

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME DE  
ISOLADOS DE *Leptospira spp.***

Dayane Olímpia Gomes

Médica Veterinária

**UBERLÂNDIA– MINAS GERAIS-BRASIL**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Estudo da produção de biofilme de isolados de *Leptospira spp.*

Dayane Olímpia Gomes

**Orientadora: Dra. Anna Monteiro Correia Lima**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária –Universidade Federal de Uberlândia, como parte da exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Clínica Médica e investigação etiológica).

Uberlândia - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G633e Gomes, Dayane Olímpia, 1983

2016 Estudo da produção de biofilme de isolados de *Leptospira spp* / Dayane Olímpia  
Gomes. - 2016.

62 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Leptospirose em animais - Teses. 3.  
Antibióticos - Teses. I. Lima, Anna Monteiro Correia. II. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

## AGRADECIMENTOS

Tudo que tenho e consegui ate ao momento da minha vida tenho convicção que devo em primeiro lugar á Deus. Além Dele, devo e tento agradecer a cada dia, uma pessoa que me proporciona amor, carinho, incentivo, força sem ela não chegaria ate aqui, minha mãe Gélia. Agradeço a todos meus familiares, que sempre me apoiaram e me ajudaram no que era preciso com muito carinho. Não somos ninguém, sem a família, com certeza é meu pilar. Ao meu esposo pelo apoio, companheirismo e amor nos momentos difíceis e alegres. Aos meus amigos do laboratório LADOC, que se tornaram para mim, minha segunda família. Vivi momentos maravilhosos junto com vocês, mesmo com dificuldades sempre firmes. Momentos que com certeza marcaram minhas melhores lembranças de vida e que vou levar comigo. Agradeço a minha Orientadora professora Anna, que como em uma família é como uma mãe para todos, agradeço por todo aprendizado científico e também pessoal, além de todas as ocasiões de superação, curtição que nos proporcionou. Agradeço a minha co-orientadora e amiga Laura, pela paciência, ajuda, disposição e dedicação. Uma amiga para todos os momentos. Para realização deste trabalho recebi o apoio de várias pessoas, que demonstraram o quanto devemos confiar em uma sociedade melhor, agradeço a todos pelo estímulo, auxilio em vários momentos determinantes do experimento. São eles: Mariane do laboratório de histologia da UFU, equipe do Laboratório de Bioquímica da UFU, a minha colega de laboratório Jaqueline que auxiliou na transferência de material. Agradeço ao professor Marcos Brian e a senhora Zenaide pela apoio com as cepas doadas, e pela colaboração e presença na minha banca de defesa.

## SUMÁRIO

Listas de abreviações, tabelas e figuras.....	5
Resumo .....	7
Abstract .....	8
CAPÍTULO I- NOÇÕES GERAIS .....	9
Introdução .....	10
Leptospirose- Etiologia e Conceito .....	11
Fatores epidemiológicos .....	14
Transmissão .....	14
Fatores de Virulência da bactéria.....	16
Diagnóstico .....	17
Controle e tratamento.....	18
Biofilme .....	19
Principais micro-organismos produtores de biofilme .....	23
Composição da matriz de biofilmes .....	26
Estudos de produção de biofilme por <i>Leptospira spp.</i> .....	27
Resistência antimicrobiana dos biofilmes .....	27
Método de avaliação e adesão a superfície .....	29
Referências .....	30
<b>CAPÍTULO II- Artigo .....</b>	<b>39</b>
Título , Resumo e palavras chaves .....	39
Introdução .....	40
Material e Métodos .....	41
Resultados .....	45
Discussão.....	47
Conclusão .....	51
Referências .....	51
Figuras e tabelas .....	60

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

LPS – lipopolissacarídeo

PCR – Reação em cadeia de polimerase

EMJH-Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

ELISA - Enzime Linked ImmunoSorbent Assay

SAM – Soroaglutinação microscopia em campo escuro

IGg- Imunoglobulina G

IGm – Imunoglobulina M

Mg – Miligramas

Kg – quilogramas

EPS-Exopolissacarídeos

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

L – Litro

ml – Mililitro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

$\mu\text{L}$ - Microlitros

% - Porcento

nm- nanômetro

## LISTA DE TABELAS

### **Capítulo I**

**Tabela 1.** Quadro 1 – Principais espécies e seus sorovares na leptospirose animal (Adaptado de acordo com Gomes, 2013).....13

### **Capítulo II**

**Tabela 1.** Resultados das médias de absorvâncias dos antibióticos doxiciclina, estreptomicina e penicilinas em relação as C1,C2,C3 e C4 no teste de concentração inibitória mínima .....60

**Tabela 2.** Resultados das médias de absorvâncias dos antibióticos doxiciclina, estreptomicina e penicilinas nas dosagens 0, 25, 50 e 100 mg /L após 12 horas de incubação no teste de concentração inibitória mínima das estirpes Canicola e Icterohaemorrhagiae/Conpenhageni.....61

**Tabela 3:** Resultados das médias de absorvâncias das doses 25,50 e 100mg/ L em relação as estirpes C1,C2,C3 e C4 no teste de concentração inibitória mínima das estirpes Canicola e Icterohaemorrhagiae/Conpenhageni.....61

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

**Figura 1.** Fotomicrografia *Leptospira spp* Fonte: ADLER e MOCTEZUMA, 2010.....11

**Figura 2.** Representação dos estágios de desenvolvimento de um biofilme microbiano. Fonte: VERMELHO et al., 2008.....22

### Capítulo II

**Figura 1.** Composição bioquímica da matriz extracelular por proteína e polissacarídeo de Estirpes de leptospira sorovar Canicola e Icterohaemorrhagiae/Conpenhageny testados por Kit BCA e método de ácido fenol sulfúrico:.....60

**Figuras 2.** Fotos obtidas por Método de Microscopia confocal para observação de biofilme das estirpes clínicos de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e Icterohaemorragiae/Conpenhageni em material de polipropileno.....62

## RESUMO

Leptospirose é uma zoonose causada por uma bactéria que sobrevive por muito tempo em condições ambientais adequadas. Biofilmes são agregações de micro-organismos, apresenta uma arquitetura definida, e fornece um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células, além de proporcionar proteção, resistência a temperatura e a antimicrobianos. Como ocorre com outras espiroquetas, a leptospira pode alterar a sua morfologia de acordo com as variações ambientais, e estas alterações incluem a formação de biofilmes. Porém são poucas pesquisas com biofilmes produzidos por *Leptospira* spp, principalmente de estirpes de quadros clínicos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a formação de biofilme por quatro estirpes clínicas de *Leptospira Interrogans* sorovares Icterohamorragiae e Canicola. Para avaliação de biofilmes *in vitro* e susceptibilidade antimicrobiana os seguintes testes: teste de adesão em placa de poliestireno, quantificação de proteína e polissacarídeo, teste para concentração inibitória mínima com três antimicrobianos e três doses diferentes. Para visualização do biofilmes formados foi realizada microscopia confocal a laser. No teste de adesão a placa, todos estirpes foram fortemente aderentes, caracterizados com maior quantidade de polissacarídeo do que proteína. Testes mostraram que estirpes patogênicas de *Leptospira* spp desta pesquisa formaram biofilme e, estes possuem alta resistência antimicrobiana para doses e antibióticos que são utilizados de forma rotineira na clinica de animais e humanos para doença.

**Palavras chaves:** Agregação celular, Antibióticos, Leptospirose

## ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by a bacterium that can live a long time in appropriate environmental conditions. Biofilms are aggregations of microorganisms, has a defined architecture, and provides an ideal environment for the exchange of genetic material between cells, beyond to providing protection, temperature resistance and antimicrobial. As it happens with other spirochetes, the leptospira can change their morphology according to environmental changes, and these changes include the formation of biofilms. However are few research with biofilms produced by *Leptospira* spp, especially on isolated from clinical frames. The aim of this study was evaluate biofilm formation by four clinical isolates of *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae e Canicola. For evaluation of biofilms *in vitro* and antimicrobial susceptibility, the following tests were performed: adhesion test on polystyrene plate, quantification of protein and polysaccharide, test for minimum inhibitory concentration with three antimicrobials drugs and three different doses. For visualization of the formed biofilm was performed confocal laser microscopy. In the adhesion test on polystyrene plate, all isolates were strongly adhered, characterized as having more polysaccharide than protein. In this research, tests shown that the isolated pathogenic of *Leptospira* spp has formed biofilm, and they possess antimicrobial resistance to high doses of antibiotics that are used routinely in animal and human clinical.

**Key words:** Cell aggregation, Antibiotics, Leptospirosis

## CAPITULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1. Introdução

Leptospirose é uma zoonose de importância global, causada pela infecção por espécies de leptospiras patogênicas (LEVETT et al, 2001). Podendo ser transmitida por qualquer animal, e pelos seres humanos.

Leptospiras colonizam os túbulos renais de animais carreadores. Muitos destes hospedeiros são assintomáticos e contaminam o meio ambiente através da urina. O homem é hospedeiro terminal da doença, e pode se contaminar pelo contato direto com animais infectados ou pelo contato com ambiente contaminado com a urina de animais carreadores (BHARTI et al., 2003; FAINE et al., 1999).

A maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre com as células individualizadas crescendo na forma planctônica (livre), e sim, com as bactérias sésseis, organizadas em biofilmes. Um biofilme consiste em um grupo de células bacterianas organizadas em diferentes graus de complexidade, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e cercadas por uma matriz de polímero orgânico, o exopolissacarídeo (EPS) (O'TOOLE et al., 2000; SAUER, 2003). A formação de biofilme por *Leptospira spp* pode desempenhar um papel importante na sua capacidade de sobreviver em diversos habitats ambientais, incluindo no hospedeiro (RISTOW et al, 2008)

Bactérias de importância médica que podem suportar respostas imunológicas do hospedeiro, e há evidências de que as bactérias que produzem biofilme são menos suscetíveis aos antibióticos e biocidas do que a sua planctônicos homólogos (ANDERSON;O'TOOLE,2008; HALLSTOODLEY; STOODLEY,2009). Na verdade, infecções com presença de biofilmes são de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos (OLSON et al, 2002; CERI et al., 2010).

Resaltando a importância de mais estudos sobre biofilme formado por leptospira para auxiliar na prevenção da doença e tratamento de casos

crônicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biofilme de estirpes clínicas de *Leptospira spp.*

## 2. Leptospirose

### 2.1 Etiologia e Conceito

O termo leptospirose deve ser usado para descrever as infecções por *Leptospira*, tanto em humanos quanto em animais (SHAMA; YADAV, 2008). Trata-se de uma doença de distribuição mundial, que constitui um sério problema de saúde pública, por apresentar ampla variedade de hospedeiros, incluindo o homem, grande número de mamíferos de vida livre, animais domésticos, anfíbios e répteis (MCBRIDEM *et al.*, 2005; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009), sendo assim, uma doença considerada de notificação obrigatória segunda a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2014) e de acordo com a Normativa nº 50 de 24 setembro de 2013, o Ministério de estado da agricultura, pecuária e abastecimento, declara doença de notificação obrigatória de qualquer espécie .

