina, os quais são necessários para colonizar e infectar a glândula mamária, além de proteger o micro-organismo contra os mecanismos de defesa do animal (BURVENICH et al., 2008; NAVES et al.; 2008). Estes fatores incluem toxinas, adesinas, proteínas secretadas nas células do animal, cápsula de polissacarídeo e antígeno-O (DYER et al., 2007). Além disso, cita-se a capacidade de produção de biofilmes, um importante mecanismo de proteção e resistência a antimicrobianos. (MELCHIOR et al, 2006; HØIBY et al.; 2010). Sob determinadas condições, *E. coli*, assim como outros micro-organismos aderem e interagem com superfícies vivas ou inertes, iniciando a reprodução celular (BURVENICH et al., 2008). 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 (FLINT et al, 2011).

## 2.2 Biofilmes

Os biofilmes representam provavelmente os mais importantes mecanismos de colonização e fixação pelos micro-organismos na natureza (CONSTERTON et al., 1999; FLINT et al., 2011). 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; FLINT et al., 2011). O metabolismo, os fatores envolvidos na modulação, os genes responsáveis pelo estabelecimento, bem como o mecanismo responsável pela comunicação (*quorum sensing*) entre indivíduos organizados nos biofilmes têm sido, frequentemente o alvo destes estudos (DYER et al., 2007; FLINT et al., 2011). A produção de biofilmes está relacionada a inúmeros genes que, em resposta a estímulos externos, codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento e estabelecimento dos biofilmes (BROMBACHER et al., 2003; DYER et al., 2007; LANDINI et al., 2009).

Biofilme é uma comunidade estruturada de micro-organismos organizados dentro de um complexo de estruturas e aderidos a uma superfície viva ou inerte (CONSTERTON 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). Acredita-se que Antonie Van Leeuwenhoek, no século 17, foi o primeiro pesquisador a identificar os biofilmes, usando um microscópio simples observou seres vivos microscópicos, intimamente associados, encontrados na cavidade oral, os quais Leeuwenhoek denominou de “animalculi” (CONSTERTON et al., 1999).

O biofilme forma-se quando é iniciada a produção de uma matriz de polímeros orgânicos, denominados exopolissacarídeos (EPS), que aderem às células bacterianas (FLINT et al., 2011). Os EPS possuem variada composição química, e não somente provê a estrutura orgânica do biofilme, como também facilita o arranjo espacial das diferentes espécies que o compõem. Os principais componentes da EPS são os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas e fosfolipídios (LENNOX et al., 2009). Além destes compostos, ainda podem estar associados aos EPS, componentes do ambiente, como por exemplo, detritos, compostos inorgânicos e até mesmo

outros seres vivos, podendo ser visualizados por microscopia eletrônica de varredura – MEV . (PRIESTER et al, 2007).

A produção de EPS pelos micro-organismos nos biofilmes possui inúmeras funções, como facilitar a adesão inicial da bactéria na superfície; a formação e manutenção de microcolônias e da estrutura do biofilme; o aumento da resistência do biofilme a ambientes hostis e a agentes antimicrobianos. Além da retenção de enzimas e outros compostos extracelulares (MARCHI et al., 2008). As fibras poliméricas formam uma ponte entre a célula bacteriana e o substrato, o que habilita a associação irreversível com a superfície, sendo os polissacarídeos extracelulares do biofilme críticos para a persistência e sobrevivência em ambientes hostis, onde agem retendo nutrientes para o crescimento da comunidade microbiana. (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ e PASCUAL, 2008). A água é o principal componente dos biofilmes, as inúmeras fibras dos EPS contém cerca de 98% a 99% de água, protegendo as células bacterianas da desidratação, uma vez que podem reter água em quantidades muito maiores que sua massa e possuem a capacidade de se desidratarem lentamente (NEU et al, 2010).

Outra importante estrutura dos biofilmes são os canais abertos de água, compostos de canais verticais e horizontais que entremeiam a matriz exopolissacarídica permitindo o fluxo de líquidos que irão garantir o suprimento de nutrientes para as células bacterianas e eliminação de resíduos gerados como parte dessa atividade celular. Além disso, estes canais permitem a aquisição e troca de genes por transferência horizontal. (RIJAVEC et al., 2008).

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 (NASCIMENTO e TAVEIRA, 2011). Estima-se que biofilmes estejam envolvidos em 65% das infecções humanas de origem bacteriana (NASCIMENTO e TAVEIRA, 2011). Os dispositivos médicos que apresentam colonização por biofilmes, como os cateteres, são os responsáveis diretos pelo fracasso de muitos dos tratamentos tradicionais (SOTO et al., 2007; SEPANDJ et al.,2008), em razão dos micro-organismos aderidos apresentarem maior

resistência aos agentes antimicrobianos comumente usados na clínica médica (SMITH e HUNTER, 2008).

O tratamento com antimicrobianos é somente capaz de eliminar células planctônicas, deixando as formas sésseis vivas para propagação quando o tratamento cessar (SCHWARTZ et al, 2007). Além disso, há evidências que determinados antimicrobianos podem estimular a produção de biofilmes pelos micro-organismos (MELCHIOR et al., 2006; BRADLEY e GREEN, 2009). 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* sob diferentes concentrações de aminoglicosídeos. Em estudo anterior, HOFFMAN et al (2005) demonstraram que concentrações subinibitórias de aminoglicosídeos induzem a produção de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* isoladas de pacientes com fibrose cística. Bagge et al (2004) demonstraram a mesma indução com  $\beta$ -lactâmicos em *P. aeruginosa*.

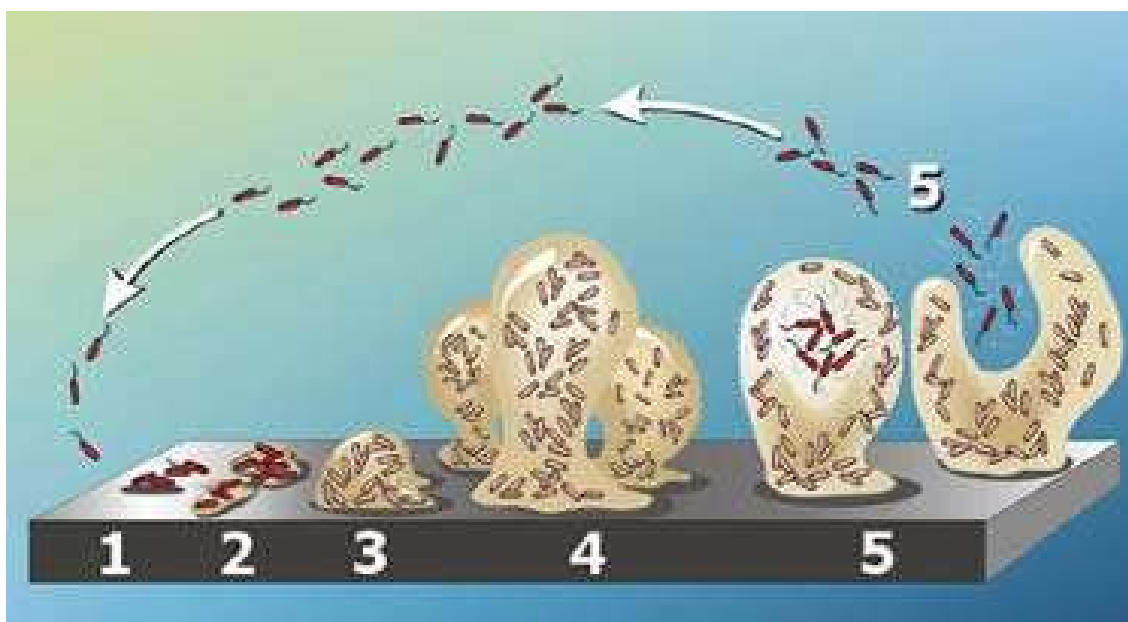
Os estudos sobre os micro-organismos produtores de biofilmes na área médica-veterinária ainda são escassos, entretanto os resultados obtidos já apontam, como na área humana, uma possível influência desses agentes no estabelecimento, controle e tratamento das diversas infecções que acometem os animais, notadamente nas infecções da glândula mamária dos bovinos (MELCHIOR et al., 2006)

A primeira teoria para a produção de biofilmes foi descrita por Marshall et al. (1971), a qual relata que a produção do biofilme ocorre em duas fases, sendo que na primeira ocorre a adesão do micro-organismo na superfície por interações fracas, onde o processo é ainda reversível e os micro-organismos são facilmente removidos; na segunda etapa, ocorre a interação física da célula microbiana com a superfície por meio de um conjunto de fibras finas constituídas por material extracelular de natureza polissacarídea ou protéica, produzida pela bactéria, o qual é denominado glicocálice, que suporta a adesão dos biofilmes. Essas fibras se tornam mais espessas com o tempo, levando à

formação da matriz do biofilme, dentro da qual, substâncias orgânicas e inorgânicas coexistem com os micro-organismos.

O biofilme se desenvolve como resultado posterior da adsorção e aderência de células planctônicas novas, em conjunto com o crescimento continuado das que já se encontram aderidas sobre uma superfície. A segunda fase da aderência bacteriana é baseada em forças de atração mais fortes entre as células e o substrato, momento em que os micro-organismos se tornam firmemente fixados à superfície com o auxílio da matriz extracelular, a aderência está concluída e é estabelecido o biofilme maduro. Neste momento, os biofilmes são de difícil remoção e requerem aplicação de força mecânica forte para serem desagregados das superfícies.

Um modelo mais complexo e atual para explicar a formação, diferenciação e constituição do biofilme maduro é dividido em cinco estágios e está descrito na figura 1 (STOODLEY et al., 2002)..



**Figura 1** - Etapas de desenvolvimento de biofilmes.

Fonte: Stoodley et al. (2002)

As cinco etapas compreendem: 1<sup>a</sup> - as células livres, ou também conhecidas como planctônicas, dispersas no meio, começam a se aproximar de superfícies sólidas por meio da sua motilidade ou por meio do fluxo de fluidos, estas têm que superar as forças de repulsão existentes entre a célula e a superfície. Durante esta etapa a célula bacteriana pode facilmente se mover

na superfície e as forças de interação que influenciam a reversibilidade do processo de adesão são a força de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas; 2<sup>a</sup> – ocorre a transição da fase reversível para a fase irreversível da aderência a partir da produção de polímeros extracelulares e/ou pela produção de adesinas específicas na superfície das bactérias como flagelos e fímbrias, que interagem com a superfície, dessa forma esses organismos tornam-se imobilizados ao substrato iniciando sua multiplicação na superfície de contato e a formação de uma monocamada; 3<sup>a</sup> – Início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; 4<sup>a</sup> - Nesta etapa as bactérias começam a formar agrupamentos conhecidos como microcolônias no biofilme maduro. Durante este estágio as substâncias poliméricas extracelulares servem como uma matriz adesiva e possibilitam o acesso aos nutrientes. Forma-se também nesta etapa uma complexa arquitetura com estrutura composta por pilares compostos de células bacterianas rodeadas por canais de água que permitem os nutrientes e oxigênio alcançarem o interior do biofilme e permite aos metabólitos excretados difundirem-se para fora do mesmo. As células sésseis desenvolvem padrões específicos de crescimento e diferenciação fisiológica e metabólica em relação às células planctônicas; 5<sup>a</sup> – Nesta fase ocorre dispersão das células bacterianas do biofilme para o ambiente ao seu redor e o ciclo se reinicia.

Células em crescimento nos biofilmes mostram diferenças em seu metabolismo, fisiologia e morfologia quando comparadas com células planctônicas. Essas células podem expressar diferentes fenótipos dependendo da sua localização dentro biofilme (McLANDSBOROUGH et al., 2006; COENYE e NELIS, 2010).

### **2.3 Mastite**

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 interrelações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos os fatores determinantes para sua ocorrência (Le BLANK et al. 2006).

No aspecto epidemiológico, a mastite bovina divide-se em mastite contagiosa e ambiental (ANDREWS et al., 2008). A mastite contagiosa é definida pela forma de transmissão direta, o reservatório dos agentes causadores é representado pelo próprio animal, mais especificamente a glândula mamária (RADOSTITIS et al., 2002; ANDREWS et al., 2008). Os patógenos predominantes nessas infecções são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Mycoplasma* sp. A mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do reservatório dos patógenos estarem localizados no próprio ambiente de criação dos animais, como a cama, os equipamentos de ordenha, a água, o solo do curral, entre outros (BURTON et al., 2002; ANDREWS et al., 2008). Os microorganismos mais frequentemente isolados desse tipo de mastite são representados por bactérias gram negativas, como *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. (OLIVER et al., 2011) Sendo *E. coli* o mais representativo patógeno isolado de casos de mastite ambiental (WENZ et al., 2006; OLIVER et al., 2011).

