

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS ISOLADAS
DE AMOSTRAS DE URINA DE CÃES COM CISTITE

ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBEIRO

Uberlândia
2017

ROSANNE APARECIDA CAPANEMA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS ISOLADAS
DE AMOSTRAS DE URINA DE CÃES COM CISTITE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário, do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Monteiro Correia Lima

Uberlândia
2017

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me amparado, me dado forças e provido o que foi necessário até aqui. Em segundo lugar, à minha família, ao meu namorado e aos amigos, que me deram suporte e apoio para superar cada dificuldade, tiveram paciência quando foi preciso e comemoraram cada conquista e vitória junto comigo em todos esses anos de faculdade. Agradeço também aos meus amigos do laboratório LADOC, que estiveram presentes, me ensinaram e ajudaram sempre que foi preciso, e aos laboratórios LABIO e LCQSA por terem me amparado nos momentos em que, por falta de equipamento ou reagentes, achei que não iria conseguir. Por último, meu agradecimento especial à minha orientadora, Prof. Anna, e à co-orientadora, Profa. Dayane, por seus ensinamentos, apoio, compreensão, amizade e por acreditaram no meu potencial. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO	7
1 – INTRODUÇÃO	8
2– OBJETIVOS	9
3- REVISAO DE LITERATURA	9
Cistite	9
Biofilme	10
Resistência a antimicrobianos e biofilme	12
4 – METODOLOGIA	13
5- RESULTADO E DISCUSSÃO	15
6- CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de sensibilidade e resistência a antibióticos utilizados em bactérias isoladas de urina proveniente de cães com cistite 17

Tabela 2 - Distribuição de bactérias isoladas de urina de cães com cistite e avaliação da formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo e Teste de microplacas com corante cristal violeta 18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A: *E. coli* oriunda de urina de cães com cistite, formadora de biofilme, apresentando colônias rugosas e negras em Ágar Vermelho Congo. B: *P. mirabilis* oriunda de urina de cães com cistite, não formadora de biofilme, apresentando colônias lisase vermelhas..... 18

Figura 2 - Teste de microplacas de 96 poços com corante cristal violeta realizado com bactérias oriundas de urina de cães com cistite e executado com comprimento de onda de 492nm no leitor de ELISA 19

RESUMO

A cistite é a afecção do trato urinário inferior mais comum em cães e ocorre quando o microrganismo é muito virulento ou há falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Sua persistência ou recorrência pode ser causada pela formação de biofilmes, que são agregações de microrganismos com uma arquitetura definida e metabolismo alterado, com melhor comunicação de célula a célula, e capazes de evadir a resposta imunológica do hospedeiro e dos efeitos dos antimicrobianos. O objetivo dessa pesquisa foi conhecer o perfil de bactérias oriundas de amostras de urina de cães com cistite e analisar a susceptibilidade aos antimicrobianos, além de verificar se essas produzem biofilme. Para a metodologia, avaliou-se 36 amostras de urina de cães com suspeita de cistite. As bactérias foram isoladas por meio de inoculação por técnica de esgotamento em estrias feitas em Ágar Sangue, MacConkey e Cled, e identificadas através de coloração de Gram e provas bioquímicas. Para determinar a suscetibilidade a antimicrobianos utilizou-se o método de difusão em disco em placas de Mueller Hinton. A produção de biofilme foi verificada pelo cultivo em Ágar Vermelho Congo e pelo teste confirmatório de microplacas com o corante cristal violeta. Das 36 amostras, 23 apresentaram crescimento bacteriano e as bactérias isoladas com maior frequência foram *Escherichia coli* (29.8%), *Staphylococcus* spp. (21.6%), *Proteus mirabilis* (18,9%) e *Enterococcus* spp. (13.5%). Os isolados de *E. coli* apresentaram 81, 8% de sensibilidade a ceftriaxona e gentamicina, enquanto para cefalotina houve 72,7% de resistência. *Staphylococcus* spp. demonstram alta resistência a duas das principais drogas de eleição para o tratamento de cistite, ampicilina e sulfametoxazol+trimetropim. Em relação a *P. mirabilis*, notou-se alta sensibilidade a todos os antibióticos testados. Todos os isolados de *Enterococcus* spp. apresentaram resistência a sulfametoxazol+trimetropim e a clindamicina. Ao menos um isolado de cada patógeno identificado no presente estudo demonstrou habilidade de formar biofilme *in vitro*, destacando-se *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Torna-se importante a adoção de medidas profiláticas com o intuito de evitar a infecção do trato urinário e a resistência a antimicrobianos.