Em sua morfologia, as *Leptospiras* se caracterizam por serem organismos espiralados delgados com  $0,1 \mu\text{m} \times 6 \text{ a } 20 \mu\text{m}$ . São aeróbios restritos, Gram-negativos e móveis. As células típicas têm um gancho em cada extremidade que confere a elas a forma de S ou C (HIRSH e ZEE, 2003).

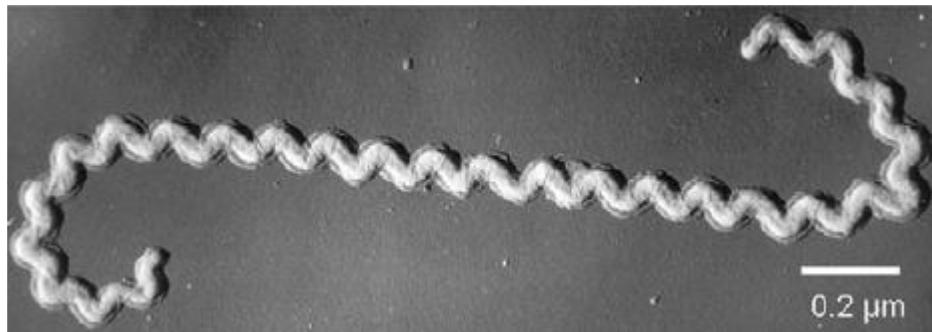


Figura 1. Fotomicrografia *Leptospira* spp

Fonte: ADLER e MOCTEZUMA, 2010

As leptospires são aeróbicas obrigatórias e sua multiplicação é ótima em temperatura (28-30°C) e ph compreendido entre 7,2- 7,4, sendo sensíveis ao ph ácido e dessecação (BRASIL, 1995). Apresentam membrana citoplasmática e parede celular envolta por uma membrana externa com dupla camada composta de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa, que em condições desfavoráveis de pH, temperatura e em ambientes secos resultam em uma desorganização deste envelope, com consequente destruição do agente (FAINE et al, 1999).

Em 1989, as leptospires, ordem Spirochaetales, estavam divididas em duas espécies, de acordo com critérios antigênicos: *Leptospira interrogans* da qual faziam parte todas as cepas patogênicas, e *Leptospira biflexa* contendo cepas saprófitas isoladas do ambiente (MINEIRO, 2007). A partir de 2007, no Equador, o Subcomitê de Taxonomia para *Leptospiraceae*, decidiu agrupar as espécies de acordo com seu genoma. Desta forma, atualmente, existem 13 patogênicas: *Leptospira alexanderi*, *Leptospira alstonii*, *Leptospira borgpetersenii*, *L. leptospira Inadai*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira fainei*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira licerasiae*, *Leptospira Noguchi*, *Leptospira santarosai*, *Leptospira terpstrae*, *Leptospira weilii*, *Leptospira wolffi*, com mais de 260 sorovares, tendo a possibilidade de outras espécies novas.

As espécies saprófitas incluem *Leptospira biflexa*, *Leptospira meyeri*, *Leptospira yanagawae*, *Leptospira kmetyi*, *Leptospira vanthielii* e *Leptospira wolbachii* e contém mais de 60 sorovares (ADLER e MOCTEZUMA, 2010).

A classificação do sorovar de *Leptospira* é baseada na expressão dos epítocos do lipopolissacarídeo (LPS) expostos em sua superfície. A membrana externa é composta por LPS estruturais e funcionais, sendo que uma grande proporção dessas proteínas são lipoproteínas como a LipL32, LipL21, LipL41 (ADLER ; MOCTEZUMA, 2010).

Quadro 1- Principais espécies e seus sorovares na leptospirose animal  
(Adaptado de acordo com Gomes, 2013)

	Espécie(s)	Sorotipo(s)	Hospedeiro primário
Bovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjo	bovinos
	<i>kirschnerii</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorragiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
Ovinos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
Caprinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorragiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
		Pomona	suínos
Suínos	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos
	<i>kirschneri</i>	Grippotyphosa	suínos
	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
	<i>interrogans</i>	Icterohaemorragiae	roedores
		Bratislava	suínos e equinos
Equinos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorragiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona / Pyrogenes / Casteloni	suínos
	<i>borgpetersenii</i>	Hardjo	bovinos
Caninos	<i>interrogans</i>	Canicola	caninos
Suínos	<i>interrogans</i>	Icterohaemorragiae	roedores
	<i>interrogans</i>	Pomona	suínos

## 2.2 Fatores epidemiológicos no Brasil

No Brasil, as investigações epidemiológicas efetuadas em animais domésticos e silvestres, em diferentes ecossistemas e estações do ano, tem apresentado resultados diversos e já possibilitaram o isolamento, em diversas ocasiões, de estirpes de leptospiras consideradas como sorovares autóctones de sorovariedades unicamente registradas no país (SILVA, 2015).

A doença é sazonal, com picos de incidência ocorrendo durante as estações chuvosas nos países de clima quente e no verão ou no outono em países de clima temperado (LEVETT, 2001). Segundo o Ministério da Saúde no Brasil, a leptospirose humana é uma doença endêmica, tornando-se epidêmica em períodos chuvosos, principalmente nas capitais e áreas metropolitanas, devido às enchentes associadas à aglomeração populacional de baixa renda, a condições inadequadas de saneamento e à alta infestação de roedores infectados (TASSANARI et al., 2004)

## 2.3 Transmissão

A *Leptospira* spp. pode ser transmitida a hospedeiros diretamente pela urina de animais infectados ou indiretamente por meio da água, solo, lama contaminada e fômites (SANTA ROSA et al., 1980; NEIBERGS e ZANELLA, 2010; LIMA, 2013). As vias de eliminação implicadas com a disseminação da leptospirose incluem urina, sêmen, produtos do abortamento e secreções vaginais (ELLIS et al., 1985, 1986). Animais selvagens como morcego e veado, animais domésticos como cães e gatos e de interesse econômico como bovinos, suínos e equinos compõem a lista de hospedeiros desta bactéria (KO et al., 2009)

Os cães, na zona urbana, podem adquirir a infecção pela convivência com outros cães infectados, bem como ratos que urinam em áreas comuns. São consideradas as principais fontes de infecção da

leptospirose humana, uma vez que podem eliminar as leptospiras vivas, por vários meses, sem apresentar sinais clínicos.

A persistência de focos de leptospirose se deve aos animais infectados, convalescentes e assintomáticos, que servem como fonte contínua de contaminação ambiental. Segundo Barwick et al. (1998), altos percentuais de animais positivos poderiam refletir o manejo higiênico-sanitário deficiente, pois uma das principais fontes de transmissão é a urina que contamina o pasto, a água e os alimentos. Além disso, outros fatores estariam associados à manutenção dessa doença no meio ambiente, como: a aquisição de animais infectados; espécies diferentes criadas em áreas comuns; acesso a fontes de água contaminadas (riachos, rios, alagamentos).

A transmissão da leptospirose depende das condições que favoreçam a sobrevivência do microrganismo no ambiente, do número de animais portadores na população e do período pelo qual o animal elimina a bactéria (HUNTER, 2004). Dentre esses fatores destacam aqueles que aumentam a viabilidade das bactérias no ambiente. Alguns estudos experimentais confirmam que as leptospiras podem ficar até 180 dias viáveis no ambiente com condições ideais de pH, umidade e proteção a raios solares (SANTOS, 2014).

## 2.4 Fatores de virulência da bactéria

O primeiro fator de virulência geneticamente descrito foi a lipoproteína de membrana externa, Loa22. Essa apresenta um motivo semelhante a OmpA e é expressa durante a infecção aguda. Loa22 é também altamente conservada entre as espécies patogênicas, reafirmando o seu papel na virulência. Contudo ainda não se sabe a sua função, além dessa apresentar um homólogo em *L. biflexa* (PICARDEAU et al., 2008).

Com o recente desenvolvimento de ferramentas moleculares para a manipulação genética das leptospiras, vários candidatos a fatores de virulência têm sido identificados. Destes, incluem moléculas de adesão, o LPS, proteínas de membrana externa e as hemolisinas. Essa adesão das leptospiras nos componentes dos tecidos do hospedeiro é o primeiro passo para o estabelecimento da infecção e patogênese da doença (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Na membrana externa, o LPS constitui o principal antígeno das leptospiras, que apesar de ser estruturalmente semelhante ao de outras bactérias Gram negativas, apresenta uma toxicidade 12 vezes menor para camundongos quando comparado ao LPS de *Escherichia coli*. A menor endotoxicidade do LPS das leptospiras pode ser atribuída a uma alteração na composição do lipídeo A, que possui uma unidade dissacarídica de glucosamida metilada e fosforilada. Esta característica única encontrada no LPS destas espiroquetas também contribui para uma atividade imune específica, com ativação do receptor Toll-like 2 (TLR2) ao invés do TLR4, o receptor clássico de LPS (HAAKE; MATSUNAGA, 2010)

O LPS é o determinante antigênico de leptospiras. Numa infecção por leptospiras o sistema imune direciona a produção de anticorpos principalmente contra o LPS (DE LA PENA-MOCTEZUMA et al., 1999; FAINE et al., 1999). O LPS é importante para estabilidade da membrana de enterobactérias e pode ser essencial tanto para a viabilidade de leptospiras e como para a letalidade delas.

As proteínas de membrana podem mediar o transporte de substâncias e cumprir papéis funcionais importantes na atuação de mecanismos de patogênese, papéis enzimáticos e facilitar a colonização renal. Adicionalmente estas proteínas podem ter papel na imunogenicidade durante a infecção (CULLEN et al., 2005). As lipoproteínas com maior abundância na superfície de *L. interrogans* são LipL32 (ou Hap1), OmpL1, LipL21 e Lip41 (CULLEN et al., 2005; HAAKE et al., 2000). A lipoproteína com maior número de cópias por célula é a LipL32, com mais de 38.000 cópias por célula (MALMSTRÖM et al., 2009)

As leptospiras são bactérias que dependem do ferro para crescer e se multiplicar, os sorovares patogênicos produzem hemolisinas que destroem eritrócitos, liberando na circulação uma grande quantidade do ferro complexado do grupo heme, já que este nutriente não é facilmente encontrado na forma livre no hospedeiro (LOUVEL et al., 2006). Logo, a capacidade de gerar hemólise parece ser essencial para a sobrevivência e para o sucesso reprodutivo das leptospiras patogênicas, não ocorrendo, no entanto, este processo nos sorovares saprófitas (CARVALHO et al., 2010).

## 2.5 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado à partir de amostras de sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou de tecidos durante a necropsia (MUSSO; LASCOLA, 2013). A leptospirose pode ser diagnosticada a partir de investigações clínicas e epidemiológicas, aliadas às provas laboratoriais (SHARMA; YADAV, 2008; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; MUSSO; LASCOLA, 2013; PICARDEAU, 2013).