A mastite pode ainda ser classificada, de acordo com a forma de apresentação, em clínica e subclínica. O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação das alterações no leite e da presença de sinais da inflamação na glândula mamária como a presença de dor, edema no úbere e tetos e modificação das características da secreção do leite. Por outro lado, a mastite subclínica é melhor caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas – CCS no leite devido ao influxo de leucócitos, uma vez que tanto o úbere quanto o leite se apresentam, aparentemente, normais (GULER e GUNDUZ, 2007).

Quanto a fisiologia, o ambiente da glândula mamária de animais isentos de sinais clínicos, excluindo as diferenças de raça, ambiente e manejo, apresentam valores de pH entre 6,4 a 6,8, temperatura entre 38°C a 39°C e concentrações de glicose entre 2,2 a 2,8%. (RADOSTITIS et al., 2002; ANDREWS et al., 2008). Entretanto, durante o estabelecimento da mastite, a glândula passa por várias mudanças fisiopatológicas, uma delas se refere ao pH, que pode variar de alcalino para ácido à medida que a doença evolui (ANDREWS et al., 2008). No início dos sinais clínicos, o pH tende a ser

alcalino, devido à produção de substâncias alcalinizantes pelo organismo, visando compensar a acidez produzida pela fermentação bacteriana inicial. Somado a isso, nesta fase, grandes células de defesa juntamente com plasma chegam aos alvéolos lactíferos por meio da corrente sanguínea que, em razão da natureza alcalina do plasma, elevam o pH, podendo variar, em determinadas ocasiões, de 8,3 a 8,7 (ANDREWS et al., 2008). Entretanto, para *E. coli*, assim como para outros micro-organismos fermentadores de açúcares, com a evolução do processo infeccioso e do agravamento dos sinais clínicos, ocorre uma produção cada vez maior de compostos de natureza ácida oriundos da inflamação instaurada e de quantidades maiores de ácidos provenientes da fermentação de açúcares, o que faz com que os valores de pH cheguem próximos a 5 (VANGROENWEGHE, et al., 2006; ANDREWS et al., 2008). Essa fermentação por parte dos micro-organismos também faz com que as concentrações de glicose e lactose no lúmen da glândula mamária acometida pela enfermidade, atinjam níveis mais baixos que o normal. (ANDREWS et al., 2008).

A preocupação com a mastite, tanto na forma clínica como na forma subclínica, 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 de 20 a 38% desta enfermidade representa uma perda de produção entre 12 a 15%, sendo a causa de perda econômica mais significativa no setor lácteo nacional (SANTOS e FONSECA, 2007). 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 nacionais 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 causadas por essa forma de mastite variam de €61 a €97 por bovino acometido 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 (O'FERRALL-BERNDT et al., 2003; ALTALHI et al., 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 cepas bacterianas resistentes e a transferência de resíduos antimicrobianos para a cadeia alimentar (ANDREW et al., 2008). Sendo a bovinocultura leiteira um setor fixador do homem no campo e um importante fornecedor de alimentos altamente nutritivos para a sociedade, a mastite também é preocupante por agravar problemas sociais como o êxodo rural, desnutrição, mortalidade infantil e fome (SANTOS et al., 2000).

Os programas de controle de mastite atuais baseiam-se na higiene de ordenha, no tratamento à base de antimicrobianos e no abate de animais cronicamente infectados. A aplicação destas medidas tem levado a um progresso considerável no controle patógenos contagiosos. No entanto, estes procedimentos são menos eficazes contra patógenos ambientais, (MAKOVEC e RUEGG, 2003; OLIVER et al.; 2011). Este fato é demonstrado por estudos que indicam que a incidência de mastite ambiental, ou se manteve constante ou aumentou nos últimos anos (BRADLEY et al., 2001; MAKIVEC e RUEGG, 2003).

*E. coli* é o micro-organismo mais comumente isolado nos casos de mastite ambiental (WENZ et al., 2006; OLIVER et al., 2011). As mastites causadas por este micro-organismo ocorrem geralmente durante o período seco e logo após o parto, são geralmente transitórias e associadas com quadros clínicos agudos ou superagudos, que podem levar a morte do animal (HOGAN e SMITH, 2003; BURVENICH et al., 2003; BANSAL et al., 2006). Entretanto, tem sido demonstrado que alguns isolados de *E. coli* possuem uma maior habilidade em aderir e replicar no tecido mamário podendo determinar

infecções persistentes no hospedeiro (DOGAN et al., 2006; FONTAINE et al., 2006).

A mastite por *E. coli*, em geral, é decorrente da invasão da glândula mamária pelo agente bacteriano por meio do canal do teto, por meio do contato dos tetos com o ambiente contaminado. Após a invasão, o agente pode se multiplicar ou permanecer em latência, sem causar sinais clínicos, por dias (BLUM et al.; 2008; BRADLEY e GREEN, 2009). Apesar da glândula mamária não ser considerada um habitat natural para estes agentes, muitas cepas são capazes de sobreviver e se multiplicar no interior desta. Este fato se deve à sua habilidade de *E. coli* em adquirir DNA exógeno, incluindo genes de virulência o que contribui para o desenvolvimento de cepas patogênicas adaptadas à glândula mamária e potencialmente causadoras de mastites (KAPER et al., 2008).

A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente, de curta duração 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). É um problema de maior relevância em rebanhos com baixa prevalência de patógenos contagiosos e em bovinos com CCS menor que 150.000 células/mL, sendo a *Escherichia coli* o agente mais importante e mais encontrado nos casos clínicos dessa forma de mastite (GREEN et al., 2007; BRADLEY e GREEN, 2009; OLIVER et al., 2011).

Em geral, os testes utilizados para verificar a sensibilidade a antimicrobianos dos micro-organismos causadores de mastite se baseiam no antibiograma, pela técnica de difusão de discos e na avaliação da concentração mínima inibitória (CMI) (STEENEVELD et al., 2011). Este último, por gerar resultados mais confiáveis e precisos que o antibiograma, vem sendo o mais utilizado pelos laboratórios atualmente. Porém, quando se avalia as células sésseis, esses métodos não fornecem resultados precisos, pois ensaios de sensibilidade efetuados em bactérias organizadas em biofilmes mostram que a concentração do antimicrobiano requerido para erradicação do biofilme é muitas vezes maior do que a determinada na CMI (KAMARK et al, 2008; HØIBY et al., 2010). Este fato é preocupante considerando que o controle e o

tratamento de diversas enfermidades infecciosas dos humanos e animais, são realizados com doses de antimicrobianos baseadas nos resultados do antibiograma e da CMI

Inúmeros estudos de sensibilidade *in vitro* confirmam que os micro-organismos envolvidos com a mastite bovina têm permanecido sensíveis aos agentes antimicrobianos (ERSKINE et al., 2002; ROSSITO et al., 2002; MELCHIOR et al., 2007), entretanto, o sucesso da terapia, tem sido frustrante em muitos casos, não melhorando a saúde do úbere e muitas vezes levando ao descarte precoce do animal. Considerando a baixa eficiência da terapia, relacionada à resistência intrínseca e não a resistência adquirida por transferência horizontal, outros fatores têm sido identificados por proteger os micro-organismos do ataque dos agentes antimicrobianos. Uma das hipóteses mais convincentes para explicar essa resistência à terapia é a habilidade dos micro-organismos de se multiplicarem e formarem biofilmes na superfície do tecido da glândula mamária infectada, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos (MELCHIOR et al., 2006).

Estudos “in vitro” demonstram que células bacterianas organizadas em biofilmes, sésseis, tornaram-se de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células planctônicas dos mesmos isolados (HØIBY et al.; 2010; ANTUNES et al., 2011; SHAFABI e VAFAI, 2011). Este fato pode explicar o reaparecimento da sintomatologia da mastite mesmo após o tratamento com antimicrobianos, o que é embasado por estudos epidemiológicos que sugerem que mais de 40% dos casos de mastite foram recorrentes após o fim do tratamento. (HILLERTON et al., 2007).

LIPMAN et al (2004) observaram a recidiva da mastite nos mesmos quartos e causada pela mesma cepa de *E.coli*, após antibioticoterapia, isso não deveria ser comum, pois há uma grande diversidade de cepas de *E. coli* distribuídas no ambiente, a reinfecção com a mesma cepa sugere a sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro resultado de uma infecção intramamária persistente (PASSEY et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais as células sésseis tornam-se resistentes podem ser atribuídos a diversos fatores, entre eles estão as mudanças fenotípicas das células bacterianas nos biofilmes, a inativação dos

antimicrobianos por EPS, à barreira física exercida pela matriz de EPS e a limitação de nutrientes diminuindo a taxa de crescimento bacteriano (CLUTTERBUCK et al., 2007; HØIBY et al., 2010). Além disso, a distribuição do agente antimicrobiano no tecido mamário pode ser impedida por mudanças fisiopatológicas da glândula mamária como, por exemplo, necrose e isquemia, não permitindo que o antimicrobiano chegue ao local de atuação ou chegue em concentrações subinibitórias (BENGTSSON et al, 2009).

Tendo em vista as 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 recidivante, o conhecimento do perfil de sensibilidade de células sésses e de fatores (pH e concentrações de glicose) que possam influenciar a produção de biofilmes por *E. coli*, é fundamental para se estabelecer estratégias de controle e de tratamentos mais eficientes diminuindo assim falhas na terapia.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das células sésseis e planctônicas de *E. coli* isoladas de mastite bovina e verificar a influência de determinadas condições nutricionais-ambientais e de subdosagens de antimicrobianos na produção de biofilmes.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Identificar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em células sésseis e planctônicas de *E. coli* isoladas de leite mastítico.
- Determinar a influência das condições nutricionais e ambientais semelhantes às encontradas no ambiente da glândula mamária durante a enfermidade.
- Verificar dentre os antimicrobianos usados no tratamento da mastite os que possam induzir a produção de biofilmes.
- Confirmar a presença dos biofilmes por análise de microscopia eletrônica de varredura.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) pertencente ao Departamento de Veterinária (DVT) e no Núcleo de Microscopia e Microanálises (NMM), ambos localizados no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Para a execução das diversas etapas do experimento, foram preparadas, previamente, soluções estoques, na concentração de 1000 mg/mL, dos seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefalexina, ceftiofur, cotrimoxazol, enrofloxacin e gentamicina, usados como componentes de muitas formulações de medicamentos empregados no tratamento da mastite clínica. Estas soluções foram novamente diluídas, seriadamente, em água destilada para as diferentes concentrações utilizadas, filtrados em membrana com poro de 0,22 µm de diâmetro (Schleicher e Schuel, Alemanha), alíquotados e armazenados à temperatura de -20°C até o momento das análises, respeitados os períodos de viabilidade do antimicrobiano. Todo o experimento foi executado de acordo com as normas adequadas de assepsia.

### 4.1 Isolados, meios de cultura e condições de estocagem

Foram utilizados 27 isolados de *Escherichia coli* produtores de biofilmes provenientes de amostras de leite de bovinos apresentando mastite clínica, sendo cinco classificados como grandes produtores de biofilmes (GPB), 11 como moderados produtores de biofilmes (MPB) e 11 como fracos produtores de biofilmes (FPB) (FERNANDES et al., 2011) apresentados no quadro 1. Todos os isolados foram armazenados em microtubos contendo caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid, Cambridge, Inglaterra) acrescidos de 20% de glicerol e estocados a - 80°C. Antes da utilização, cada isolado foi estriado em placas de Petri contendo ágar MacConkey e incubados à temperatura de 37°C por 24 horas.

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. Para isso, colônias de cada isolado foram transferidas para tubos de

ensaio contendo caldo BHI pré-aquecido a 37°C e agitados a 2000rpm até atingir o valor de 0,3 de absorvância<sup>1</sup>, determinada por meio de espectrometria (Bio-tech ELx800, Winooski, EUA) em comprimento de onda de 550nm. A partir dessas culturas, quando necessário, diluições subseqüentes foram realizadas a fim de se atingir a concentração adequada para a realização de cada uma das etapas do experimento descritas abaixo.