Palavras chave: Urinário, Antimicrobiano, Bactérias sésseis, *E. coli*

1 – INTRODUÇÃO

O sistema urinário tem um importante papel no organismo animal por ser capaz de excretar produtos residuais e manter o equilíbrio eletrolítico. Qualquer patologia nesse sistema pode causar distúrbio metabólicos e transtornos de fluidos, eletrólitos e de equilíbrio ácido-básico (DINESH et al., 2015). Apesar disso, o trato urinário inferior de cães e gatos é frequentemente afetado por doenças, sendo a cistite (doença infecciosa e/ou inflamatória da vesícula urinária) bacteriana a mais comum (40%) (LULICH et al., 2008).

As bactérias mais frequentes isoladas em urina de cães com infecção do trato urinário (ITU) são as Gram positivas *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp e as Gram negativas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (BARSANTI, 2006).

A persistência ou recorrência de ITU pode ser causada pela formação de biofilmes, que são caracterizados pela adesão de bactérias tanto em superfície inanimada quanto em biótica, são espacialmente e metabolicamente organizados em sociedades incorporadas em matrizes de constituições poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007), formando uma rede gelatinosa que retém e protege estes microrganismos. Esse mecanismo pode ser explicado como uma tática de sobrevivência em ambientes com condições desfavoráveis (COSTERTON et al., 1999).

Acredita-se que esse trabalho é o primeiro na detecção de bactérias formadoras de biofilme em urina proveniente de cães com cistite. Porém, um estudo conduzido por Tabasi et al. (2015) realizado em humanos, avaliou-se 156 amostras de urina derivadas de casos sintomáticos e assintomáticos de infecção do trato urinário, causadas por *Escherichia coli*. Foi constatado que houve formação de biofilme em 133 (85,3%) dos casos e que há relação positiva entre a formação de biofilme em infecções urinárias causadas por *E. coli* isoladas de pacientes com cistite aguda e infecção do trato urinário recorrente.

Infecções bacterianas do trato urinário inferior, como as cistites, são especialmente preocupantes quando há formação de biofilmes pois, quando as bactérias estão nesse formato, ocorre maior resistência aos efeitos de agentes antimicrobianos se comparadas às células planctônicas das mesmas espécies. Isso pode ser causado por demora na penetração de antimicrobianos na matriz

dos biofilmes, pelo diferente percentual de multiplicação dos organismos nesse estado, por alterações fisiológicas decorrentes do crescimento do biofilme incluindo as células persistentes, além da matriz exopolissacarídica que atua como barreira contra os antimicrobianos (MELO, 2008).

Considerando-se que já foi vista a presença de formação de biofilme em infecções do trato urinário de humanos, que não foram encontrados estudos nesse sentido na área de medicina veterinária e a importância de um sistema urinário íntegro, é bastante relevante a comprovação científica da ocorrência da formação de biofilmes em amostras provenientes de pequenos animais.

Ademais, levando em consideração que as bactérias nesse estado têm alta resistência a antimicrobianos, é fundamental se conhecer quais antibióticos tem maior eficácia no tratamento dessas infecções.

2- OBJETIVOS

Conhecer o perfil de bactérias oriundas de amostras de urina de cães com cistite e analisar a susceptibilidade aos antimicrobianos, além de verificar se essas produzem biofilme.