A SAM (Soroaglutinação Micróscopia em Campo Escuro) há mais de um século é o diagnóstico mais utilizado, sendo o método de referência preconizado pela Organização Mundial de Saúde (FAINE et al., 1999; LEVETT, 2001; SHAMA; YADAV, 2008; CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009; MUSSO; LASCOLA, 2013). Geralmente, são utilizadas 24 estirpes representativas dos diversos sorogrupos de bactérias patogênicas existentes. Para isso, necessita-se da manutenção de coleções de bactérias vivas que contemplem esses sorogrupos. Consideram-se positivos os soros que tenham 50% de aglutinação em comparação ao controle negativo, onde não é aplicado soro (PICARDEAU, 2013).

O cultivo e isolamento bacteriano, e a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) detectam, respectivamente, a leptospira patogênica ou seu ácido nucleico. Ambos auxiliam na detecção da fase aguda da doença, quando ainda não são observados anticorpos específicos. Eles

também podem confirmar a infecção ativa em animais positivos aos testes sorológicos, mas com histórico de vacinação contra leptospirose (SYKES et al., 2011).

Para o cultivo de *Leptospira spp*, comumente, utiliza-se o meio semi-sólido de Fletcher ou o meio líquido de Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), enriquecidos com soro de coelho ou soro bovino (SHARMA; YADAV, 2008).

O método de ELISA (Enzime Linked ImmunoSorbent Assay) é um teste que possibilita a pesquisa de anticorpos das classes IgM e algumas vezes IgG (WHO, 2003). O teste apresenta alta sensibilidade durante a fase aguda da doença (a partir da primeira semana) (KEE, 1994), porém, os níveis de anticorpos não refletem o estado imune do animal (YAN et al., 1999).

## 2.6 Controle e tratamento

Os inquéritos sorológicos com determinação dos fatores de risco exercem um papel de relevância indiscutível no controle da leptospirose, pois permitem o conhecimento dos diferentes sorovares existentes em determinada região (FAINE et al., 1999), bem como as condições associadas à maior ocorrência da infecção, o que possibilita a elaboração de medidas de prevenção e controle e a aplicação das mesmas de maneira correta e eficaz (PIMENTA et al., 2014).

Além disso, são utilizadas bacterinas para proteger contra a doença, animais como cães, gatos ou gado, porém não evita a contínua excreção de leptospiras pela urina (KOIZUMI, WATANABE, 2005).

Para tratamento tem ampla variedade de drogas antimicrobianas que leptospira são sensíveis. Estudos *in vitro* comprovam alta sensibilidade à penicilina G, à ampicilina, à amoxilina, à eritromicina e às fluoroquinolonas. São relativamente resistentes àcefalotina, ao clorafenicol e às sulfonamidas. Dos diversos produtos ensaiados para tal fim, a

estreptomicina aplicada pela via parenteral, usualmente na concentração de 25 mg/kg de peso vivo, tem sido a medicação de escolha, embora algumas restrições tenham sido discutidas quanto à presença de resíduos deste antibiótico nos alimentos de origem animal (GUIMARÃES, et al., 1982/1983; ELLIS 2006; PRESCOTT , 2006)

Foi proposta uma associação entre penicilina e di-hidroestreptomicina, havendo, assim, um sinergismo entre as drogas. Enquanto a penicilina age na parede da leptospira, a di-hidroestreptomicina inativa a síntese proteica. No entanto, o uso de drogas que provocam a lise bacteriana deve ser cauteloso em virtude da liberação de endotoxinas na corrente sanguínea, com efeitos adversos para o hospedeiro (ELLIS, 2006; PRESCOTT, 2006).

Penicilinas e a doxiciclina são tradicionalmente os fármacos de escolha para o tratamento da leptospirose em humanos e cães. Baseado em dados, a realidade consensual recomenda o tratamento da leptospirose canina com doxiciclina na posologia de 5 mg/kg via oral (VO) ou intravenosa (IV) a cada 12 horas por duas semanas, porém a duração ideal do tratamento requer investigações adicionais (LIMA, 2013).

### **3. Biofilme**

Nos últimos anos, o número de doenças infecciosas crônicas aumentou significativamente. Tal fato despertou o interesse da comunidade científica em investigar as possíveis causas que levam à persistência de tais infecções. A microbiologia tradicional caracterizou durante anos as células encontradas em suspensões como planctônicas (WIDGEROW, 2008). Estas células foram exaustivamente avaliadas, isoladas e identificadas. Algumas das bactérias planctônicas estudadas têm a capacidade de aderir em várias superfícies, formando biofilmes.

As infecções bacterianas agudas, em que células planctônicas são capazes de causar doenças em humanos e animais por meio de ataques especializados, têm sido combatidas com vacinas e antibióticos (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX *et al.*, 2005; APARNA; YADAV, 2008).

Os micro-organismos evoluíram e desenvolveram uma estratégia de crescimento através da formação de biofilme. Tal fenômeno é impulsionado pelo princípio da sobrevivência, como mecanismo de adaptação ao stress ambiental. Sua estrutura evolui ao longo do tempo e permite a construção de uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX *et al.*, 2005; APARNA; YADAV, 2008).

O biofilme consiste de colônias de bactérias da mesma espécie ou não, inseridas em uma matriz polimérica extracelular produzida por elas (COSTERTON *et al.*, 1995). Essa estrutura estabelecida do biofilme compreende células microbianas e exopolissacarídeos (EPS), que apresenta uma arquitetura definida, e fornece um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células. A mesma constitui ainda como forma de proteção que permite ao microrganismo sobreviver em ambientes adversos.

Muitas teorias têm sido propostas com relação à dinâmica de formação de um biofilme, mas algumas etapas fundamentais são concordantes em todas elas, as principais são: contato, adesão, formação de microcolônias, maturação e desprendimento (figura 2), as mesmas são dependentes da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias (O'TOOLE *et al.*, 2000).

Os biofilmes, assim como outras comunidades, são formados gradualmente ao longo do tempo. Para esta formação, existe um ciclo composto geralmente por cinco estágios (APARNY; YADAV, 2008). No estágio I, ocorre a fase de fixação inicial à superfície, a qual pode levar apenas alguns segundos ou minutos para sua ativação. É provável que sua indução ocorra através de sinais ambientais, pela presença de nutrientes, temperatura, pH, concentração de oxigênio e ferro. Além disso, a síntese

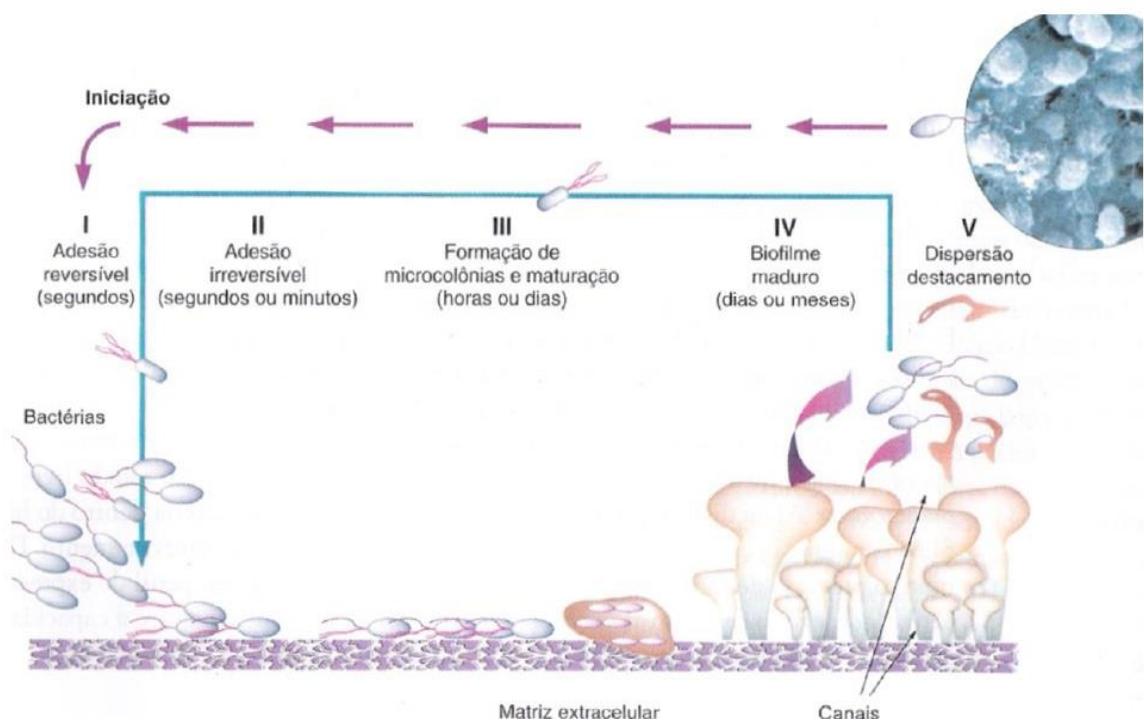
de adesinas, pili, polissacarídeos e a formação de agregados também podem influenciar o processo de fixação inicial a um substrato (CHMIELESWSKI ; FRANK, 2003; APARNA ; YADAV, 2008).

Após o primeiro estágio, as bactérias devem manter o contato com a superfície. Porém, para que desenvolvam um biofilme maduro, é necessário que a adesão se torne irreversível. Para tal, precisam se multiplicar e ancorar seus apêndices, o que caracteriza o estágio II. Depois da aderência irreversível à superfície, as bactérias emitem sinais químicos que auxiliam na comunicação entre as células bacterianas. Uma vez que a intensidade do sinal excede um determinado nível de limiar, os mecanismos genéticos subjacentes para produção de exopolissacarídeos são ativados (LACERDA, 2014).

O estágio III de desenvolvimento, também conhecido como maturação I, resulta na produção de matriz exopolimérica e consequente formação de microcolônias (STOODLEY *et al.*, 2002; APARNA; YADAV 2008). O estágio IV ou maturação II se inicia quando o biofilme alcança sua espessura final. Durante esta etapa, o biofilme adquire arquitetura complexa com canais e poros, formando uma estrutura tridimensional, a qual pode ser bem espessa e visível a olho nu. Assim, torna-se possível caracterizá-lo morfologicamente, observando-se propriedades como espessura, densidade e forma (STOODLEY *et al.*, 2002).

O estágio V caracteriza-se pela dispersão celular e fechamento do ciclo. A dispersão é o termo geralmente utilizado para descrever o destacamento de células (individuais ou em grupos) de um biofilme. O destacamento ativo é um evento fisiologicamente regulado e está relacionado com a transição para o fenótipo planctônico das células bacterianas que estão deixando o biofilme. Em geral, o último estágio começa vários dias após o estágio IV (ALLISON *et al.*, 1998; APARNA; YADAV, 2008). De acordo com figura abaixo.

**Figura 2.** Representação dos estágios de desenvolvimento de um biofilme microbiano. Fonte: VERMELHO et al., 2008



### 3.1 Principais micro-organismos formadores de biofilme

Dos micro-organismos frequentemente encontrados no biofilme, as bactérias apresentam-se como o grupo predominante. As elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares, são as principais características que fazem das bactérias organismos com grandes capacidades de produção de biofilme. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, são os gêneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilme ainda que umas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras.