**Quadro 1** – Classificação quanto à produção de biofilmes dos 27 isolados de *Escherichia coli* utilizados no experimento.

Isolados	Produção de biofilmes	Isolados	Produção de biofilmes
1	GPB	15	GPB
2	MPB	16	GPB
3	MPB	17	GPB
4	FPB	18	MPB
5	MPB	19	FPB
6	FPB	20	FPB
7	FPB	21	MPB
8	MPB	22	MPB
9	FPB	23	MPB
10	MPB	24	MPB
11	FPB	25	GPB
12	FPB	26	MPB
13	FPB	27	FPB
14	FPB		

GPB=Grande produtor de biofilmes; MPB=Moderado produtor; FPB=Fraco produtor.

#### 4.2 Concentração mínima inibitória - CMI

Os isolados foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos para a obtenção da CMI conforme Moreira et al (2005). Para isso, 230 µL de cultura de cada isolado, diluída a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL, foram adicionadas aos orifícios de placas de microtitulação (Nunc-limmuno plates, Dinamarca), juntamente com 70 µL das soluções dos antimicrobianos, em diferentes concentrações. O caldo BHI no volume de 230 µL acrescido de 70 µL das soluções antimicrobianas nas diferentes concentrações foi usado como

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

controle negativo. Para o controle positivo, foram utilizadas 230 µl das culturas diluídas juntamente com 70 µL de água destilada.

O crescimento dos isolados foi acompanhado em um aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan®, Plus-MKII) e as leituras das D.O<sub>550</sub> foram feitas em intervalos de tempo preestabelecidos até a estabilização dos valores. A curva de crescimento foi construída com a média estabelecida das triplicatas e plotada em programa Excel 2007. A CMI foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que ira impedir 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.

#### **4.3 Condições nutricionais e ambientais envolvidas na produção de biofilmes.**

Conforme metodologia descrita por Kaur et al., (2009) com modificações, foi elaborado um meio mínimo sem uma fonte de carbono, composto por 5% de peptona e 10% de cloreto de sódio diluídos em água destilada. A partir deste meio, foram preparados 16 diferentes meios mínimos (MM) associando uma concentração de glicose (0,5%, 1,5%, 2,5% e 3,5%) com um valor de pH (5,5; 6,5; 7,5 e 8,5) conforme descrito na quadro 2. Essas associações utilizadas são semelhantes às encontradas no lúmen da glândula mamária bovina em diferentes etapas da fisiopatologia da mastite clínica, desde o início da infecção até o aparecimento dos sinais clínicos e, por conseguinte o estabelecimento da enfermidade.

Os isolados foram reativados em 2,0 mL de cada um dos diferentes MM em tubos de ensaio, incubados a 37°C durante 24 horas e diluídos a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL. Posteriormente, 300 µL da cultura diluída foram adicionados aos orifícios de placas de microtitulação (Nunc-limmuno plates, Dinamarca) e submetidos à incubação a 37°C por 24 horas . Após a incubação a produção de biofilmes foi quantificada. Para isso, as placas foram lavadas por três vezes em água destilada, preenchidas por 250 µL de Metanol (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) por orifício, incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e secas por aeração em cabine de fluxo laminar. Posteriormente, os

orifícios foram preenchidos por 250 µL de corante cristal violeta 1% (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), submetidos à incubação em temperatura ambiente por 10 minutos e lavados em água corrente. Os orifícios foram novamente preenchidos com 250 µL de ácido acético glacial a 33% (Chemco, Campinas, Brasil) e após 2 minutos, os valores de densidade óptica (D.O.) foram mensurados no leitor de placas (Bio-tech ELx800, Winooski, EUA) em comprimento de onda de 550nm e a média aritmética das triplicatas calculadas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e para o controle negativo utilizou-se um MM não inoculado.

**Quadro – 2.** Concentrações de glicose e valores de pH dos 16 meios mínimos utilizados no experimento.

Meios mínimos	Glicose (%)	pH
A1	2,5	5,5
A2	2,5	6,5
A3	2,5	7,5
A4	2,5	8,5
B1	0,5	5,5
B2	0,5	6,5
B3	0,5	7,5
B4	0,5	8,5
C1	1,5	5,5
C2	1,5	6,5
C3	1,5	7,5
C4	1,5	8,5
D1	3,5	5,5
D2	3,5	6,5
D3	3,5	7,5
D4	3,5	8,5

#### **4.4 Perfil de resistência das células sésseis aos antimicrobianos.**

Foi utilizada a metodologia de Lucchesi, (2006) com modificações. Para isso, tubos de ensaio foram preenchidos com cinco esferas de vidro com 2,00 mm de diâmetro juntamente com 5,0 mL de cultura de cada um dos 27 isolados em caldo BHI a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL e incubados por 24 horas à temperatura de 37°C. Após a incubação, as esferas foram removidas com auxílio de uma

pinça, transferidas para novos tubos de ensaio e lavadas três vezes com solução salina. Após as lavagens, os tubos foram preenchidos com 5,0 mL de caldo BHI juntamente com os antimicrobianos a concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL e incubados por 24 horas a 37°C. Posteriormente, as esferas foram lavadas com solução salina e transferidas para novos tubos contendo 5,0 mL de caldo BHI. Os tubos foram submetidos à agitação por 9 minutos a 2000 rpm e incubados por 24 horas à temperatura de 37°C, momento em que foi avaliado o crescimento celular por turbidez e plaqueamento em meio MacConkey. A menor concentração na qual não se verificou crescimento bacteriano foi denominada como concentração mínima de erradicação do biofilme (CMEB).

A partir dos resultados obtidos, ensaios foram realizados para seis isolados escolhidos aleatoriamente, visando obter a concentração de células sésseis desagregadas da superfície das esferas e confirmar a ação das CMEB sobre os biofilmes. Para isso, as esferas de cada isolado, foram submetidas à respectiva CMEB de um antimicrobiano. Como controle positivo, as esferas foram submetidas a caldo BHI sem antimicrobianos. A metodologia seguiu-se conforme descrito anteriormente e, após a agitação a 2000g, alíquotas de 1,0 mL de cada um dos tubos foram retiradas, diluídas de forma seriada e plaqueadas em placas com ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram quantificadas nas placas contendo 25 a 250 colônias.

#### **4.5 Antimicrobianos indutores de biofilmes**

Para a execução deste experimento foram utilizadas cinco concentrações subinibitórias de cada antimicrobiano utilizado no trabalho. Baseado nisso, tomou-se como referência a menor CMI obtida para cada antimicrobiano, a partir da qual foram feitas diluições subseqüentes 1:2 até a última concentração utilizada.

O procedimento seguiu-se as metodologia de Hoffman et al. (2005) e Moreira et al. (2005), ambas com modificações. Um volume de 230 µl de cultura diluída a  $1,0 \times 10^7$  UFC/ml de cada isolado juntamente com 70 µl de

solução de cada antimicrobiano, nas diferentes concentrações pré-estabelecidas, foi adicionado aos orifícios de placas de microtitulação. Para o controle positivo, empregou-se 230 µl de cultura adicionada de 70 µl de água destilada e para o controle negativo, foi utilizado 230 µl de caldo BHI adicionado de 70 µl de solução antimicrobiana. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e a quantificação da produção dos biofilmes foi analisada como descrita no item 4.3. Todos os procedimentos foram executados em triplicata e os antimicrobianos foram previamente diluídos em água destilada, filtrados, aliquotados e armazenados à – 20°C até o momento das análises.

#### **4.6 Microscopia eletrônica de varredura – MEV**

A metodologia utilizada para visualização dos biofilmes foi adaptada a partir de Abdi-alil et al (2006). Foram preparados cupons de poliestireno medindo 1,0 x 0,5 cm, 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 1% durante 30 minutos; lavagem em água destilada; imersão em álcool 70%; lavagem em água destilada. Após higienização, foram secos por 2 minutos e expostos à radiação ultravioleta (UV) por 20 minutos em cabine de fluxo laminar.

A MEV foi executada para quatro isolados escolhidos aleatoriamente (dois fracos produtores de biofilmes, FPB e dois grandes produtores de biofilmes, GPB) cultivados sob condições que favoreceram ou não a produção de biofilmes. Os cupons foram colocados em tubos de vidro contendo 5 mL de cultura de cada isolado em caldo BHI a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas 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 24 horas em temperatura de 4,0°C.

Após a fixação, foi conduzida a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas a 4,0°C, desidratação e secagem em ponto crítico Balzers CPD 020, montagem em suporte de alumínio e cobertura com ouro em “sputter coater” (Balzers SCA 010). Na seqüência, o material foi analisado em

microscópio eletrônico de varredura Leo 1430VP em diferentes magnitudes de aumento.

#### **4.7 Análise estatística.**

Para avaliar se os dados obtidos no trabalho seguem a distribuição normal, empregou-se o teste de normalidade de Anderson-Darling.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para identificar possíveis diferenças entre aos valores de CMEB das distintas categorias de isolados (grande, moderado e fraco produtor de biofilme), posteriormente empregou-se o teste de Dunn's para localizar as diferenças entre as categorias.

O teste de Kruskal-Wallis também foi usado para identificar possíveis diferenças entre a produção de biofilmes pelos isolados, nos diferentes meios mínimos e igualmente, para os isolados submetidos às diferentes concentrações de antimicrobianos. Posteriormente, os dados foram submetidos ao teste de Dunn's, necessário para localizar as diferenças entre os grupos.

O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar a possível correlação entre os valores de CMI e CMEB.

Os testes foram realizados em três repetições e o nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Para a realização dos referidos testes estatísticos foi empregado o software Minitab 15®.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

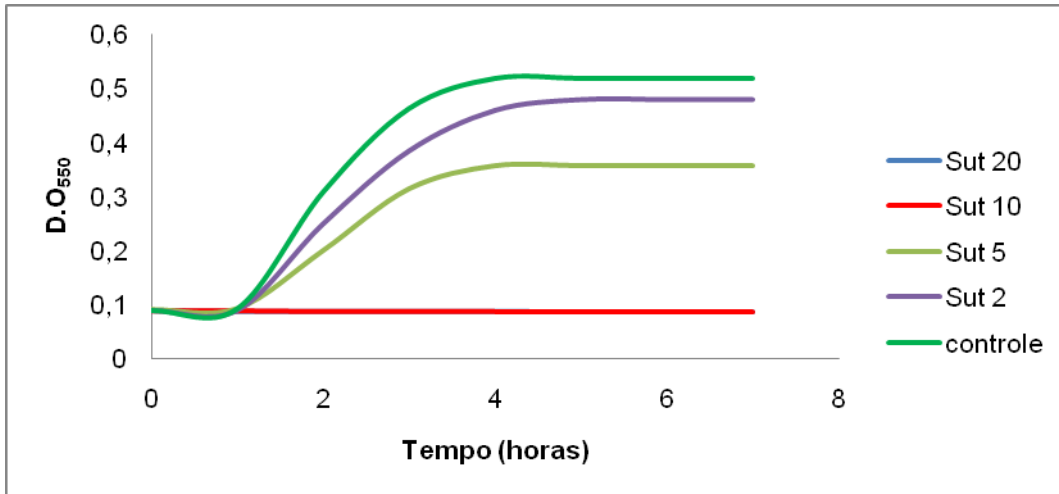
### **5.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)**

Foram observados valores de CMI variando entre 0,125  $\mu\text{g/mL}$  a 10  $\mu\text{g/mL}$  para os 27 isolados analisados. Os maiores valores foram obtidos para quatro isolados, que obtiveram, para o cotrimoxazol, CMI de 10  $\mu\text{g/mL}$  (quatro isolados) (Figura 2) e para ampicilina, CMI 4,0  $\mu\text{g/mL}$  (dois isolados), 6,0  $\mu\text{g/mL}$  (um isolado) e 8,0  $\mu\text{g/mL}$  (um isolado), o que os coloca dentro da categoria de resistentes para estes antimicrobianos (CLSI, 2008) (tabela – 1). Entretanto, para os demais isolados, 23 (85,2%) no total, os valores de CMI obtidos foram