3- REVISÃO DE LITERATURA

Cistite

Cães e gatos domésticos são constantemente acometidos por doenças que atingem o trato urinário inferior, que é responsável pelo armazenamento e liberação periódica de urina. As doenças mais frequentes nesse trato são cistite bacteriana (40%), incontinência urinária (24%) e urolitíase (18%) (LULICH et al., 2008).

A ITU causada por bactérias em cães acomete, em primeiro lugar, fêmeas castradas, seguido por machos castrados, fêmeas íntactas e, apenas ocasionalmente, machos íntactos. Acredita-se que em algum momento de suas vidas, 14% dos cães sejam acometidos por essa doença (BARSANTI, 2006).

A colonização do trato urinário inferior por bactérias ocorre quando o microrganismo é muito virulento ou quando há falhas nos mecanismos de defesa

do hospedeiro por alterações funcionais ou anatômicas. Dos rins até a metade proximal da uretra, o trato urinário normal é estéril, a partir daí, existem microrganismos que habitam a microbiota da genitália, que, ocasionalmente podem estar envolvidos na ITU. Entretanto, em grande parte das infecções, as bactérias provenientes do intestino ou da pele ascendem pela uretra e invadem a vesícula urinária, podendo alcançar os rins e ocasionar pielonefrite (BARSANTI, 2006; SENIOR, 2011).

O esvaziamento regular da bexiga causada pelo fluxo urinário normal combate poderosamente as infecções de trato urinário, pois leva à expulsão de 95% das bactérias presentes e não aderidas na uretra distal, evitando sua ascensão, devido à elevada pressão no interior da uretra e suas contrações espontâneas. Em machos esse mecanismo é potencializado pela ação bactericida das secreções prostáticas. Assim, afecções que alterem a periodicidade urinária ou aumentem o volume residual de urina na vesícula urinária geram predisposição a infecções (SENIOR, 2011).

Apesar da proximidade com o ânus e o potencial para contaminação fecal, o sistema urinário tem capacidade de evitar infecções através de alguns mecanismos como sistema imunológico das mucosas, propriedades antibacterianas da urina, estrutura anatômica específica e imunocompetência sistêmica (SEGUIN et al., 2003).

Quando esses mecanismos falham e há a infecção bacteriana da vesícula urinária, necessita-se fazer antibióticoterapia mediante os resultados da urocultura e antibiograma, sendo que dentre os antibióticos de eleição utilizados para o tratamento dessa afecção pode-se citar penicilinas, sulfa-trimetoprim, cefalosporinas, gentamicina e enrofloxacina.

Biofilme

O princípio da sobrevivência como mecanismo de adaptação às pressões do ambiente fomentou o desenvolvimento de uma estratégia de crescimento através da formação de biofilme, permitindo a construção de uma coesa e robusta comunidade de células com forte comunicação intercelular (GOMES, 2016).

A bactéria pode ser encontrada em dois estados no ambiente, planctônica (flutuante) para proliferação ou sésil (imóvel) para persistência. Os microrganismos sésseis constituem o biofilme através da produção da matriz com polímero orgânico e hidratado. Esse artifício tem como objetivo a defesa contra adversidades providas do ambiente externo (alteração de pH, temperatura, nutrientes, ação de agentes físicos e químicos), de resposta imune inata e adquirida e da ação de antibióticos dentro do organismo (CLUTTERBUCK et al., 2007). Desse modo, são capazes de exibir um fenótipo diferente do expresso pelas células planctônicas, quando se trata da taxa de crescimento e da transcrição de genes que promovem a resistência do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Com a formação de um biofilme, as bactérias conseguem alterar seu metabolismo e melhorar a comunicação célula a célula, além de evadir a resposta imunológica do hospedeiro e dos efeitos dos antimicrobianos por meio do metabolismo isolado juntamente com a proteção física e química da matriz do biofilme (SINGH et al., 2013).

Os biofilmes mais comuns na natureza são compostos por duas ou mais espécies bacterianas. Quando colonizam, elas podem restringir ou estimular a diversidade de um biofilme, devido a fatores como competição por nutrientes, acumulação de metabólitos nocivos ou fornecimento de substâncias que promovam a ligação de outras espécies (IST, 2008).