Surtos provenientes da transferência de micro-organismos de biofilmes foram relatados para patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 (SIMÕES et al., 2010). O problema da formação de biofilmes nas indústrias de alimentos está correlacionado a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos de uso clínico vem sendo destacado (BRIDIER et al., 2015).

Dentre os micro-organismos psicrotróficos, espécies dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* são frequentemente isoladas de amostras de leite cru refrigerado por estarem disseminadas no ambiente. Estas se destacam pela produção de enzimas extracelulares termoestáveis, principalmente proteases e lipases, as quais contribuem significativamente para a redução da qualidade do leite e de produtos lácteos, mesmo após a aplicação de tratamentos térmicos (CARVALHO et al., 2006).

*Bacillus cereus* destaca-se pela produção de endosporos e por causar intoxicações de origem alimentar (PENG et al., 2001). Em uma planta comercial da indústria de laticínios, essa espécie representou mais do que 12% da microbiota constituinte dos biofilmes (SHARMA ; ANAND, 2002).

Os biofilmes também são uma ameaça à saúde pública quando presentes em alimentos não industrializados como brotos, vegetais frescos e frutos. Por vezes a contaminação ocorre durante o transporte e embalagem, mas também existem relatos de micro-organismos aderidos ou incorporados aos produtos íntegros (STEEACKERS et al., 2012; SREY et al., 2013). *Salmonela* por exemplo, pode contaminar frutas, legumes e verduras por meio de dejetos na água ou solo oriundos de fertilização com adubo animal contaminado ou más condições sanitárias e de tratamento de águas residuais (CORCORAN, 2013). E a partir desta contaminação inicial permanecer aderida aos alimentos na forma de biofilme.

Além disso, alguns autores têm observado maior prosperidade de biofilmes multiespecíficos, no caso da indústria de carne bovina formados

por *E. coli* O157:H7 e *Acinetobacter calcoaceticus* (HABIMANA et al., 2010). Esse comportamento é citado também para outros micro-organismos e decorre da coagregação, conjugação e proteção contra compostos com atividade antimicrobiana devido à reunião dos recursos bioquímicos e da própria organização espacial das diferentes espécies (STEWART; FRANKLIN, 2008).

Em relatos clínicos as bactérias formadoras de biofilme também estão presentes. Em infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa*, que comumente atinge pessoas com fibrose cística, é o protótipo de um biofilme de mucosa. As otites e rinossinusites crônicas, uretrite, cistite, vaginite, endocardites de válvulas nativas, placa dental, osteomielite, amigdalite, estomatite e dermatite são outros exemplos de doenças provocadas por biofilmes (BEZERRA et al., 2009; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008; POST et al., 2007).

*Borrelia burgdorferi*, uma bactéria da ordem das espiroquetas responsável pela doença de Lyme, foi descrito sua capacidade de formar biofilme in vitro. Esta formação pode desempenhar um papel importante em sua sobrevivência em diferentes condições ambientais, fornecendo refúgio para as células individuais (SAPI et al., 2012).

Vários estudos avaliaram a formação de biofilme em ambiente diversos e diferentes microorganismos.

Coquet et al. (2002) pesquisou ocorrência e caracterização fenotípica de *Yersinia ruckeri* cepas com capacidade formação de biofilme. Foi isolado principalmente de algas e amostras de sedimentos de água. Vinte e dois estírpes de *Y. ruckeri* foram obtidos, e três cepas foram distinguidos por enterobacteriano através do PCR. Estas estírpes foram capazes de aderir a suportes sólidos. Esta característica foi correlacionada com a motilidade mediada pelo flagelo.

Durante a última década, houve um interesse renovado na utilização de *Pseudomonas aeruginosa*, como um sistema modelo para o desenvolvimento do biofilme e patogênese. Ryder et al. (2007), estudou o papel de polissacáridos em *Pseudomonas aeruginosa* no desenvolvimento

de biofilme, sobre os papéis de alginato, polissacarídeos Psl, e Pel na matriz do biofilme. Varga et al. (2008) também pesquisou o desenvolvimento de biofilme com ênfase em *Arthrobacter sp.* Estirpe bacteriana Cr47 foi isolado a partir de amostra de solo. *Arthrobacter sp.* tiveram redução em reactores de biofilme de leito fixo alcançado comparáveis às de outros bio-reactores de filme fixo aeróbias e anaeróbias anteriormente relatado.

Labrie et al. (2010), examinou efeito das condições de crescimento na formação de biofilme por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, estirpes representando 5B e 11, foram capazes de formar biofilme in vitro. Neste estudo, comparou-se a formação de biofilme pela estirpe de referência de serotipo 1 de S4074 de *A. pleuropneumoniae* cultivadas em meios de cultura diferentes. Observou-se que a estirpe de *A. pleuropneumoniae* de S4074 é capaz de formar biofilmes após crescimento em uma das condições de cultura testados infusão de cérebro e coração. A microscopia confocal de varrimento laser, utilizando uma sonda fluorescente específico para o polissacárido de poli-N-acetilglucosamina (PGA) confirmou adicionalmente a formação de biofilme. Observou-se também a formação de biofilme em cepas de referência que representam sorotipos 3, 4, 5a, 12 e 14, bem como em 20 de campo fresco 37 estirpes testados.

### **3.2 Composição da matriz de biofilmes**

A composição da matriz extracelular é complexa e varia entre diferentes espécies bacterianas ou, mesmo, dentro da mesma espécie, sob diferentes condições ambientais. Apesar da heterogeneidade, o exopolissacarídeo é considerado componente essencial da matriz, assim como algumas proteínas de superfície que, por sua vez, têm sido relacionadas principalmente à adesão inicial das células microbianas à superfície (LASA; PENADÉS, 2006).

Os exopolissacarídeos produzidos por grande variedade de microrganismos são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes. A estrutura de muitos polissacarídeos de bactérias gram-negativas é relativamente simples, sendo formados de homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Este é normalmente composto de unidades repetidas e alinhadas de diferentes dissacarídeos até monossacarídeos e muitos contêm grupos acetila e piruvato (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

As proteínas presentes na matriz do biofilme são diversas e têm um papel importante no biofilme na formação e estabilidade. Pili e propriedades adesivas conferem fímbrias para bactérias, e vários genes relacionados com essas estruturas foram identificados como determinante para formação biofilme. Além disso, a presença de lectinas e outras proteínas de ligação de carboidratos na matriz facilitam as interações célula-matriz e célula-célula, por componentes de ligação de polissacarídeos as porções de carboidratos ou de matriz na superfície de outras células (KARATAN ; WATNICK, 2009).

### **3.3 Estudos sobre produção de biofilme por *Leptospira spp***

Sobre a formação de biofilme por *Leptospira spp* são poucos estudos confirmando esta característica. O primeiro relato do mundo foi descrito por RISTOW et al. (2008), cepas de *Leptospira borgpetersenii* e *Leptospira kirschneri* foram testadas em placas de poliestireno e em água, comprovando a formação de biofilme. A formação deste biofilme é consistente com a vida de estírpes saprófitas em água e pode ajudar a patogenicidade dessas estírpes de sobreviver em ambientes e de colonizar o hospedeiro.

BHIRUEGA et al. (2012) avaliaram a produção de biofilme de um isolado de *Leptospira interrogans* sorovar pomona *in vivo* e *in vitro* através de teste em placas de vidro e poliestireno, imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura, foi observado agregações bacteriana nas superfícies de vidro e plástico e também nos tecidos placentários das cobaias.

KUMAR et al. (2015) avaliaram a associação de estírpes de *Leptospira spp* com *Azospirillum brasiliense*, e avaliou a resistência a antibióticos como penicilina , tetraciclina e a luz ultravioleta. Mostrando que a associação pode levar a tolerância da leptospira no meio ambiente.

### **3.4 Resistência anti-microbiana dos biofilmes**

Bactérias em biofilme são intrinsecamente mais resistentes aos agentes antimicrobianos que bactérias planctônicas pela dificuldade de difusão dos mesmos (SUCI et al., 1994). A concentração de antimicrobiano necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é 100 a 1000 vezes maior que a necessária para eliminar as mesmas espécies em estado planctônico (PATEL, 2005; FRANK; PATEL, 2007; SHAFAHI; VAFAI, 2010; ANTUNES et al., 2011).

Em biofilmes com várias espécies, as espécies podem se beneficiar entre si por meio da troca de substrato e/ou remoção mútua de metabólitos. Este nível de estrutura organizacional e especialização metabólica justificam a marcante eficiência metabólica dos biofilmes e sua resistência inerente a agentes antimicrobianos (MAUKONEN et al., 2003).

Várias hipóteses sobre mecanismos que justifiquem um aumento da resistência em microrganismos formadores de biofilme são suscitadas: baixa penetração do antimicrobiano, inativação da droga por polímeros ou enzimas extracelulares, ineficiência da droga em decorrência da lenta taxa de crescimento bacteriano na maturação do biofilme pela limitação de nutrientes ou como resposta ao estresse iniciado com a formação do biofilme; e, finalmente, indução de variados fenótipos mais resistentes; alguns caracterizados por bomba de efluxo e alteração da composição da membrana proteica, outros induzidos não em resposta à limitação nutritiva, mas respondendo ao crescimento em biofilme (STOODLEY et al., 2004, AGARWAL, 2009, CERI; OLSON; TURNER, 2010; JACQUES et al., 2010).

Isso pode resultar na formação de "células persistentes", representantes de uma pequena subpopulação de bactérias (esporos e similares) que espontaneamente entram em um estado dormente. Características específicas do antimicrobiano como as propriedades hidrofóbicas, distribuição, tamanho e solubilidade em água também poderiam afetar a sua difusão pela matriz do biofilme (STOODLEY et al., 2004, AGARWAL, 2009, CERI; OLSON; TURNER, 2010, JACQUES et al., 2010).

Segundo Anwar et al. (1992), o estado fisiológico das células no biofilme é heterogêneo e é determinado pelo local onde cada célula se encontra nas múltiplas camadas celulares que formam o biofilme. Células mais próximas à superfície do biofilme encontram-se iam metabolicamente ativas e em tamanho normal, já que teriam fácil acesso a nutrientes, incluindo oxigênio, e teriam poucos problemas com produtos residuais de metabolismo celular.

Em contraste, células bacterianas localizadas no interior da matriz polissacarídica seriam metabolicamente menos ativas devido ao pobre acesso a esses nutrientes. Essas células também teriam problemas associados aos produtos residuais de metabolismo ao seu redor. Esse estado de dormência dificulta a ação dos antimicrobianos nas camadas mais profundas do biofilme (ANWAR et al., 1992)

#### **4. Métodos de avaliação e quantificação da adesão a superfícies**

Os métodos de avaliação de biofilmes podem ser visuais ou diretos, como a remoção das células (raspagem, ultrassom, vortex ou agitação com pérolas de vidro) seguida de contagem por métodos tradicionais (contagem padrão em placa); a microscopia de contraste de fase, que é usada para acompanhar em tempo real o desenvolvimento do biofilme em uma superfície transparente; a microscopia de epifluorescência, que é excelente para a quantificação das células aderidas às superfícies; a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a de transmissão (MET) que são as mais indicadas para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (ZOTTOLA et al., 2004).