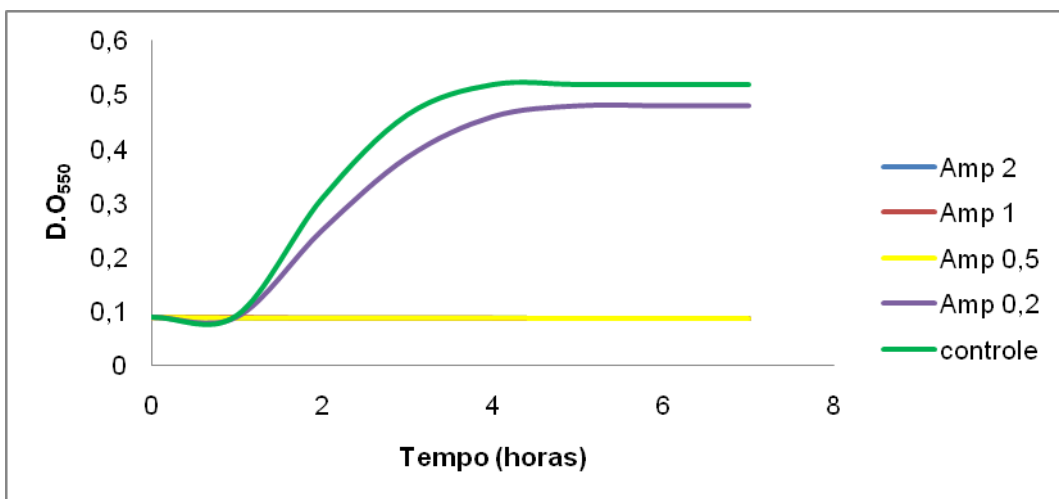
baixos, variando de 0,125 a 0,25 µg/mL para ampicilina (Figura 3), 0,5 a 1,0 µg/mL para ceftiofur, 1,0 a 2,0 µg/mL para cefalexina, 0,125 a 0,25 µg/mL para enrofloxacin, 0,5 a 2,0 µg/mL para cotrimoxazol e 0,5 a 2,0 µg/mL para gentamicina sendo classificados na categoria de sensíveis (CLSI, 2008) (Tabela 1).

Resultados semelhantes foram obtidos por Bengtsson et al., (2009) na Suécia que, avaliando a resistência de 743 isolados bacterianos causadores de mastite clínica, encontraram um perfil de alta sensibilidade para *E. coli*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *S. agalactiae* à maioria dos antimicrobianos usados. No mesmo estudo, destaca-se que as CMI encontradas para *E. coli* se assemelharam aos encontrados no presente trabalho, com 100% desses valores entre 0,25 µg/mL e 1,0 µg/mL para ceftiofur, 74,8% entre 0,5 µg/mL e 2,0 µg/mL para ampicilina, 92% entre 0,5 µg/mL e 2,0 µg/mL para gentamicina e 100% entre 0,03 µg/mL e 0,12 µg/mL para enrofloxacin.

Em princípio, a alta taxa de sensibilidade encontrada por Bengtsson et al., (2009) e pelo presente trabalho, se mostra favorável ao emprego destes antimicrobianos no tratamento da mastite causada por estes isolados de *E. coli*. Todavia, estudos vêm demonstrando que o sucesso da terapia antimicrobiana da mastite tem sido muitas vezes ineficaz, resultado em infecções persistentes e/ou recidivantes após o tratamento (MELCHIOR et al., 2006; DOGAN et al., 2006). Uma das hipóteses para explicar essa resistência à terapia é a habilidade dos isolados de *E. coli* assim como outros micro-organismos de se aderirem, multiplicarem e formarem biofilmes na superfície do tecido da glândula mamária infectada, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos (MELCHIOR et al., 2006). Este fato pode ser confirmado em razão dos testes de CMI avaliarem apenas o perfil de sensibilidade das células planctônicas, não permitindo extrapolar seus resultados para as células sésseis, pois são mais resistentes à ação dos antimicrobianos.



**Figura 2** - Efeito das diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) de cotrimoxazol (Sut) sobre o crescimento de *Escherichia coli*, em caldo BHI. A CMI foi de  $10 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3** - Efeito das diferentes concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) de ampicilina (Amp) sobre o crescimento de *Escherichia coli*, em caldo BHI. A CMI foi de  $0,5 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabela1** - Distribuição (porcentagem) das CMI e perfil de resistência dos isolados de *Escherichia coli* (n=27) provenientes de mastite clínica.

Antimicrobiano.	R (%)	Distribuição (%) das CMI (µg/mL)								
		0,125	0,25	0,5	1	2	4	6	8	10
AMP	14,81	40,74	44,45				7,41	3,7	3,7	
CTF	0			40,74	59,26					
CEF	0				62,9	37,1				
ENO	0	6	74							
GEN	0			7,41	88,9	3,69				
SUT	14,81			37,1	37,1	10,99				14,81

Os isolados são classificados como resistentes quando as CMI se localizam na área sombreada. R=resistência; AMP=ampicilina; CTF=ceftiofur; CEF=cefalexina; ENO=enrofloxacina; GEN=gentamicina; SUT=cotrimoxazol.

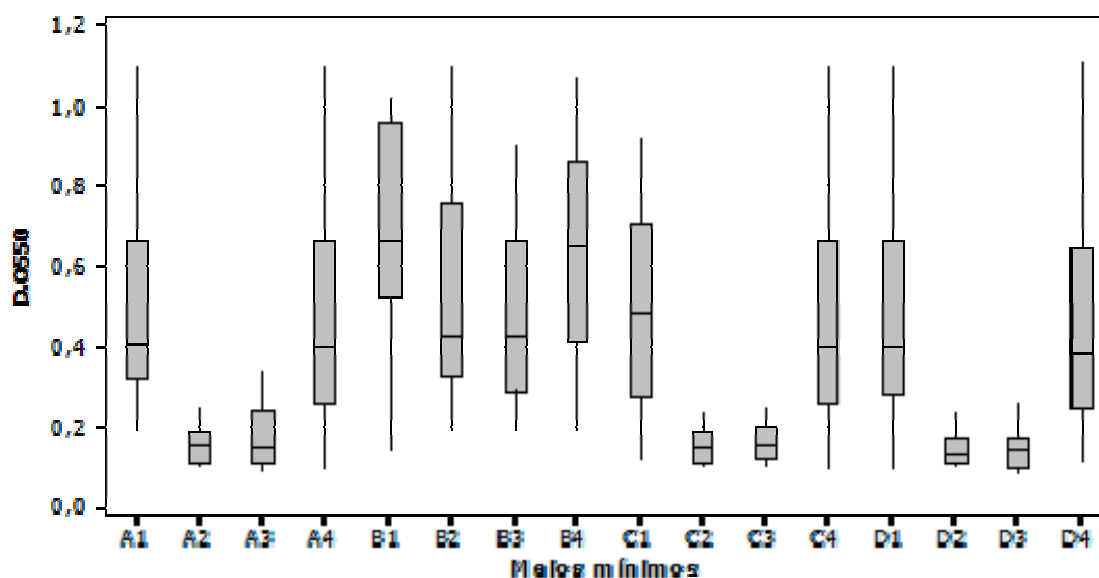
## 5.2 Concentrações de glicose e variações de pH envolvidos com a produção de biofilmes.

Em todos os MM testados os isolados foram capazes de aderir e formar biofilmes em diferentes quantidades ou biomassas nas placas de microtitulação (Figura 4). Para facilitar o entendimento, os resultados foram agrupados em três grupos: grupo 1, grupo 2 e grupo 3.

A produção de biofilmes foi significativamente maior para os meios B1 e B4 (grupo 1). Para esses meios, a associação entre as menores disponibilidades de glicose (0,5% e 1,5%) com os valores de pH mais distantes da neutralidade (pH 5,5 e pH 8,5), proporcionaram condições estressantes para as células bacterianas e favoreceram a maior produção de biofilmes (Figura 4). Os meios A1, A4, B2, B3, C1 e C4, (grupo 2), também possibilitaram uma considerável produção de biofilmes, porém menor que a obtida para o grupo 1. Neste caso, não houve associação de dois fatores estressantes em um mesmo meio como demonstrado no grupo 1. Esses dados confirmam que pH (5,5 e 8,5) ou glicose (0,5% e 1,5%) exercem influência na produção de biofilmes por *E. coli*, porém quando estão associados esta influência parece ser sinérgica, proporcionando uma maior produção (Figura 4). Por outro lado, para os meios A2, A3, D1, D2, D3 e D4 (grupo 3), a associação de pH próximo da

neutralidade (pH 6,5 e pH 7,5) e concentração de glicose alta (2,5% e 3,5%), parece ter exercido influência antagônica, fazendo com que os isolados produzissem as mais baixas quantidades de biofilmes no teste. (Figura 4). Um caso atípico foi encontrado para C2 e C3 que embora apresentem baixa disponibilidade de glicose (1,5%) obtiveram produção de biofilmes iguais estatisticamente a do grupo 3 ( $p > 0,05$ ).

Houve diferença na capacidade de formação de biofilmes entre os grupos 1, 2 e 3 ( $p < 0,001$ ). O mesmo ocorreu ao se comparar o grupo 2 com o grupo 3 ( $p < 0,001$ ). Entretanto não foi verificada diferença ao se comparar os meios entre si, dentro dos grupos, ( $p > 0,05$ ).



A1 (pH=5,5 e 2,5% de glicose); A2 (pH=6,5 e 2,5% de glicose); A3 (pH=7,5 e 2,5% de glicose); A4 (pH=8,5 e 2,5% de glicose); B1 (pH=5,5 e 0,5% de glicose); B2 (pH=6,5 e 0,5% de glicose); B3 (pH=7,5 e 0,5% de glicose); B4 (pH=8,5 e 0,5% de glicose); C1 (pH=5,5 e 1,5% de glicose); C2 (pH=6,5 e 1,5% de glicose); C3 (pH=7,5 e 1,5% de glicose); C4 (pH=8,5 e 1,5% de glicose); D1 (pH=5,5 e 3,5% de glicose); D2 (pH=6,5 e 3,5% de glicose); D3 (pH=7,5 e 3,5% de glicose); D4 (pH=8,5 e 3,5% de glicose).

**Figura 4** - Produção de biofilmes (densidade ótica, D.O<sub>550nm</sub>) de isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico nos 16 meios mínimos avaliados.

Embora meios com maior disponibilidades de açúcares sejam mais propícios ao crescimento bacteriano, no presente trabalho, estes não foram capazes de estimular uma maior produção de biofilmes. Em estudo semelhante, Kaur et al (2009) verificaram que estreptococos do grupo B

isolados de casos clínicos de vaginite em humanos, produziram quantidades maiores de biofilmes em meios alcalinos e com limitação de glicose em comparação aos meios ácidos, neutros e ricos em glicose. Em outro estudo, Michu et al (2011) observaram maior produção de biofilmes por isolados de *S. epidermidis* cultivados em meios com baixas concentrações de glicose em relação aos isolados cultivados com altas concentrações. As diferenças na produção de biofilmes sob diferentes condições ambientais e nutricionais são explicadas, possivelmente, pela capacidade de alguns micro-organismos que, em resposta a estímulos externos como densidade populacional, tensão ou limitação de nutrientes, osmolaridade, pH e composição do meio; ativarem genes responsáveis pela expressão de proteínas de superfície que favorecem a adesão e a produção de EPS, as quais estão diretamente envolvidas na produção dos biofilmes (FRANK et al., 2008).

Os resultados também permitiram verificar que os meios que mais favoreceram a produção de biofilmes (grupo1) apresentam condições que se assemelham ao ambiente da glândula mamária em etapas mais avançadas da inflamação, a partir do aparecimento dos sinais clínicos. O pH do lúmen da glândula, a partir desta fase, pode variar de alcalino para ácido à medida que a doença evolui (VANGROENWEGHE et al., 2006; ANDREWS et al., 2008). Segundo Andrews et al., (2008), no início dos sinais clínicos, o pH tende a ser elevado, devido à grande quantidade de substâncias alcalinizantes sintetizadas pelo organismo, visando compensar a acidez produzida pela fermentação bacteriana. Além disso, nesta fase, grandes quantidades células de defesa juntamente com plasma chegam aos alvéolos lactíferos por meio da corrente sanguínea que, em razão da natureza alcalina do plasma, elevam o pH, podendo chegar a 8,3 - 8,7. Entretanto, à medida que o processo infeccioso evolui, este recurso utilizado pelo organismo torna-se descompensado pela produção em maiores quantidades de ácidos provenientes da inflamação e da fermentação de açúcares pelas bactérias, que faz com que os valores de pH diminuam e cheguem próximos a 5.(VANGROENWEGHE, et al. 2006; ANDREWS et al., 2008). Os meios que menos favoreceram a produção de biofilmes (Grupo 2) possuem condições que se assemelham ao ambiente da

glândula sadia, ricos em açúcar e com valores de pH mais próximos da neutralidade (RADOSTITIS et al, 2002; ANDREWS et al., 2008).