Pilares cilíndricos, com formato de cogumelo, permitem o máximo de absorção de nutrientes do ambiente e o mínimo de desperdício, sustentando toda a estrutura do biofilme. Devido à probabilidade de extermínio e não maturação do biofilme aumentar quando há grande quantidade de bactérias, para sua rápida proteção, e no intuito de ser mais patogênica e regular mais satisfatoriamente a densidade populacional - por meio de sinalização química -, o desenvolvimento do biofilme começa com poucas bactérias (CLUTTERBUCK et al., 2007).

A adesão das bactérias sésseis sobre a superfície de formação é auxiliada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, também chamada de glicocálix. Microcolônias e canais de água entre as mesmas são formadas neste microambiente. Um sistema circulatório ancestral, no qual nutrientes são trazidos para o interior e produtos tóxicos são expelidos tem sido

correlacionado a este sistema de irrigação em volta das microcolônias (JAY, 2005).

Na medicina veterinária, a presença de biofilme pode ser vista em otite canina, como relatado em um trabalho realizado por Pye et al. (2013), onde em 83 isolados de otite canina produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, 40% apresentaram produção de biofilme. Também é descrita a formação de biofilme em mastite bovina, como verificado por Melo (2008), onde 95 estirpes *Staphylococcus aureus* provenientes do leite de vacas com mastite subclínica foram testadas e, 85% das estirpes foram capazes de produzir biofilmes *in vitro*. Em relação a amostras de frangos abatidos, há estudos comprovando a presença de biofilme produzido por *Salmonella* (OLIVEIRA, 2011).

Não é possível dizer que todos os ambientes apresentam adesão microbiana, já que a habilidade de formar biofilme não é expressa por todas as bactérias. Assim, é indispensável conhecer sobre a presença de microrganismos produtores de biofilme em ambientes e animais doentes, já que o aparecimento desse fenótipo é uma forma de resistência e persistência da doença.

Resistência a antimicrobianos e biofilme

Uma questão complexa e causadora de grande preocupação para a comunidade médica e veterinária, envolvendo diversas espécies bacterianas, seus mecanismos de defesa e transferência desta característica a outras bactérias é a resistência aos antibióticos, causa conhecida de insucesso no tratamento de várias doenças, especialmente considerando o aparecimento de microrganismos multirresistentes (ISHII, 2011). O desenvolvimento da resistência bacteriana é fomentado pelo uso inadequado dos agentes antimicrobianos no tratamento de infecções em animais domésticos e no homem, sendo esta prática alvo de muitas críticas (PEDERSEN et al., 2007; PALLO-ZIMMERMAN et al., 2010).

A marcante eficiência metabólica dos biofilmes e sua resistência intrínseca a drogas é explicada por um alto nível de estrutura organizacional e especialização nos biofilmes com várias espécies, pois estas podem se favorecer mutuamente através da troca de substrato e/ou remoção conjunta de metabólitos (MAUKONEN et al., 2003). Isso foi demonstrado por Beaudoin et al.

(2017), que identificaram um biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* clínica, com arquitetura diferente na presença de exoprodutos secretados por *Staphylococcus aureus* e comprovaram que esse mecanismo foi responsável pela resistência a tobramicina,

Diversas hipóteses buscam explicar um incremento da resistência em bactérias formadoras de biofilme, dentre as quais podemos citar: baixa penetração do antibiótico; inativação do antimicrobiano por polímeros ou enzimas extracelulares; baixa taxa de multiplicação bacteriana na evolução do biofilme, seja pela limitação de nutrientes ou em resposta ao estresse principiado pela formação do biofilme, levando à ineficiência do fármaco; indução de fenótipos mais resistentes, alguns caracterizados por bomba de efluxo e mudança da constituição da membrana proteica, outros induzidos não em resposta à limitação nutritiva, mas respondendo ao crescimento em biofilme (GOMES, 2016).