Muitos estudos foram realizados com sucesso a quantificação indireta de biofilmes corando-os com cristal violeta e lendo a absorbância após ressolubilização do corante (STEPANOVIC et al., 2000), esta mesma metodologia é utilizada para determinar a capacidade do micro-organismo de se aderir a uma superfície, e quando for possível classificar a aderência em: não aderentes; fracamente aderentes; moderadamente aderentes; e fortemente aderentes.

Outras métodos para avaliação de bactérias formadoras de biofilme como: cultivos em ágar Vermelho Congo, onde são analisadas as reações das bactérias no meio de cultura, métodos dinâmicos nos quais empregam sistemas de crescimento do tipo *fed-batch*, desenvolvimento de biofilme em reatores capilares, reatores de fluxo celular, e outros reatores similares.

Além destes, existem testes com sistemas estáticos, onde o desenvolvimento do biofilme é feito sobre membranas de policarbonato, no sistema *BioFilm Ring Test* e pelos métodos em tubo e da placa de microtitulação de poliestireno (MTP) (SILVA FILHO, 2014).

Para *Leptospira spp* em decorrência da dificuldade de isolamento, e necessidade de cultivo em meios próprios, são poucas técnicas possíveis para identificação de cepas produtoras de biofilme .O agar vermelho congo que identifica colônias bactérias produtoras de biofilme não é possível a utilização, estirpes de *Leptospira spp* não desenvolvem.Ainda tem poucas técnicas apresentadas em estudos com estípulas de *Leptospira spp* como técnica em placa de poliestireno, avaliação em água e lâminas de vidro, microscopia de varredura e imunofluorescência direta foram os métodos apresentados.

## REFERENCIAS

- ADLERA, B.; MOCTEZUMA, A. P. *Leptospira*. In: GYLES, C.L;PRESCOTT J.F; SONGER G; THOEN C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Ames, IA: Wiley-Blackwell ,4.ed, p.527-548, 2010.
- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, Amita. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 147-160, 2010.
- ALEXANDER, M. Microbial communities and interactions: a prelude. In: HURST, C J. **Manual of environmental microbiology**. Washington: Ams Press, 1997. p. 5-13.
- ANDERSON, G. G.; O'TOOLE, G. A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms, **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 85–105, 2008.
- ANTUNES, A.L.S.; BONFANTI, J.W.; PEREZ, L.R.R. et al. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 51-55, 2011.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

APARNA, M.S.D.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.

BARWICK, R.S. et al. The prevalence of equine leptospirosis in New York State. **Journal Equine Science**, v. 4, n. 9, p. 119-124, 1998.

BOSSÉ, J. T. et al. Regulation of pga operon expression and biofilm formation in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by σE and H-NS. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2414-2423, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos. Manual de leptospirose, 2. ed. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 1995. 98 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **DOU, 01/03/2002**: Normativa nº 19 de 15 de Fevereiro de 2002. Normas para a certificação de granjas de reprodutores suídeos. Distrito Federal, Brasília, 2002.

BRIDIER, A. et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**, v. 45, p. 167–178, 2015.

BRIHUEGA, BIBIANA et al. In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina. **Rev. Argent. Microbiol**, v. 44, p. 138-143, 2012.

CARVALHO, A.F.; SILVA, I.D.; CARELI, R.T.; MORELLI, A.N.; ANDRADE, N.J. **Adesão de *Pseudomonas* spp. em tanques de estocagem de leite cru refrigerado granelizado na micro-região de Viçosa/MG**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2006, Goiânia. Anais do Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Goiânia: 2006. v. 1, p. 1-1.

CARVALHO, E. et al. Evaluation of the expression and protective potential of leptospiral sphingomyelinases. **Current Microbiol**, v. 60, n. 2, p.134-142, 2010.

CERI, H.; OLSON, ME.; TURNER, RJ. Needed, new paradigms in antibiotic development. **Expert Opinion in Pharmacotherapy**, v. 11, n. 8, p. 1233–1237, 2010.

CERQUEIRA, G.M.; PICARDEAU, M. A century of Leptospira strain typing. **Infection, Genetics and Evolution**, Montpellier, v. 9, n. 5, p. 760-768, 2009.

CHMIELESWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 22-30, 2003.

CORCORAN, M. **Salmonella enterica - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces**. 2013. 268f. PhD Tese-Volume 1. Escola de Medicina, National University Of Ireland Galway, Ireland Galway, 2013

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. In: **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5427–5433, 1999.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 2950- 2958, 2002.

DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Pathogenesis of mucosal biofilm infection: challenges and progress. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, n. 2, p. 201-208, 2008.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DOS SANTOS HIGINO, Severino Silvano; DE AZEVEDO, Sérgio Santos. Leptospirose em pequenos ruminantes: situação epidemiológica atual no Brasil. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v. 81, n. 1, p. 86-94, 2014.

ELLIS, W.A. et al. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. **Research in Veterinary Science**, v. 39, n. 3, p. 296-298, 1985

ELLIS, W.A.; CASSELLS, J.A.; DOYLE, J. Genital leptospirosis in bulls. **Veterinary Research**, v. 118, n. 12, p. 333, 1986.

ELLIS, W. A. Leptospirosis. In: STRAW, B. E et al. **Diseases of swine**. 9. ed. Ames: Blackwell, 2006.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2. ed. Medisci: Melbourne, 1999. 272p.

FUX, C.A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

FRANK, K.L.; PATEL, R. Activity of Sodium Metabisulfite against Planktonic and Biofilm *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, n. 4, p. 355-59, 2007.

GOMES, M.J.P. **Gênero Leptospira spp.** Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Rio grande do Sul (2013).

Guimarães MC, Côrtes JA, Vasconcellos AS, Ito FH. Epidemiologia e controle da leptospirose em bovinos: papel do portador e seu controle terapêutico. **Comun Cientia Fac Med Vet Zootec USP**, v.6/7, p.21-34, 1982/1983.

HABIMANA, O. et al. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4557–4559, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections, **Cellular Microbiology**, v.11, n.7, p.1034–1043, 2009.

HOOD,S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, n. 1, p.9-18, 1995.

IBARRA, C.; ESPINOZA, C.; CORNEJO,R.. Enfermedad de weil, presentación de un caso clínico. **Clínica y Ciencia**, v.1, n. 1, p.25-32, 2003.

IZANO, E.A; AMARANTE, M.A.; KHER, W. B.; KAPLAN, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, p. 470–476, 2008.

JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y.D.N. Biofilm pathogens of veterinary importance. **Animal Health Research Reviews**, v.11, n.2, p. 97-121, 2010.

JAIN, A.; AGARWA, L.A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n.1, p. 88–92, 2009.

Karatan E & Watnick P (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 73: 310-347, 2009.

KO, A.L.; GOARANT, C.; PICADEAU, M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.10, p.736-747, 2009.

KOIZUMI ,N.; WATANABE, H. Leptospirosis vaccines: past, present, and future, **Postgraduate Medical Journal**, v .51, n.3, p.210-214, 2005.

KROPEC, A; MAIRA-LITRAN, T; JEFFERSON, K.K; GROUT, M; CRAMTON, S.E; GÖTZ, F; GOLDMANN, D.A; PIER, G.B. Poly-N-acetylglucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 6868-6876, 2005.

KUMAR, K. Vinod et al. Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with Azospirillum. **FEMS microbiology ecology**, p. 051, 2015.

LACERDA, Géisica Lugão; GOMES, Débora Leandro Rama. BIOFILMES MICROBIANOS E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS. **Base de Trabalhos de Conclusão de Curso-IFRJ-Campus Realengo**, v. 1, n. 1, 2014.

LANGONI, L. Leptospirose: aspectos de saúde animal e de saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV**, v.2, n.1, p.52-58, 1999.

LASA,I.; PENADÉS, J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99-107, 2006.

LIMA, E.V. **Leptospirose canina: revisão bibliográfica**. 2013. 40f. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013

LOUVEL, H. S. et al. Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7893-7904,2006.

MAUKONEN,J. et al . **The Journal of Industrial microbiology and Biotechnology**. 30.ed, 2003, 327p.

MINEIRO, A. L. B. et al. Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. **Arquivos brasileiro medicina veterinária zootecnia** v. 59, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

MUSSO, D.; LASCOLA, B. Diagnostic biologique de la leptospirose. **Revue Francophone des Laboratoires**, França n. 449, p.39-46, 2013.

NEIBERGS, H.; ZANELLA, R. Leptospirosis in swine. In: JIANG, Z; OTT, Tl. **Reproductive genomics in domestic animals**. Wiley-blackwell: Ames, 2010. p. 108-110.

OLIVEIR, S.J.;PIRES, N.J. Aspectos etiológicos e de diagnóstico nas leptospiroses.**Revista CFMV**. v.10, n.33, p.36-46, 2004.

OLSON, M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 86–92, 2002.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, 207-228, 2008.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 1, p. 77-83, 2004.

PAULA, E.V. Leptospirose Humana: uma análise climato-geográfica de sua manifestação no Brasil, Paraná e Curitiba. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 12, 2005, Goiânia. **Anais XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO**, Goiânia: INPE, 2005. p. 2301 - 2308.

PATEL, R. Biofilms and Antimicrobial Resistance. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 437, p. 41-47, 2005.

PRESCOTT, J. F. Antimicrobial therapy of selected bacterial infections. In: GIGUERE, S. et al. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**. 4.ed. Blackwell: Ames, 2006. p. 388.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, Paris, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PIMENTA, Carla LRM et al. Leptospirose bovina no Estado da Paraíba: prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 332-336, 2014.

RISTOW, P. et al. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1309-1317, 2008.

RYDER, Cynthia; BYRD, Matthew; WOZNIAK, Daniel J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 644-648, 2007.

SANTA ROSA, C.A. et al. Leptospirosis in wildlife in brazil: isolation of sorovars canicola, pyrogenes, and grippotyphosa. **International Journal of Zoonoses**, v. 7,n.1, p.40-43, 1980.

SANTOS, Cleiton Silva et al. **O papel do óxido nítrico na patogênese da leptospirose experimental em hamsters e camundongos**. 2014. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

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

SHARMA, M.; YADAV, A. Leptospirosis: Epidemiology, Diagnosis, and Control. **Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents**, Bangkok, v. 25, n. 2, p. 93- 103, 2008

SILVA, F.J. et. al. Pesquisa de leptospiras e de anticorpos contra leptospiras em animais e humanos de propriedades rurais nos biomas brasileiros Pantanal e Caatinga, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 234-248, 2015.