Os resultados, embora obtidos de ensaios *in vitro*, permitem fazer inferências sobre o possível favorecimento da produção de biofilmes em etapas mais avançadas do processo infeccioso da mastite causada por *E. coli*, quando o ambiente glandular encontra-se menos favorável ao crescimento bacteriano devido às condições de estresse mencionadas anteriormente. O contrário parece ocorrer quando se trata do ambiente da glândula mamária sadia, situação em que não há limitação de nutrientes nem condições de alcalinidade e/ou acidez.

### **5.3 Resistência dos biofilmes a antimicrobianos**

O trabalho demonstrou alta resistência das células sésseis de *E. coli* aos antimicrobianos em relação às células planctônicas. Este fato foi confirmado pelos valores de CMEB tem sido superiores aos valores de CMI correspondentes (Tabelas 2-7). De acordo com a literatura, bactérias organizadas em biofilmes tornam-se de 10 a 1000 vezes mais resistentes a ação de antimicrobianos em relação às bactérias livres (HØIBY et al., 2011). Entretanto, no presente estudo, as células sésseis dos isolados GPB e MPB foram até 2500 vezes mais resistentes a ampicilina (dois isolados GPB e dois MPB) e até 2400 a enrofloxacina (dois isolados GPB e dois MPB) (Tabela 2 e 6). Para as células sésseis dos isolados FPB, esse aumento de resistência foi menor, variando de 333,4 para ampicilina (três isolados) a 4 para cotrimoxazol (dois isolados) (Tabelas 2 e 5). Da mesma forma, foi possível observar também que para os isolados classificados como resistentes (item 5.1), o aumento da resistência foi menor comparado aos isolados sensíveis, variando de 4 para ampicilina (dois isolados FPB) a 25 (dois isolados FPB). Estes resultados indicam uma maior eficácia dos antimicrobianos sob os isolados FPB de *E. coli*, usados no experimento, comparada aos isolados GPB e MPB.

Analisando estatisticamente as razões CMEB/CMI obtidas entre as diferentes categorias de isolados (GPB, MPB E FPB), foi possível demonstrar que a CMEB foi significativamente maior nos isolados GPB em relação aos

isolados FPB ( $p < 0,001$ ), como também em relação aos isolados FPB ( $p < 0,001$ ). No entanto, quando comparou-se o CMEB de isolados GMP com os de isolados MPB, as diferenças não foram significantes ( $p > 0,05$ ) (Tabelas 3-8). Estes resultados podem ser explicados pela menor difusão dos antimicrobianos pelas camadas dos biofilmes produzidos por isolados GPB e MPB que tendem a ter uma maior biomassa e conseqüentemente mais densas comparadas as camadas dos biofilmes produzidos por isolados FPB (MELCHIOR et al., 2006). Isso poderia promover uma maior resistência das células sésseis devido a não exposição ou a exposição gradual de concentrações muito baixas do antimicrobiano (CLUTTERBUCK et al., 2007; HØIBY et al., 2010). Não houve correlação entre os valores de CMEB e CMI ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de ampicilina para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI( $\mu\text{g/mL}$ )	CMEB( $\mu\text{g/mL}$ )	Razão*
1	GPB	0,12	200,0	1667,0
2	GPB	0,12	300,0	2500,0
1	GPB	0,25	200,0	800,0
1	GPB	0,25	300,0	1200,0
4	MPB	0,12	200,0	1667,0
2	MPB	0,12	300,0	2500,0
2	MPB	0,25	200,0	800,0
1	MPB	0,25	300,0	1200,0
1	MPB	0,25	400,0	1600,0
1	MPB	0,25	500,0	2000,0
3	FPB	0,12	40,0	333,4
3	FPB	0,25	40,0	160,0
1	FPB	0,25	40,0	160,0
2	FPB	4,0	100,0	25,0
1	FPB	6,0	60,0	10,0
1	FPB	8,0	100,0	12,5

Categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor. \*Razão=CMEB/CMI

**Tabela 3** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de ceftiofur. para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI (µg/mL)	CMEB (µg/mL)	Razão*
2	GPB	1,0	300,0	300,0
3	GPB	1,0	400,0	400,0
5	MPB	1,0	300,0	300,0
2	MPB	1,0	400,0	400,0
4	MPB	2,0	400,0	200,0
5	FPB	1,0	40,0	40,0
6	FPB	2,0	40,0	20,0

categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor.  
\*Razão=CMEB/CMI

**Tabela 4** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de cefalexina. para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI (µg/mL)	CMEB (µg/mL)	Razão*
2	GPB	1,0	300,0	300,0
3	GPB	1,0	400,0	400,0
5	MPB	1,0	300,0	300,0
2	MPB	1,0	400,0	400,0
4	MPB	2,0	400,0	200,0
5	FPB	1,0	40,0	40,0
6	FPB	2,0	40,0	20,0

categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor.  
\*Razão=CMEB/CMI

**Tabela 5** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de cotrimoxazol para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI (µg/mL)	CMEB (µg/mL)	Razão*
3	GPB	0,5	400,0	800,0
2	GPB	2,0	400,0	200,0
3	MPB	0,5	400,0	800,0
5	MPB	1,0	400,0	400,0
1	MPB	2,0	500,0	250,0
2	MPB	10,0	50,0	5,0
4	FPB	0,5	40,0	80,0
5	FPB	1,0	40,0	40,0
2	FPB	10,0	40,0	4,0

categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor. \*Razão=CMEB/CMI

**Tabela 6** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de enrofloxacin. para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMEB ( $\mu\text{g/mL}$ )	Razão*
3	GPB	0,20	300,0	1500,0
2	GPB	0,125	300,0	2400,0
4	MPB	0,20	200,0	1000,0
5	MPB	0,20	300,0	1500,0
2	MPB	0,125	300,0	2400,0
8	FPB	0,20	20,0	100,0
3	FPB	0,125	40,0	320,0

categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor.  
\*Razão=CMEB/CMI

**Tabela 7** - Comparação entre as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações mínimas de erradicação de biofilmes (CMEB) de gentamicina. para isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica.

Isolados n=27	Categ.	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	CMEB ( $\mu\text{g/mL}$ )	Razão*
3	GPB	1,0	300,0	300,0
1	GPB	1,0	400,0	400,0
1	GPB	1,0	500,0	500,0
5	MPB	1,0	300,0	300,0
4	MPB	1,0	400,0	400,0
1	MPB	1,0	500,0	500,0
1	MPB	2,0	500,0	250,0
2	FPB	0,5	60,0	120,0
3	FPB	1,0	80,0	80,0
2	FPB	1,0	60,0	60,0
4	FPB	1,0	40,0	40,0

categ. = Categoria; GPB= grande produtor de biofilmes; MPB= moderado produtor; FPB=fraco produtor.  
\*Razão=CMEB/CMI

Resultados semelhantes foram encontrados por Antunes et al., (2011) que, demonstraram maiores valores de CMEB de vancomicina para isolados de *Staphylococcus* spp, GPB e MPB, obtidos de cateteres, quando comparados aos FPB. Este aumento, assim como no presente trabalho, não foi verificado quando compararam as CMEB dos isolados GPB com MPB e não foi encontrada correlação entre os valores de CMEB e CMI. Em seus resultados, entretanto, os valores de CMEB foram inferiores aos encontrados neste trabalho.

O presente estudo permitiu demonstrar que as CMI dos antimicrobianos testados, frequentemente usadas como referência para o tratamento clínico, tanto na área humana como na veterinária, não foram eficientes na eliminação das células sésseis, sendo requeridas concentrações muito superiores às aquelas indicadas e praticadas nos tratamentos. Estes dados são confirmados pela literatura, onde estudos de erradicação de biofilmes bacterianos na área clínica, demonstram que as concentrações de antimicrobianos requeridas para erradicação das células sésseis podem ser maiores que 1.000 vezes a CMI. (HØIBY et al., 2010).

Foram também determinadas as concentrações médias das células desprendidas das esferas de sete isolados escolhidos aleatoriamente (Tabela 9). Nenhuma colônia foi visualizada a partir das esferas submetidas às CMEB, contudo, concentrações médias de  $1,96 \times 10^6$  UFC/mL, foram obtidas nas esferas não submetidas à ação dos antimicrobianos, demonstrando a efetividade das CMEB sobre as células sésseis de *E. coli*.

A escolha da terapêutica e da concentração antimicrobiana correta para o tratamento de infecções intramamárias em bovinos relacionadas com a produção de biofilmes, parece exigir a aplicação de testes mais específicos. Basear-se apenas em valores de CMI tem se mostrado ineficaz para determinar com precisão a susceptibilidade das células bacterianas sésseis.

**Tabela 8** - Taxa de recuperação celular média de células sésseis de sete isolados produtores de biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de mastite clínica. desagregadas das esferas de vidro submetidas às respectivas concentrações mínimas de erradicação de biofilmes – CMEB em cada antimicrobiano testado.

Isolados n=7	Antimicrobiano	CMEB (µg/mL)	Concentração (UFC/mL)
1	AMP	200	0
1	CTF	400	0
1	CEF	300	0
1	ENO	400	0
1	GEN	300	0
1	SUT	400	0
7	S/ATB	0	$1,96 \times 10^6$

AMP=ampicilina; CTF=ceftiofur; CEF=cefalexina; ENO=enrofloxacina; GEN=gentamicina; SUT=cotrimoxazol; S/ATB= sem antimicrobianos.

#### 5.4 Antimicrobianos indutores de biofilmes

Dentre os antimicrobianos testados, gentamicina (aminoglicosídeo), e enrofloxacina (quinolona), foram considerados indutores da produção de biofilmes, no presente trabalho, respectivamente nas concentrações de 0,0312 e 0,0125 µg/mL (Figuras 5 e 6). Sob estas concentrações, os isolados obtiveram D.O<sub>550</sub> maiores quando comparadas às D.O<sub>550</sub> do controle (C) ( $p < 0,001$ ), o que indica uma maior produção de biofilmes pelos isolados nas concentrações citadas. As D.O<sub>550</sub> nas demais concentrações destes antimicrobianos não diferiram da D.O<sub>550</sub> do controle ( $p > 0,05$ ) (Figuras 5 e 6).

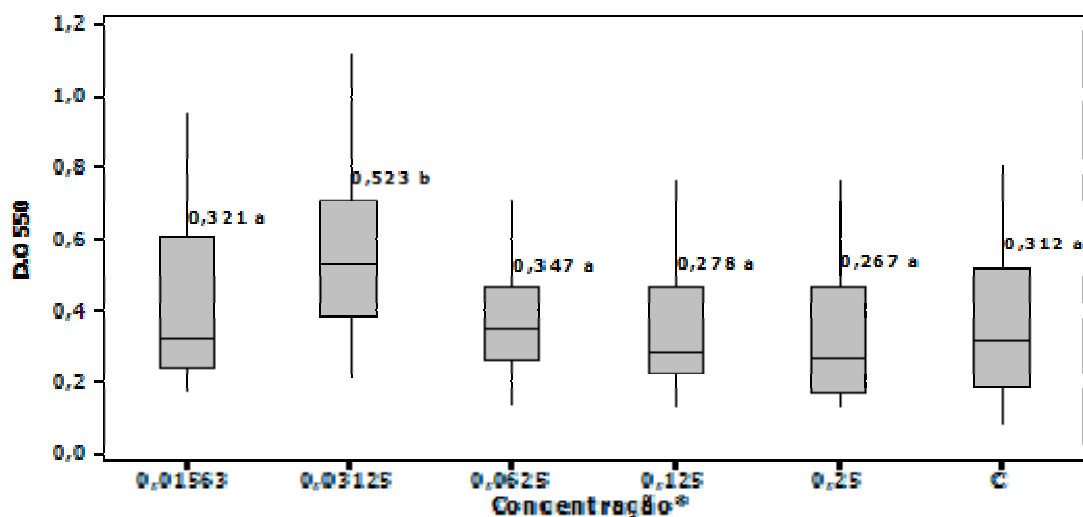
Resultados semelhantes foram encontrados por Hoffman et al (2005) que demonstraram que concentrações subinibitórias dos aminoglicosídeos: gentamicina, estreptomicina e trombamicina induziram a produção de biofilmes por isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*. Segundo os autores, esta indução pode ser atribuída a diversos fatores, mas, principalmente, a uma reação defensiva específica para a presença de antimicrobianos e indicam que a base desta resposta inclui alterações nos níveis moleculares, com estímulo da expressão de determinados genes e inibição da expressão de outros. Em outro estudo, Chen et al (2010) confirmaram essa afirmação ao verificar a indução de genes envolvidos com a produção de biofilmes, *acrA*, *agn43*, *csgA*, *csgD*, *ompF* and *pgaA*, por isolados de *E. coli*, obtidos de amostras clínicas de suínos e aves sob diferentes concentrações de aminoglicosídeos.