SILVA FILHO, R. G. **Produção de biofilme em amostras clínicas de S. epidermidis: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência**. 2014. 154 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science Technology**, v. 43, n. 4, p. 573- 583, 2010.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n.4, p. 331-340, out./dez. 2004.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 572–585, 2013.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 502–531, 2012.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**. v. 40, n.2, p. 175-179, 2000.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 199–210, 2008.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SUCI, P. A. et al. Investigation of Ciprofloxacin Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 9, p. 2125-2133, 1994.

SYKES, J. E. et al. Small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, United Kingdom, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.

TASSINARI, W. S. et al.. Distribuição espacial da Leptospirose no Município do Rio de Janeiro, Brasil ao longo dos anos de 1996-1999. **Cadernos de Saúde Pública** 2004; 20(6): 1721-1729.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1110–1116, 2002.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WIDGERO, S. Chronic Wounds: Persistence of the chronic wound – implicating biofilm, **Wound Healing Southern Africa**, v. 1,n. 2, p. 5-9, 2008.

## Capítulo II: Normas de acordo revista Journal of Bacteriology

### Produção de biofilme e susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Leptospira spp*

#### Resumo

A Leptospirose é uma zoonose de ocorrência endêmica no Brasil, acomete muitas espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos. A leptospira pode colonizar os túbulos renais de hospedeiros por muito tempo, e acredita-se que a formação de biofilme seja um fator importante para manutenção da leptospira nos animais e ambiente. Com isso o objetivo desta pesquisa foi verificar a capacidade de formação e resistência antimicrobiana de biofilmes produzidos por quatro estirpes de *Leptospira interrogans*, isoladas de cães e bovinos. Estas foram testadas quanto a aderência em placa de poliestireno, composição da matriz extracelular, concentração inibitória mínima para penicilina, doxiciclina e estreptomicina, em três dosagens diferentes, e além disso microscopia confocal para confirmar a aderência dos biofilmes. Todas as estirpes foram classificadas com aderência forte em microplaca, o que confirmou a formação de biofilmes. A concentração de proteína foi maior do que de polissacarídeo na matriz do biofilme. As agregações formadas tiveram alta resistência aos antibióticos. As leptospiras agregadas em matriz extracelular foram resistentes a doses e antibióticos rotineiros na clínica de pequenos e grandes animais para leptospirose.

**Palavras chaves:** antibióticos, *Leptospira interrogans*, matriz extracelular.

## Introdução

Leptospirose é uma zoonose que pode ser transmitida por todos os animais domésticos e silvestres, e também pelo homem. O agente etiológico é *Leptospira spp*, uma espiroqueta, que em condições ideais sobrevive por vários dias em ambiente, de acordo com pH, temperatura e umidade. Os animais infectados podem albergar a bactéria nos rins, e eliminar este agente através da urina. Podendo transmitir para outros animais, humanos e contaminar o ambiente.

A formação de biofilme é caracterizada pela expressão de uma matriz extracelular, que tem função estrutural e fisiológica. A matriz do biofilme serve para proporcionar a estrutura e proteção para as células do biofilme (1,2) . Esta pode servir como uma barreira para agentes antibióticos , no qual estes compostos são ligados ou consumidos pelos componentes da matriz. No entanto, este atributo varia de acordo com a matriz, do agente antimicrobiano e da idade do biofilme (3).

Embora possam existir diferenças na formação de biofilme mesmo dentro de uma única cepa cultivada sob diferentes condições ambientais, a estrutura e composição da matriz extracelular segue princípios comuns (4). Tipicamente, um biofilme é composto de amiloide, fímbrias adesivas, proteínas de superfície, exopolissacarídeo, e DNA extracelular (5,6).

Biofilmes têm se mostrado uma das maiores causas de contaminação cruzada dos produtos alimentícios e de transmissão de doenças (7,8). Dentre todos os micro-organismos, são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilme, ainda queumas apresentem, naturalmente, maior aptidão que outras. Os seus reduzidos tamanhos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação, de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio

circundante, são as principais características que fazem das bactérias excelentes organismos produtores de biofilmes (9). *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* são alguns dos gêneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilmes (10).

A leptospira pode alterar a sua morfologia de acordo com as variações ambientais, e estas alterações incluem agregação celular (11) e formação de biofilmes (12). A formação de biofilme por *Leptospira spp* pode desempenhar um papel importante na sua capacidade de sobreviver em diversos habitats ambientais, incluindo no hospedeiro (12).

Como são bactérias de alta patogenicidade, e ainda tem poucos estudos sobre biofilmes de leptospiras, objetivou-se verificar a capacidade de formação de biofilme de estirpes de *Leptospira spp* isoladas de cães e bovinos infectados, além disso avaliar a resistência aos antibióticos testados .

## **Material e métodos**

As estirpes foram cedidas pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Universidade de São Paulo (USP). Foram utilizadas duas estirpes de bovinos e duas de cães de cultura de rim mantidas em meios Ellinghausen-McCullough(EMJH) (DIFCO) e semi-sólido FLETCHER (HIMEDIA) por 28ºC.

As estirpes foram tipificadas pela OMS / FAO / OIE e Nacional Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre Leptospirose (Kit Biomedical Research, Amsterdã, Holanda). As estirpes foram classificadas no nível de sorotipo efetuando MAT com painéis de anticorpos monoclonais,como descrito (13) e (14). A

eletroforese em gel de campo pulsado como descrito por (15) do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos.

As estirpes foram identificadas como: estirpe nº1: M5/90 1990 *Leptospira interrogans* sorovar Icterohamorragie/ Conpenhageni de cão, estirpe nº2: L06 2001 *Leptospira interrogans* sorovar *Canicola* de cão, estirpe nº3: L014 2001 *Leptospira interrogans* sorovar *Canicola* e estirpe nº4: L010 2001 *Leptospira interrogans* sorovar Icterohamorragie/ Conpenhageni de bovinos.

Todos testes foram realizados em triplicata com três repetições sendo que para avaliação da formação de biofime e susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* foram utilizadas as seguintes técnicas.

### **Teste de aderência em placa**

O teste de aderência em placas foi realizado como descrito (16) com poucas alterações descritas abaixo.

As bactérias foram cultivas individualmente, em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de soro de coelho durante sete dias. Em seguida, a suspensão foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços com fundo plano, na proporção de 1:200 em meio EMJH e incubadas por 24 horas a 28 °C, com renovação do meio após 12 horas. Os poços foram lavados três vezes com PBS (10mM,ph 7,4) estéril, e após incubadas a placas na estufa com temperatura de 60 °C por 30 minutos para secagem. Adicionou-se 200µL de cristal violeta 1% por cinco minutos. Em seguida as placas foram lavadas com água destilada, após toda retirada acrescentou se 200µL de ácido acético (Isofar) a 33% para que fosse procedida a leitura a 570 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go). Poços não inoculados contendo EMJH

serviram como branco. Considerou-se bactérias produtoras de biofilme estirpes com absorbância maior que 0,1. Cada estirpe foi testada em triplicada, três vezes (17). A intensidade da produção de slime foi escalonada da seguinte forma: forte ( maior que 0,3), moderada ( $>0,2$  e  $< 0,3$ ) e fraca ( $>0,1$  e  $< 0,2$ ) (18).

## **Quantificação de proteínas extracelulares e polissacarídeos**

### **1. Quantificação das proteínas da matriz (Kit BCA)**

Para quantificação de proteínas e polissacarídeos foi realizado um pool de amostras raspadas diluídas em salina esteril 0,85% para alcançar a quantidade ideal para realização dos testes.

Adicionou-se 12,5 $\mu$ L da amostra raspada diluída na mesma proporção com salina estéril em uma microplaca de 96 poços. Isso feito acrescentou-se 200 $\mu$ L dos reagentes misturados do kit BCA (Sigma), homogeneizou-se por 30 segundos e foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi utilizada a leitura em 562 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e um tampão fosfato como branco, demonstrado (19) com adaptações para bactéria leptospira.

### **2. Quantificação dos polissacarídeos – método do ácido fenol sulfúrico**

Para determinação do conteúdo em polissacarídeos foi adicionou-se 0,5 mL da amostra raspada em um tubo; 0,5 mL de fenol (50g/L - Dinâmica) e logo em seguida 2,5 mL de ácido sulfúrico (95-97% - Isofar). Homogeneizou-se a solução e foi colocada para reagir por 15 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizado a

490 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) e um tampão fosfato com branco (20). Para análise estatística comparativa das estirpes nos teste de quantificação de polissacarideos e proteinas das matrizes foi feita a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey.

### **Concentração mínima inibitória em biofilmes**

O volume 25 $\mu$ L da cultura bacteriana em meio EMJH incubado a 30°C durante sete dias foi adicionado a 175 $\mu$ L de EMJH suplementado com 10% de soro de coelho, em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços em fundo plano. As microplacas foram incubadas para formação de biofilmes por 24 horas a 28°C em aerobiose, com o meio renovado após 12 horas de cultivo. Os poços foram lavados três vezes com 200 $\mu$ L de solução tampão fosfato (PBS) para remover as bactérias que não aderiram .

Depois foi adicionado 200 $\mu$ L da diluição de antibióticos doxiciclina, estreptomicina e penicilina em EMJH nas concentrações de 25mg/L, 50mg/L e 100mg/L, distribuidas cada em uma placa por um período de 12 horas . Em seguida as placas foram lavadas e procedida a leitura a 570 nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go) como descrito (21) com adaptações para leptospira. Para análise estatística dos resultados foi feita a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de comparação de média Scott- Knott (22).

### **Miscroscopia confocal**

A análise em microscopia foi realizada com as quatro estirpes de *Leptospira interrogans*, incubadas com o material de polipropileno testados em placa estéril com

8 poços em fundo plano em 1:200 no EMJH a 28ºC durante 24 horas, com renovação do meio após 12 horas como mencionado (23) com alterações .

No Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) os materiais foram lavados com tampão fosfato estéril e corados com iodeto de propídio, na leitura utilizou se Microscópio Confocal a Laser (Zeiss 710), com uma excitação a laser (488nm) e filtros de emissão 580-680 nm para iodeto de propídio (marcação em vermelho).

## **Resultados**

As quatro estirpes testadas foram identificadas como produtoras de biofilme pelo teste de aderência em microplaca, e classificadas como forte por produzirem uma biomassa maior que 0,3 de absorbância.

Na análise de composição da matriz dos biofilmes formados foi identificada uma maior concentração de proteína do que de polissacarídeo, conforme a figura 1. Na análise de comparação das estirpes não apresentaram diferença estatística em relação a quantidade de polissacarídeos nas matrizes dos biofilmes,e na análise de proteína a cepa 4 apresentou diferença significativa ( $p\text{-valor}>0,5$ ).

Houve redução da biomassa ao utilizar os antibióticos doxiciclina, penicilina e estreptomicina nas três dosagens testadas. Porém, mesmo após o contato com os antibióticos, as estirpes mantiveram a produção de biofilme microbiano na placa de poliestireno. Lembrando que estes antibióticos são usados rotineiramente em casos clínicos da doença.