Os antimicrobianos gentamicina e enrofloxacina fazem parte da formulação de diversos medicamentos tradicionais disponíveis para o tratamento da mastite, sendo amplamente utilizados. (LANGONI et al., 2000; RANGEL et al. 2009). No entanto esta utilização muitas vezes é efetuada sem um estudo prévio do real perfil de sensibilidade dos micro-organismos, levando administrações de doses subinibitórias, favorecendo, além da seleção de isolados resistentes, a possível indução da produção de biofilmes. Esse fato é preocupante, tendo em vista que uma das hipóteses para explicar o crescente aumento de casos de mastites persistentes e/ou recidivantes nos rebanhos, que representam grandes prejuízos ao setor lácteo, é a presença de patógenos organizados em biofilmes no tecido da glândula mamária (MELCHIOR et al., 2006). Outra situação em que os antimicrobianos podem atingir concentrações

subinibitórias na glândula mamária é o seu estado patológico. A presença de edema e do processo inflamatório pode impedir parcialmente o avanço dos antimicrobianos aos locais da infecção, fazendo com que esses alcancem as células bacterianas em concentrações muito abaixo das doses efetivas (ANDREWS et al., 2008).

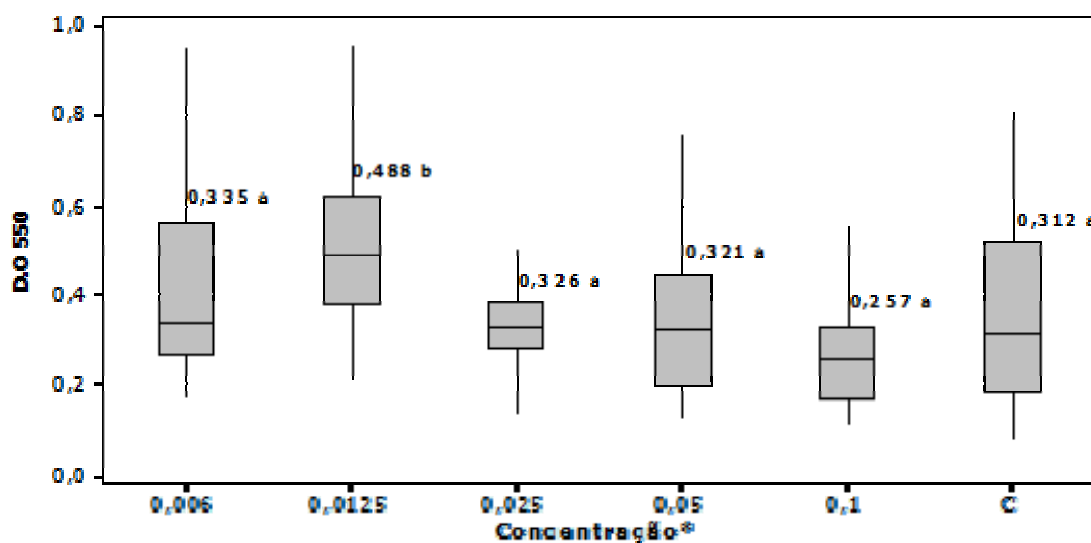
Mesmo com estudos demonstrando que aminoglicosídeos têm participação importante na indução de biofilmes de *P. aeruginosa* e *E. coli*, ainda não foi relatado o mesmo para quinolonas, sendo o resultado encontrado neste estudo, o primeiro relato do aumento da produção de biofilmes de *E. coli* de mastite clínica causado por concentração subnibitória de enrofloxacin. Este antimicrobiano é muito utilizado para o tratamento tanto da forma clínica como da subclínica da mastite e, devido ao seu amplo espectro de ação abrangendo um grande número de micro-organismos, possui forte apelo comercial (LANGONI et al. 2000).

Sob as concentrações de 0,25; 0,125 e 0,0625 µg/mL de cotrimoxazol; 0,25 µg/mL de cefiofur; 0,5 e 0,25 µg/mL de cefalexina os isolados obtiveram uma produção de biofilmes estatisticamente menores quando comparada a com o controle ( $p < 0,001$ ). Este fato pode ser atribuído à ação bactericida ainda presente nestas concentrações, próximas às CMI, que ao inativar as células bacterianas planctônicas, não permitiram uma produção consistente de biofilmes. Nas demais concentrações desses antimicrobianos, os isolados não diferiram na produção de biofilmes, em relação ao controle ( $p > 0,05$ ) (Figuras 7-9). Em todas as cinco concentrações de ampicilina, as D.O<sub>550</sub> obtidas pelos isolados não diferiram estatisticamente quanto à produção de biofilmes em relação ao controle ( $p > 0,05$ ), demonstrando que este antimicrobiano, em concentrações subnibitórias, não exerceu influência na produção e consequentemente na indução da produção de biofilmes pelos isolados de *E. coli* avaliados (Figura 10).



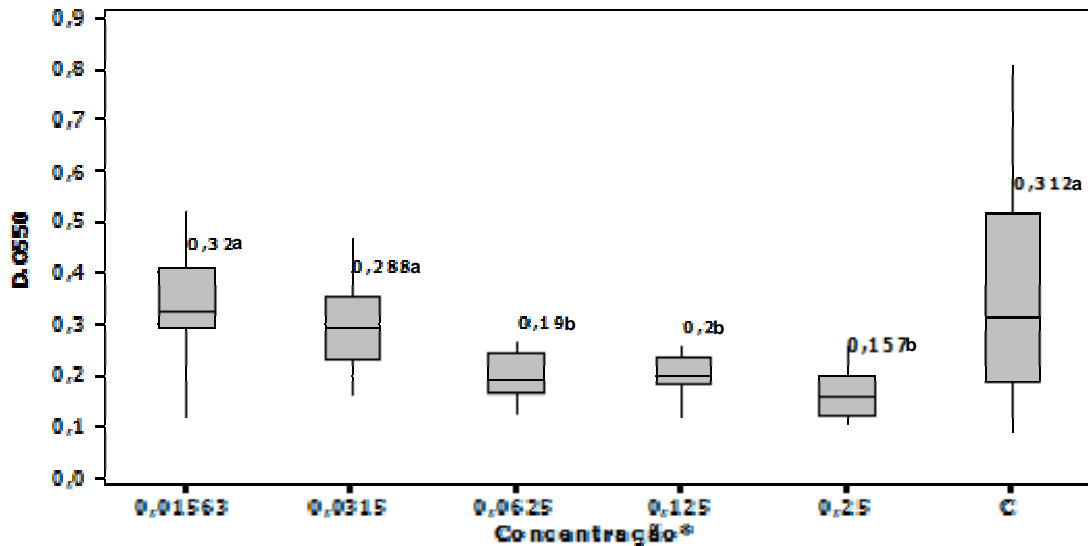
Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 5** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) testadas de gentamicina, comparadas com o controle (C).



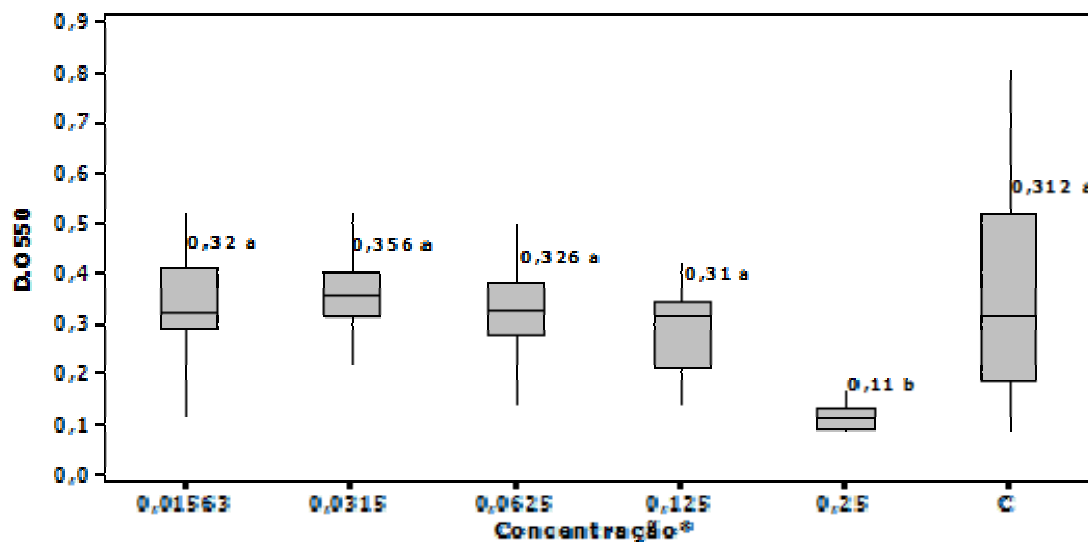
Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 6** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas diferentes concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) testadas de enrofloxacin, comparadas com o controle (C).



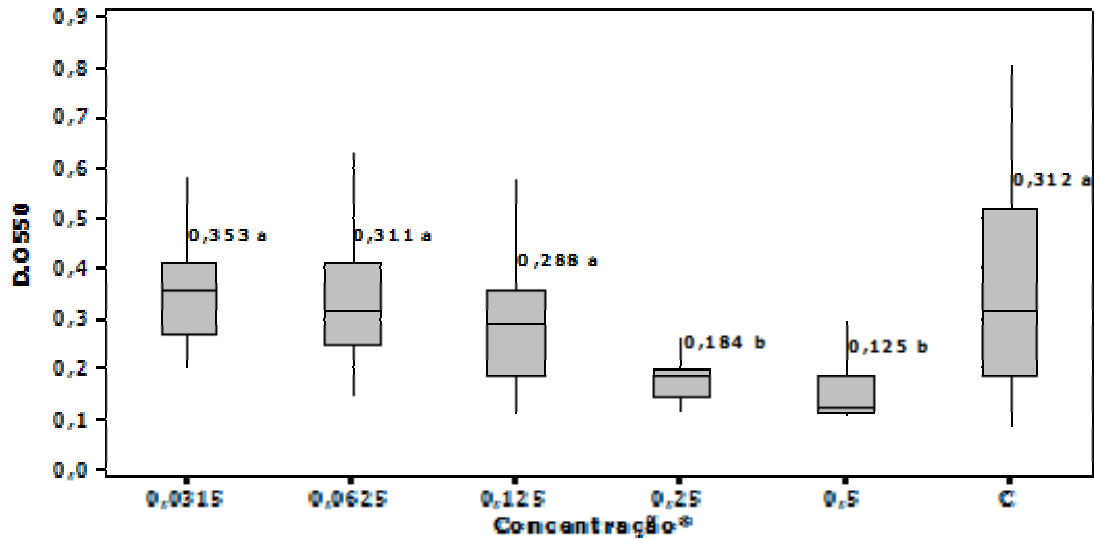
Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 7** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) testadas de cotrimoxazol, comparadas com o controle (C).