Nas analises dos testes realizados com os antibióticos, os fatores antibióticos e cepas, verificou-se que todos os antibióticos para as estirpes1, 2 e 3 não

apresentaram diferença significativa entre as médias das absorvâncias. Entretanto para estreptomicina e penicilina a cepa 4 apresentou valores de absorvâncias que não diferiram entre si, porém foram significativamente inferiores aos valores de doxiciclina ( $p\text{-valor}>0,5$ ), pode se observar na Tabela 1.

Considerando a relação entre antibiótico e dose tem-se que para a dose controle as estirpes não diferiram entre si ( $p\text{-valor}>0,5$ ). Pois após a formação dos biofilmes, as estirpes clínicas obtiveram médias próximas de absorvância na dose controle .

Para a dose 25 mg/L dos antibióticos doxiciclina e estreptomicina as estirpes testadas não diferiram, porém apresentaram médias de absorvâncias superiores somente a penicilina ( $p\text{-valor}>0,5$ ). Para dose 50 mg/L dos antibióticos testados as estipes não apresentaram diferença significativa ( $p\text{-valor} > 0,5$ ) (Tabela 2).

As estirpes não diferiram entre si para a dose 100mg/L, entre os antibioticos doxiciclina e estreptomicina e apresentaram média de absorvância inferior a penicilina. No estudo do comportamento das doses para cada antibiótico, verifica-se que: para doxiciclina e estreptomicina doses 25mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L as médias das absorbâncias dos estirpes não diferiram entre si e foram inferiores a dose controle. Para as doses de penicilina todas estirpes diferiram entre si sendo a dose controle a maior média de absorvância seguida respectivamente, da dose 100, dose 50 e dose 25 mg/L ( $p\text{-valor}>0,5$ ). Resultados podem ser verificados na Tabela 3.

Contudo melhor resultado foi a dose de 25 mg/L e o antibiótico penicilina foram que obtiveram melhores ações de inibição de produção de biofilmes das estirpes de

leptospira, com menores valores de absorvância e assim melhores absorções das matrizes, após 12 horas de incubação

Na avaliação com a técnica de microscopia confocal, imagens demonstraram a aderência das estirpes de *Leptospira spp* ao material polipropileno após lavagens, observado na Figura 2.

## Discussão

As quatro estirpes foram fortemente aderentes as placas após um dia de incubação, estudo anterior difere no qual duas estirpes de *Leptospira spp*, uma saprófita e outra patogênica foram testadas em placas de polipropileno de 12 poços, lavadas, e coradas com cristal violeta, com leitura de 600 nm, após dois dias de incubação, as estirpes apresentaram ligeira adesão (12).

Estudo recente, testaram 21 estirpes de *Leptospira spp*, utilizando placas de poliestireno de 96 poços, com período de leitura de 48 horas e 600 nm. O resultado obtido foi aderência de oito estirpes *in vitro* (24). Os resultados foram próximos desta pesquisa, com quatro estirpes aderentes em placas de poliestireno com período de leitura 24 horas e 570 nm.

O exopolissacarídeo (EPS) possui diversas funções, como conferir a insolubilidade em água, dar conformação tridimensional do biofilme, proteger as células contra estresses de ordem física (ação mecânica, irradiações e variações de temperatura), química (agentes químicos utilizados nos procedimentos de higiene industrial) e biológica (competidores e predadores), além da importância do EPS na questão de aporte de nutrientes (25,26). Nesse sentido, mesmo representando

grandes ônus à célula, em função da energia demandada em sua síntese, o EPS traz indiscutíveis benefícios à sobrevivência dos microrganismos (27,28). Por isso, a caracterização da matriz do biofilme torna importante para compreensão da patogenicidade da estirpes.

As caracterizações das matrizes dos biofilmes apresentaram maior quantidade de proteína do que de polissacarídeo. De modo geral, os biofilmes compostos de proteínas apresentam propriedades mecânicas melhores que à base de polissacarídeos (29). Além desta função, estas proteínas são importantes no processo de maturação do biofilme, pois estas interagem com polissacarídeos especiais, denominados adesina intercelular polissacarídica, na agregação célula-célula (30).

Vários estudos recomendam o uso de estreptomicina na terapia contra leptospirose (31,32,33,34) e os resultados obtidos mostraram que esse antibiótico pode controlar a leptospiremia e leptospirúria, por meio de dose única, quando aplicada na concentração de 25 mg/kg (35,36). Fato não confirmado nesta pesquisa, pois a dose de 25 mg/L de estreptomicina não foi eficaz na inibição da produção dos biofilmes por estirpes de leptospira *in vitro*.

A colonização de leptospires em tecidos placentários de cobaias comprovou a agregação celular de leptospires patogênicas *in vivo*, (37). Além disso, a formação do biofilme também pode desempenhar um papel importante na manutenção de uma infecção crônica do agente patogênico *Leptospira interrogans* com a colonização renal (12). Com os resultados obtidos neste estudo *in vitro*, apontam que após a formação de biofilme, os antibióticos não conseguem eliminar as bactérias do biofilme, e o animal permanece portador, eliminando a leptospira no ambiente.

Alta resistência adquirida pela formação de agregações celulares foi apresentada neste estudo, em que as estirpes após formações dos biofilmes não apresentaram sensibilidade aos dois antibióticos também testados em estudo anterior (38). As mesmas estirpes de Icterohamorragie/Conpenhageni foram testadas, para determinação da concentração inibitória mínima de antibióticos. Estas apresentaram sensibilidade à penicilina, ampicilina, estreptomicina e cefalosporinas e resistência a sulfa trimetoprim e neomicina (38).

Muitos estudos demonstraram um significativo aumento na Concentração Inibitória Mínima em Biofilme (MBIC), quando comparada com a Concentração Inibitória Mínima (MIC), para diferentes antibióticos em várias espécies de micro-organismos (39,40,41). Discute-se que essa elevação na MBIC ocorreria devido aos mecanismos de resistência em biofilme (42). A concentração inibitória dos biofilmes formados pelas estirpes aumentaram neste estudo comparado com o estudo anterior (38).

Vinte e uma estirpes de leptospira foram testadas em diferentes concentrações de antibióticos, e observaram que as bactérias foram susceptíveis a penicilina G (25-100 U/ mL), ampicilina (12,5-50 ug-330/ mL) e tetraciclina (50-100 ug/mL), embora a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Bactericida Mínima (MBIC) tenha variado entre as estirpes. O MBIC para o *L. interrogans* pomona no biofilme quando associado a *Azospirillum brasiliense* foi significativamente maior em 800 U/mL para a penicilina G, ampicilina e tetraciclina, respectivamente (24). Isto é quatro vezes mais elevada do que a requerida em um estado planctônicas. Neste estudo, com a dose mais baixa de penicilina G (25000 U/L), apresentaram alta resistência, sem inibição da formação de biofilmes.

A dose utilizada de 25000U/kg de penicilina é indicado para leptospirose canina (43) na pratica veterinária, discordando deste estudo que drogas e doses usuais podem ser ineficazes quando há formação de biofilme em animais com estado de portador renal.

No Consensus Statement do Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM) sobre a leptospirose foi recomendado para o tratamento da leptospirose em cães com doxiciclina a 5 mg/Kg PO ou IV, cada 12 horas, por duas semanas (44).E além disso, a doxiciclina é considerada eficaz na eliminação das leptospiras do sangue, rim e fígado no espaço de três dias após início do tratamento (45). Porém a antibioticoterapia normalmente reverte os sinais clínicos causados por células planctônicas liberadas do biofilme, mas não consegue destrui-lo (46).Concordando com este estudo, no qual a doxiciclina com três doses diferentes não inibiram a formação dos biofilmes de leptospira.

Acredita-se que uma dose alta de antibióticos seja capaz de inibir a crescimento bacteriano e com isso a formação de biofilmes, por possuir maior concentração dos antibióticos, no entanto o que houve foi menor absorção pela matriz dos biofilmes. Como observado neste estudo que a dose 25mg/L dos antibióticos obteve melhor absorção pelas matrizes formadas pelas estirpes de *Leptospira spp* concordando com estudo anterior (47).

A resistência aos antibióticos ocorre porque estas drogas precisam difundir-se na matriz do biofilmes, os micro-organismos em biofilmes tem necessidade metabólicas e taxas de crescimento reduzidas e o ambiente imediato fornece mais condições protetoras aos micro-organismos (48) .

## Conclusão

As estirpes de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e Icterohamorrhagiae/Conpenhageni oriundas de cães e bovinos foram formadores de biofilme, e apresentaram alta resistência aos antibióticos testados. O antibiótico penicilina com a dose de 25 mg/L tiveram melhores resultados *in vitro*, com maior inibição da formação do biofilme.

## Referências

1. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*.**295(5559)**: 1487-1487.
2. Mann,E. E.;Wozniak,D. J. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews*. **36** :4. 893-916.
3. Mah,T.F..2012 Regulating antibiotic tolerance within biofilm microcolonies.*Journal of bacteriology*. **194**:18. 4791-4792.
4. Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B.E., Akerlund B..2014 Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, **276**. 2. 98-110.

5. **Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S.** 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*.**295(5559)**: 1487-1487.
6. **Dueholm, M.S., Sondergaard, M.T., Nilsson, M., Christiansen, G., Stensballe, A., Overgaard, M.T., GivsKov M., Otzen E. D., Nielsen, P. H.** 2013. Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *Microbiologyopen*.**2**:3. 365-382.
7. **Pompermayer D.M.C., Gaylarde, C. C.** 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food microbiology*. **17**:4. 361-365.
8. **Shi X., Zhu X.** 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. **20**: 9. 407-413.
9. **Characklis W. G.** 1990. Laboratory biofilm reactors. *Biofilms*. **83**.
10. **Mattila-Sandholm T., Wirtanen G.** 1992. Biofilm formation in the industry: a review. *Food Reviews International*.**8**.4.573-603.
11. **Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., Haake, D.** 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*.**7**:1.35-40.

12. **Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M. C., Lilenbaum, W., Picardeau, M.** 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology*.**154**:5.1309-1317.
13. **Korver, H., Kolk, A.H.J., Vingerhoed, J., Leeuwen, J.V., Terpstra, W.J.** 1988. Classification of the serovars of Icterohaemorrhagiae serogroup by monoclonal antibodies. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. **44**: 15–18.
14. **Terpstra, W.J., Korver, H., Leewen, J.V., Klatser, P.K., Kolk, A.H.J.** 1985. The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira* interrogans with monoclonal antibodies, *Zentralblatt Fur Bakteriology, Mikrobiologie, Und Hygiene, Series A*, **259**, 498–506.
15. **Galloway, R.L., Levett, P.N.**, 2010. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4.824.
16. **Cucarella, C., Tormo, M. A., Ubeda, C., Trotonda, M. P., Monzón, M., Peris, C., Amorena B., Lasa I., Penadés, J. R.** 2004. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*.**7**:24. 2177-2185.
17. **Mack, D., Sabottke, A., Dobinsky, S., Rohde, H., Horstkotte, A., Johannes K., Pereira , M. O., Vieira, M. J.** 2001. Effects of the interactions between

glutaraldehyde and the polymeric matrix on the efficacy of the biocide against *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, New York, **17**, 2, 93-101.

18. **DEMO, M.**1996. Caracterizacion y estudios de patogenicidad de estirpes del genero *Staphylococcus* asiladas de leches mastiticas, Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina.

19. **Azeredo, J. A., Lazarova, V., Oliveira, R.** 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Water Science Technology*. **39**:243- 250.

20. **Dubois M., Giles,K. A.,Hamilton J. K., Rebers, A., Smith.**1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. Washington. **28**. 350-356

21. **Moreno B., Gracia E., Monzon M., Leiva J.,Oteiza C., Pérez M.,Alabar J. L., Hernández-yago J.**1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.**44**. 43-55.

22.**Banzatto D. A., Kronka S.N.**1989. Experimentação agrícola. FUNESP, **247**.

23. **GOMES F.**2010. Novas estratégias terapêuticas contra biofilmes de *Staphylococcus epidermidis*. Tese de Doutorado - Universidade do Minho, Braga, Portugal.**134.**

24. **Kumar K. V., Lall C., Raj R. V., Vedhagiri K., Vijayachari P.** 2015. Co-existence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with Azospirillum. FEMS microbiology ecology, v 51.

25. **Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J. D., Jiang, S.** 2007. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*. **2829**: 4192-4199.

26. **James G. A., Beaudette, L. ,Costerton J. W.** 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* .**15**: 257–262.

27. **Cucarella, C., Colano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penades, P.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*.**183**:2888–2896.

28. **Latasa C., Solano C., Penadés J. R., Lasa, I.** 2006. Biofilm-associated proteins. *Comptes rendus biologies*.**329**.11. 849-857.

29. **Chen, C. T.**1995. Linear system theory and design. Oxford University Press.Inc

30. **Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Dordet-Frisoni, E., Bellon-Fontaine, M.N., Leroy, S., Labadie, J., Hebraud, M., Talon, R.**, 2006. Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*. International Journal Food Microbiology. **109**:88–96.
31. **Alt D. P., Bolin, C. A.** 1996. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar pomona infection in hamsters and swine. American journal of veterinary research, **57**.1.59-62.
32. **Smith C. R., Corney B. G., McGowan M. R., McClintock C. S., Ward, W., Ketterer, P. J.** 1997. Amoxycillin as an alternative to dihydrostreptomycin sulphate for treating cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. Australian veterinary journal. **75**:11.818-821.
33. **Alt D. P., Zuerner R. L.,Bolin, C. A.** 2001. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo.Journal of the American Veterinary Medical Association. **219**:5. 636-639.
34. **Cortese V. S., Behan S., Galvin J. E., Penka D. R., Ramsey D., Bryson W. L., Lucas M. J.** 2006. Evaluation of two antimicrobial therapies in the treatment of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo infection in experimentally infected cattle. Veterinary therapeutics: research in applied veterinary Medicine. **8**.3.201-208.

35. **Ellis W.A., Parland P.J., Bryson D.G., Mc Nulty M.S.** 1985 Leptospires in pig urogenital tracts and fetuses. Veterinary Research.**117**. 3.66-67.
36. **Cavazini N. C., Saldanha G. B., da Silva A. S., Fernandes M. B., Badke M. R. T., Piveta, C. G.** 2008. Eficiência Reprodutiva de Vacas com Leptospirose após Tratamento com Sulfato de Estreptomicina. Revista da FZVA.**15** .1.
37. **Brihuega B., Samartino L., Auteri C., Venzano A., Caimi K.** 2012. In vivo cell aggregations of a recent swine biofilm-forming isolate of *Leptospira interrogans* strain from Argentina. Revista Argentina de Microbiologia. **44**:138-143.
38. **Miraglia F., Matsuo M., Morais Z. M., Dellagostin O. A., Seixas F. K., Freitas J. C., Hartskeerl R., Moreno L.Z., Costa B.L., Souza O.G., Vasconcellos S.A., Moreno A. M.** 2013. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. Diagnostic microbiology and infectious disease. **77** .3.195-199.
39. **Ghannoum, M., O'Toole, G. A.** 2004. Biofilm antimicrobial resistance. *Microbial Biofilms*. ASMnWashington DC.**1**: 250-268.
40. **Bendouah Z, Barbeau J, Hamad W, Desrosiers M.** 2006 Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is Associated with an

Unfavorable Evolution After Surgery for Chronic Sinusitis and Nasal Polyposis.

Otolaryngol Head Neck Surg. Jun. **134**:6. 991-6.

41. **Pasternak, J.** 2009. Biofilmes: um inimigo (in) visível. Revista da SBCC. **39**:36-38.

42. **Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R** .2007. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrobial Agents. **51**: 888–895.

43. **LIMA, É. V.** 2013. Leptospirose canina: revisão bibliográfica. 2013.. Monografia (Bacharelado em Medicina Veterinária)—Universidade de Brasília, Brasília. 40.

44. **Sykes, J. E., Hartmann, K., Lunn, K. F., Moore, G. E., Stoddard, R. A., Goldstein, R. E.** 2011. ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine, **25**:1.1–13.

45. **Truccolo, J., Charavay, F., Merien, F., Perolat, P.** 2002. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **46**:3. 848–53

46. **Freemand, J, Falkiner, F. R., Keane, C. T.** 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology. **42**: 8,872-874.

47. **Da Silva Chagas,L, Melo,P.C, Lima, A.M.C, Ramos, G.B., Brito, D.V., Nader Filho,A.** 2015. Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus*

aureus em condições de biofilme.Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 52: 3,228-233.

48. **Greene, C.** E.20013 .In:Envirmoment factors infectious Dieasses. Craig E., J Scott weese J. , Calpin,P.J . Infectious diseases of the dog and cat. Elsevier Health Sciences, 1122-1145.

Figura 1: Composição bioquímica da matriz extracelular por proteína e polissacarídeo de estirpes de leptospira sorovar Canicola e Icterohaemorrhagiae/Conpenhageny testados por Kit BCA e método de ácido fenol sulfúrico

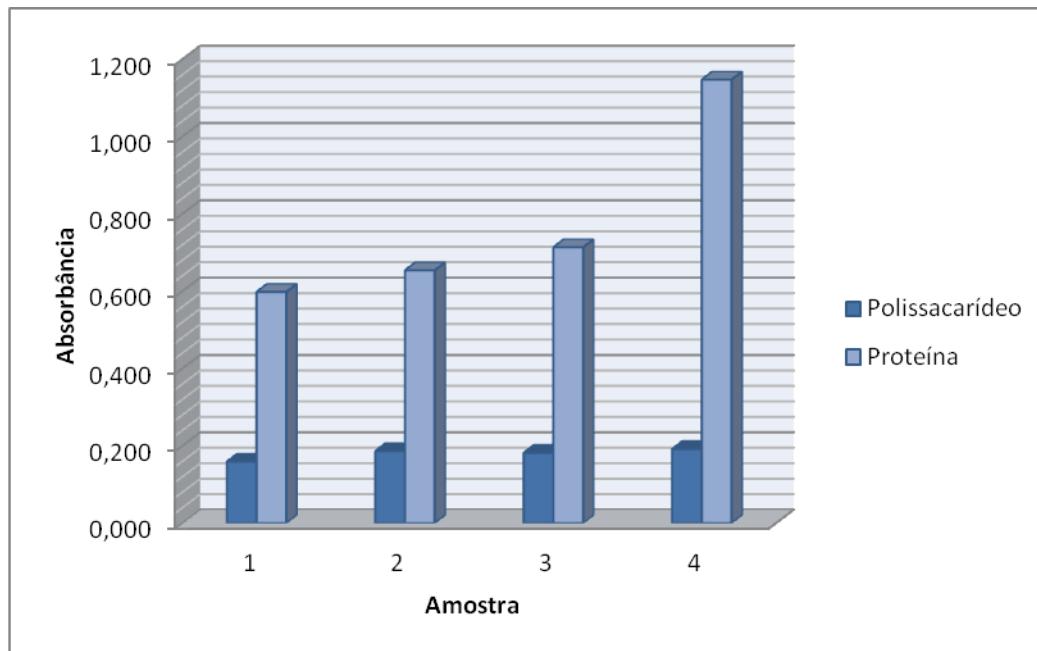


Tabela 1: Resultados das médias de absorvâncias dos antibióticos doxiciclina, estreptomicina e penicilinas em relação as C1,C2,C3 e C4 no teste de concentração inibitória mínima

	CEPA				
Anti	C1	C2	C3	C4	Media
DOX	1.028583 aA	1.012883 aA	1.239311 aB	1.483469 bC	1.1911
EST	1.07217 aA	1.051997 aA	1.187319 aA	1.223139 aA	1.1350
PEN	1.123522 aA	1.107114 aA	1.215075 a A	1.308356 aA	1.1885
Media	1.0748	1.0573	1.2139	1.3383	1.1711

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas linhas ou por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Tabela 2: Resultados das médias de absorvâncias dos antibióticos doxiciclina, estreptomicina e penicilinas nas dosagens 0, 25, 50 e 100 mg /L após 12 horas de incubação no teste de concentração inibitória mínima das estirpes de Canicola e Icterohaemorrhagiae/ Conpenhageni.

<b>Anti</b>	<b>D0</b>	<b>D25</b>	<b>D50</b>	<b>D100</b>	<b>Media</b>
<b>DOX</b>	1.6689 aB	1.0123 bA	1.1277 aA	0.9554 aA	1.1911
<b>EST</b>	1.6689 aB	0.8648 bA	0.9743 aA	1.0185 aA	1.1350
<b>PEN</b>	1.6689 aD	0.7116 aA	0.9962 aB	1.3774 bC	1.1885
<b>Media</b>	1.6689	0.8629	1.0344	1.1171	1.1708

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas linhas ou por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Tabela 3: Resultados das médias de absorvâncias das doses 25,50 e 100mg/ L dos antibióticos em relação as estirpes C1,C2,C3 e C4 no teste de concentração inibitória mínima das estirpes.

<b>CEPA</b>					
<b>Dose</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>Media</b>
<b>D0</b>	0.0620 cA	0.0673 cA	0.0986 bB	0.1286 cB	1.6689
<b>D25</b>	0.0611 aA	0.0300 aA	0.0534 aA	0.0720 aA	0.8629
<b>D50</b>	0.0516 aA	0.0556 bA	0.0563 aA	0.0859 bB	1.0344
<b>D100</b>	0.0818 bA	0.0819 bA	0.0698 aA	0.0792 bA	1.1171
<b>Media</b>	1.0748	1.0573	1.2139	1.3383	1.1711

Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas linhas ou por letras maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Figura 2: Fotos obtidas por Método de Microscopia confocal para observação de biofilme das estirpes de *Leptospira interrogans* sorovar Canicola e Icterohaemorragiae/Copenhageni em material de polipropileno. As fotos estão ordenadas em sequencia : estirpes 1 e 2 , abaixo estirpes 3 e 4.