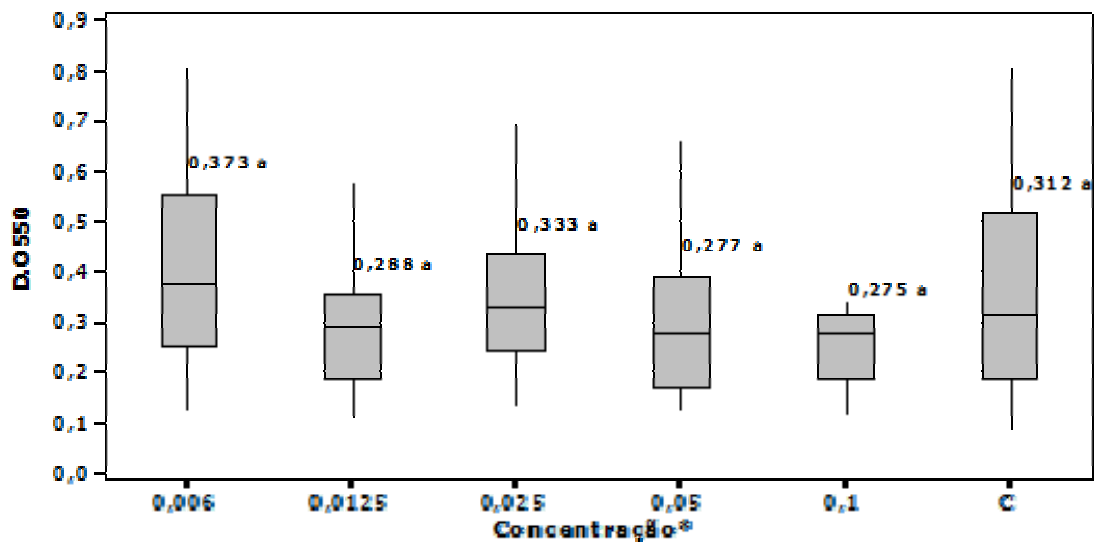
Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 8** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) testadas de cefotiofur, comparadas com o controle (C).



Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ .

**Figura 9** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) testadas de cefalexina comparadas com o controle (C).



Dados seguidos pela mesma letra não diferem em relação ao controle (C), pelo teste de Dunn, a 5% de significância ( $p > 0.05$ ). Letras diferentes indicam significância de  $p < 0,001$ . \*concentração em  $\mu\text{g/mL}$ .

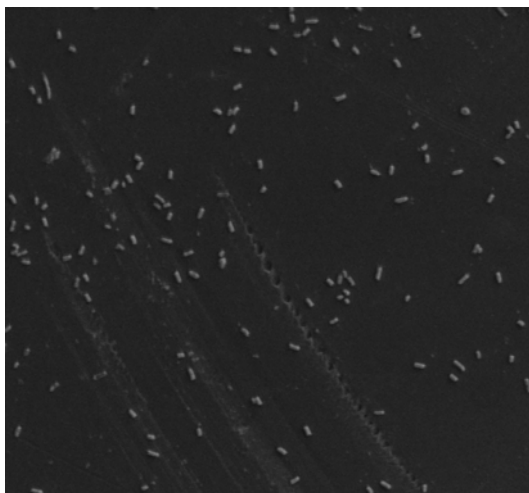
**Figura 10** - Produção de biofilmes (medianas da densidade ótica, D.O), nas cinco concentrações \*( $\mu\text{g/mL}$ ) usadas de ampicilina, comparadas com o controle(C).

## 5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

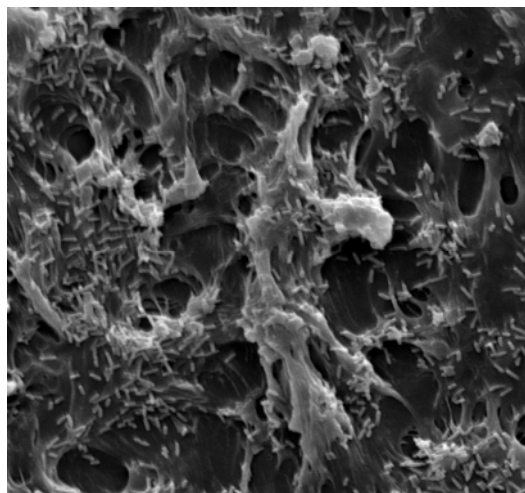
A análise de MEV identificou diferenças significativas entre as interações dos isolados de *E. coli* GPB e FPB com a superfície dos cupons, não se resumindo apenas na quantidade de células aderidas, mas também na produção de matriz extracelular. Para a análise, os isolados FPB foram cultivados em meio mínimo B1 (pH 5,5 e glicose 0,5%) e em caldo BHI com 0,5 µg/mL de cefalexina que representam condições que menos favoreceram a produção de biofilmes. Os isolados GPB foram cultivados em meio mínimo D2 (pH 6,5 e glicose 3%) e em caldo BHI com 0,0125 µg /mL de enrofloxacin que representam condições que mais favoreceram a produção de biofilmes. Todos os isolados testados para MEV foram também cultivado em caldo BHI puro para comparação.

As micrografias dos biofilmes formados pelos isolados FPB revelaram a presença de células aderidas à superfície, porém, em nenhuma delas demonstrou-se formação visível de matriz extracelular (Figuras 11, 13 e 14). Em relação aos isolados GPB, ao contrário, os biofilmes tiveram uma maior biomassa, sendo possível observar um número visualmente maior de células bacterianas aderidas e quantidades expressivas de estruturas complexas de aspecto fibroso e disforme, possivelmente fibras de EPS, envolvendo as células (Figuras 12, 15 e 16). A análise destas estruturas permite visualizar protuberâncias, camadas e canais que são característicos da arquitetura tridimensional dos biofilmes bacterianos (FLINT et al., 2011). Segundo Steinberger e Holden, (2004) a produção de matriz extracelular, varia em função da espécie bacteriana, do isolado e das condições de crescimento, incluindo a composição do meio, o teor de oxigênio, de carbono, a osmolaridade, o pH e a idade do biofilme. Em ambientes onde há condições estressantes para a célula bacteriana como baixa disponibilidade de carbono, oxigênio e pH ácido ou alcalino, a formação de matriz é estimulada (STEINBERGER e HOLDEN, 2004). Este fato pode explicar a visualização de matriz somente nos isolados GPB, visto que, além de terem a capacidade de produzir biofilmes com maiores biomassas, eles foram cultivados em condições de estresse, o que não ocorreu para os isolados FPB. Possivelmente a produção de matriz extracelular por isolados FPB, em quantidade mínima para

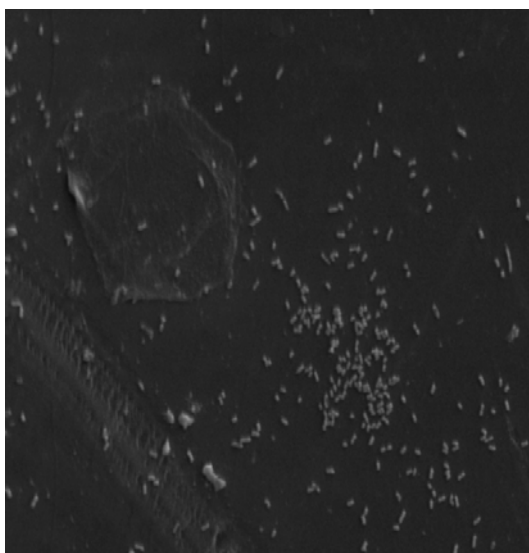
ser visualizada pela MEV, necessite de um maior tempo de incubação, proporcionando um ambiente propício para a sua formação, à medida que a concentração bacteriana e a produção de metabólitos aumentem causando mudanças no pH, na osmolaridade e na disponibilidade de nutrientes do meio.



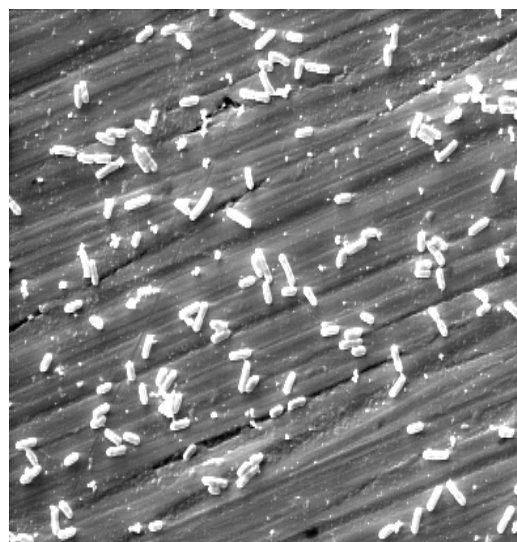
**Figura - 11.** Células aderidas (isolado 7, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI. Magnitude: 1300X



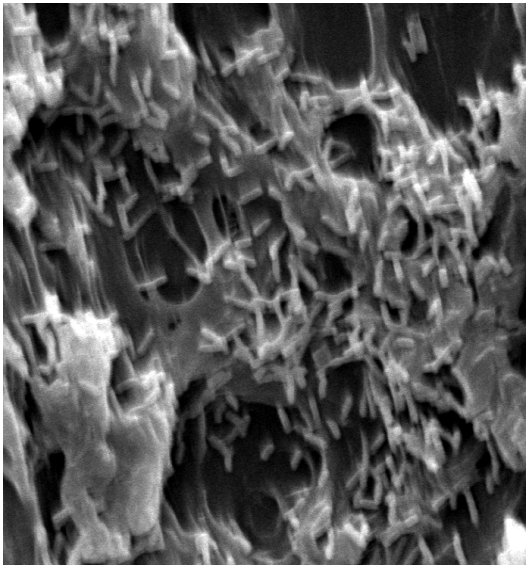
**Figura - 12.** Células aderidas (isolado 25, grande produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI. Magnitude: 1200X



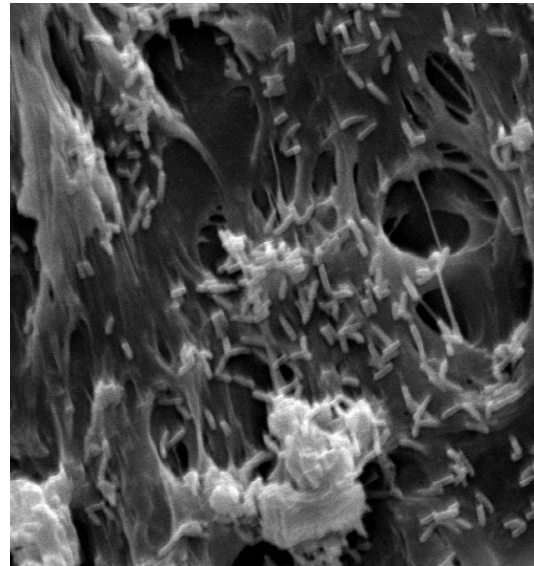
**Figura - 13.** Células aderidas (isolado 4, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em meio mínimo D2 (pH 6,5 e 3,5% de glicose). Magnitude: 1200X



**Figura - 14.** Células aderidas (isolado 12, fraco produtor de biofilmes) após 24 horas de incubação em caldo BHI com 0,5 µg/mL de cefalexina. Magnitude: 2300X



**Figura 15** - Produção de biofilmes por isolado 1, grande produtor de biofilmes após 24 horas de incubação em meio mínimo B1 (pH 5,5 e 0,5% de glicose). Magnitude: 1800X.



**Figura 16** - Produção de biofilmes por isolado 16, grande produtor de biofilmes após 24 horas de incubação em caldo BHI com 0,0125 µg /mL de enrofloxacina. Magnitude: 2300X.

Estes resultados estão de acordo com Chen et al. (2010) que verificaram uma grande produção de matriz extracelular em isolados de *E. coli*, grandes produtores de biofilmes sob a superfície de sílica gel de uso médico, fato que não foi verificado quando se utilizou isolados fracos produtores. Santos, (2009) trabalhando com isolados de *S. aureus* oriundos de leite armazenado em tanques de refrigeração, também encontrou resultados semelhantes aos obtidos pelo presente trabalho, sendo visualizadas apenas células aderidas para os isolados fracos produtores e células envoltas por intensa formação de EPS para os isolados grandes produtores após 24 horas de incubação.

Assim como constatado por Marques (2005) que avaliou a produção de biofilmes em superfícies de cupons de aço inoxidável, neste estudo também pôde ser observado pela MEV, que os cupons de poliestireno possuem algumas fendas ou ranhuras que, embora em menor número que nos cupons de aço, permitem às bactérias se alojarem e iniciarem sua multiplicação. Neste sentido, pode-se deduzir que a existência dessas irregularidades na superfície

dos cupons proporcionou a obtenção de um número considerável de células bacterianas aderidas, fato este que pode ter possibilitado a produção do biofilme por *E. coli*. Irregularidades também são encontradas na superfície do tecido da glândula mamária, muitas fazem parte da anatomia normal, entretanto com o desenvolvimento do processo infeccioso são produzidas fissuras e projeções de tecido inflamatório que possivelmente favorecem uma maior adesão bacteriana e conseqüentemente a produção de biofilmes (ANDREWS et al., 2008)

Marques (2005) cita que, para haver formação de biofilme sob qualquer superfície, a adesão bacteriana deve estar entre  $1,0 \times 10^6$  e  $1,0 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> de superfície, pois valores inferiores a estes poderiam ser indícios apenas de adesão fraca. Porém devido à forte ação mecânica proporcionada pelo procedimento de execução da MEV, dificilmente células aderidas por forças fracas, como as de van der Waals, hidrofóbicas e eletrostática seriam visualizadas (MARQUES. 2005)

Os resultados permitiram confirmar, por visualização, a capacidade de produção de biofilmes nas condições preestabelecidas, com diferenças esperadas quanto à biomassa, entre os isolados GPB e FPB. Além disso, devido à escassez de trabalhos avaliando a presença de biofilmes de *E. coli* por MEV na medicina veterinária, esses dados tem uma importante contribuição para a área, despertando o interesse para novos estudos.

## 6. CONCLUSÃO.

- A maioria das células planctônicas foi sensível aos antimicrobianos usados.
- Apenas quatro isolados foram classificados como resistentes aos antimicrobianos usados..
- As CMI dos antimicrobianos não foram eficientes na eliminação das células sésseis.
- Os valores de CMEB foram até 2500 vezes maiores que os valores obtidos de CMI.
- Os valores de CMEB foram maiores para os isolados grandes e moderados produtores de biofilmes em relação aos isolados fracos.
- A correlação entre os valores de CMI e CMEB foi fraca.
- A produção de biofilmes foi maior em isolados cultivados nos meios pobres em glicose e com pH mais distante da neutralidade em relação aos meios com pH mais próximo da neutralidade e com maior disponibilidade de glicose.
- Gentamicina (aminoglicosídeo), e enrofloxacin (quinolona) induziram a produção de biofilmes
- Primeiro relato do aumento da produção de biofilmes de *E. coli* de mastite clínica causado por concentração subinibitória de enrofloxacin.
- A arquitetura característica dos biofilmes foi visualizada por MEV, confirmando a presença de biofilmes

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDI-ALI, A.; MOHAMMADI-MEHR, M.; ALAEI, A.Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. ***International Journal of Antimicrobial Agents***, 27, 196-200, 2006.

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, p.913-917, 2009.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. Medicina bovina: doenças e criação de bovinos. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080 p.

ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R.; PINTO, C.C.F.; de FREITAS, A.L.P.; 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.

BAGGE, N.; SCHUSTER, M.; HENTZER, M.; CIOFU, O.; GIVSKOV, M., GREENBERG, E.P.; HØIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and {beta}-lactamase and alginate production. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, v.48, p.1175-1187, 2004.

BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. ***Journal of Dairy Research***, v. 72, p. 144–152, 2006.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H.E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; WALLER, K.P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. ***Veterinary Microbiology***, v. 136, p.142-149, 2009.

BETTELHEIM, K.A.; KUZEVSKI, R.A.; KRAUSE, D.O.; MCSWEENEY, C.S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. ***Journal of Applied Microbiology***, v.98, p.699-709, 2005.

BLUM, B.; HELLER, E.D.; KRIFUCKS, O.; SELA, S.; HAMMER-MUNTZ, O., LEITNER, G. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. ***Journal of Veterinary Microbiology***, v.132, p.135-148, 2008.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. ***Journal of Clinical Microbiology***, v.39, p.1845-1849, 2001.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. ***Veterinary Journal***, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. ***Journal of Dairy Science***, v. 92, p. 1941-1953, 2009.

BROMBACHER, E.; DOREL, C.; ZEHNDER, A.J.; LANDINI, P. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. ***Veterinary Microbiology***, v.149, p. 2847–2857, 2003.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. ***Veterinary Research***, v. 34, p. 521-564, 2003.

BURVENICH, C.; BANNERMAN, D.D.; LIPPOLIS, J.D.; cumulative physiological events influence the inflammatory response of bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. ***Journal of Dairy Science***, v.90, p.39-54, 2008.

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. ***Environmental Toxicology and Pharmacology***, v. 30, p. 5-10, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. **CLSI, Wayne, PA**. 2008.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; COCHRANE, C.A., PERCIVAL, S.L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. ***Veterinary Microbiology***, v. 121, p. 1-17, 2007.

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

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.

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

DOGAN, B.; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p. 27-282, 2006.

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

ERSKINE, R.J. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1111-1118, 2002.

FERNANDES, J.B.C. ; ZANARDO, L.G. ; GALVÃO, N.N. ; CARVALHO, I. A. ; Nero, L.A. ; MOREIRA, M. A. S. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2011. (in press).

FLINT, J.; PALMER, P.; BREMER, B.; SEALE, J.; BROOKS, D.; LINDSAY, S.B. BIOFILM FORMATION. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p.445-450, 2011.

FONTAINE, M.C.; SMITH, D.G. Microbial biofilms: does breaking the microbes community spirit hold the key to beating persistent mastitis? **Veterinary Journal**. v. 171, p. 387-388, 2006.

FRANK, K.L.; REICHERT, E.J.; PIPER, K.E.; PATEL, R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 51, p. 888-895, 2008.

GULER, L.; GUNDUZ, K. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from clinical bovine mastitis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 31, p. 361–365, 2007.

HILLERTON, J.E.; BERY, E.A. Treating mastitis in the cow—a tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1250-5, 2007.

HOFFMAN, L.R.; D'ARGENIO, D.A.; MACCOSS, M.J.; ZHANG, Z., JONES, R.A.; MILLAR, S.I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Letters Nature**, v. 436, p. 1171-1175, 2005.

HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, p.507-519, 2003.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J. Economic aspects of mastitis: New developments **New Zealand Veterinary Journal**, v.59, p.16-23, 2011.

HØIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 322-332, 2010

HUIJPS, K.; HOGEVEEN, H.; LAM, T.J.G.M.; HUIRNE, R.B.M. Preferences of cost factors for mastitis management among dairy farmers using adaptive conjoint analysis. ***Preventive Veterinary Medicine***, v. 92, p. 351-359, 2009.

KAMARK, A.; JARREL, L.M.; AUNE, M. Efficacy of antimicrobial agents against *in vitro* static biofilms. ***Acta Veterinaria Scandinavica***, v.39, p. 108-114, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. ***Nature Reviews Microbiology***, v.2, p.123-140, 2008.

LANDINI, P. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. ***Research in Microbiology***, v. 160, p.259-266, 2009.

LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. et al. Utilização da enrofloxacina (Baytril) no tratamento da mastite bovina. ***Ciência Rural***, v. 30, n. 1, p. 167-170, 2000.

LEHTOLAINEN, T.; SUOMINEN, S.; KUTILA, T.; et al. Effect of intramammary *Escherichia coli* Endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. ***Journal of Dairy Science***, v.86, p. 2327-2333, 2004.

LENNOX, J.E.; DOUTHRIGHT, J.; DELISLE, G. e EIDEMILLER, B. Biofilms Online Manual, 2009. Disponível em <http://www.asm.org/asm/division/W/resources/Lennox-Biofilm-09.pdf>. Último acesso abril de 2011. Último acesso abril de 2011.

LIPMAN, L. J. A.; De NIJS, A.; GAASTRA, W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 1-7, 1995.

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

MAKOVEC, J.A.; RUEGG, P. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8905 samples (1994-2001). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.222, p. 1582-9, 2003.

MARCHI, A.L.; BRUNETTI, V.; RIOTTI, M.C. SMITH, D. Influence of culture conditions in adhesion and biofilm formation by microorganisms isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 122, p. 421-426, 2008.

MARQUES, C. S., Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 68, p.337-348, 1971.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? Review. **The Veterinary Journal**, Janeiro, 2006.

MELCHIOR, M.B., FINK-GREMMELS, J., GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.141–149, 2007.

MICHU, E.; CERVINKOVA, D.; BABAK, V.; KYROVA, K.; JAGLIC, Z. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of *ica*-mediated biofilms. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 179-184, 2011.

MOREIRA, M.A.S.; OLIVEIRA, J.A.; TEIXEIRA, L.M.; MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p.75-81, 2005.

LI, M.Y.; ZHANG, J.; LU, P.; XU, J.L.; LI, S.P. Evaluation of Biological Characteristics of Bacteria Contributing to Biofilm Formation. **Pedosphere**, v.19, p. 554-561, 2009.

NASCIMENTO, T. e TAVEIRA, N. – Os biofilmes microbianos como agentes causais de doenças humanas. Instituto Superior da Saúde. Disponível em <http://www.egasmoniz.edu.pt/iscss/disciplinas/microbiologia/biofilmes.em.doenca.pdf>. Ultimo acesso em Abril de 2011.

NAVES, P.; PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M; RUIZ, V.; BLANCO, J; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M. C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 86-91, 2008.

NEU, T. R.; WOELFL, S.; LAWRENCE, J. R. Three-dimensional differentiation of photo-autotrophic biofilm constituents by multi-channel laser scanning microscopy. ***Journal of Microbiology Methods***, v. 56, p. 161-172, 2004

O'FERRALL-BERNDT M.M. A comparison of selected public health criteria in milk from milk-shops and from a national distributor. ***Journal of the South African Veterinary Association***, v. 74, p. 35-40, 2003

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. ***Veterinary Microbiology***, v. 124, n. 1-2, p. 187- 191, 2007.

OLIVER, S.P.; PIGHETTI, G.M.; ALMEIDA, R.A. MASTITIS PATHOGENS. Environmental Pathogens. 2<sup>a</sup> ed. Knoxville: Academic Press, 2011, 4170p.

PASSEY, S.; BRADLEY, A.; MELLOR, H. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. ***Veterinary Microbiology***, v.130, p.151-164, 2008.

PRIESTER, J.H.; HORST, A.M.; van der WERFHORST, L.C.; SALETA, J.L.; MERTES, L.A.K.; HOLDEN, P.A. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. ***Journal of Microbiological Methods***, v.68, p.577-587, 2007.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Veterinary medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10<sup>a</sup>.ed. London: Saunders, 2007. 2065p.

RANGEL, P.; MARIN, J.M. Analysis of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, 29, 363-368, 2009.

RIJAVEC, M.; MULLER-PREMRU, M.; ZAKOTNIK, B.; ZGUR-BERTOK, D. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. ***Journal of Medical Microbiology***, v. 57, p. 1329-1334, 2008.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, A.; PASCUAL, A. Actividad de los antimicrobianos en biocapas bacterianas. ***Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica***, v.26, p.107-114, 2008.

ROSSITO, P. V. et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. ***Journal of Dairy Science***, v.85, p132-138, 2002.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.314p.

SANTOS, S.S. Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite. 2009. 57f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

SCHWARTZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. ***International Journal of Antimicrobial Agents***, v.17, p.432-7, 2007.

SEPANDJ, F.; CERI H.; GIBB A. P.; READ R. R.; OLSON M. E. - Biofilm Infections in Peritoneal Dialysis - Related Peritonitis: Comparison of Standard MIC and MBEC in Evaluation of Antibiotic Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci – *Peritoneal Dialysis International*, Vol.23, pp 74-94, 2008.

SHAFABI, M., VAFAI, K. Synthesis of biofilm resistance characteristics against antibiotics. / *Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 53, p.2943-2950, 2011.

SMITH K, HUNTER L S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57, p. 966-973, 2008.

SOTO, S.M.; SMITHSON, A.; ,MARTINEZ, J.A.; HORCAJADA, J.P.; MENSA, J.; VILASOJUN, J.; Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *The Journal of Urology*, v.177, p.365-368, 2007.

STEENEVELD, W.; van WERVEN, T.; BARKEMA, H.W.; HOGEVEEN, H. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach . *Journal of Dairy Science*, v.94, p.174-188, 2011.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiolog*, v. 56, p. 187-209, 2002.

VANGROENWEGHE, F.; LAMOTE, I.; BURVENICH, C. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. *Animal Endocrinology*, v.29, p. 283-293, 2006.

VAN HOUDT, R.; MICHIELS, C.W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. ***Research in Microbiology***, v.156, p. 626-633, 2006.

WENZ, J.R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B. et al *Escherichia coli* Isolates Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. ***Journal of Dairy Science***, v.89, p.3408-3412, 2006.