4 – METODOLOGIA

Foram avaliadas em um período de quatro meses, de acordo com a casuística, 36 amostras de urina de cães de diferentes raças, sexo e idade que estavam com infecção da bexiga urinária (cistite), coletadas por cistocentese guiada por ultrassom, provenientes do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) do município de Uberlândia, estado de Minas Gerais. As análises mencionadas a seguir ocorreram no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFU.

As bactérias foram isoladas e identificadas de acordo com métodos descritos por Quinn et al. (2005). O isolamento ocorreu por meio de inoculação por técnica de esgotamento em estrias feitas em ágar sangue, MacConkey e Cled, seguidas de incubação por 24 a 48 horas. A identificação definitiva de um potencial patógeno foi feita por meio de subcultura de uma colônia isolada para obter um crescimento puro. A partir deste, foi feita preparação microscópica corada pelo métodos de Gram e observadas ao microscópio óptico, além de testes bioquímicos como os de vermelho de fenol, lisina, citrato, fenil alanina, ureia, H₂S, motilidade e indol, utilizados para bactérias Gram negativas.

Após a identificação, as bactérias foram submetidas a teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco, utilizando placas de Ágar Müller Hinton (OLIVEIRA, 2000). Os testes foram realizados frente aos antimicrobianos: amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AMP), ceftriaxona (CRO), ciprofloxacina (CIP), clindamicina (CLI), cefazolina (CFZ), cefalotina (CFL), eritromicina (ERI), gentamicina (GEN), norfloxacina (NOR), sulfametoxazol+trimetropim (SUT). Sendo que, cefalotina e cefazolina foram usados apenas para bactérias Gram negativas e clindamicina e eritromicina foram usados apenas para bactérias Gram positivas.

A produção de biofilme foi verificada pelo cultivo em Ágar Vermelho Congo (CRA) [0,8 g de corante vermelho congo (Vetec) e 50g de sacarose (Himedia) para 1 Lt de Ágar Brain Heart Infusion (Himedia)]. Para isso, as placas de Ágar Vermelho Congo foram inoculadas e incubadas a 37°C por 24 horas, seguido por uma incubação a temperatura ambiente por 48 horas. A produção de colônias rugosas e negras foram utilizadas para distinguir de cepas não produtoras de biofilme, que apresentaram colônias lisas e vermelhas (FREEMAN et al., 1989).

A habilidade de produzir biofilme in vitro foi verificada pelo teste de microplacas com o corante cristal violeta, de acordo com o método citado por Cucarella et al. (2004), com pequenas modificações descritas abaixo.

As bactérias foram cultivadas individualmente, por uma noite em BHI (Brain Heart Infusion) a 37°C. Posteriormente, as células em suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo plano, diluídas em 1:200 em TSB, contendo 0,25% de glicose (Synth) e incubadas por 24 horas a 37°C com 100 rpm de agitação e renovação do meio após 12 horas.

Os poços foram lavados 3 vezes com 200µL de Tampão Fosfato Salina (PBS), estéril (PBS, pH-7,4) e logo após foi adicionado 200µL metanol para fixação e deixados em estufa com temperatura de 37°C e permaneceram até a secagem da placa, aproximadamente 30 minutos. Adicionou-se, então, 200µL de cristal violeta a 1% por cinco minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água destilada e, quando estavam secas, adicionou-se 200µL de ácido

acético (Isofar) a 33%, para que fosse realizada a leitura a 492nm no leitor de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan go).

Poços não inoculados contendo TSB com glicose serviram como branco. Cada estirpe para produção de biofilme foi testada em triplicata e o teste foi repetido 2 vezes, sendo consideradas produtoras de biofilmes estirpes com absorbância medidas maior que 0,1 (MACK et al., 2000).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) com protocolo 036/17.

5- RESULTADO E DISCUSSÃO

Do total de 36 amostras de urina coletadas com suspeita de cistite, 23 (62,2%) efetivamente apresentaram crescimento bacteriano, sendo que 19 (82,6%) eram de fêmeas e 4 (17,4%) de machos. Parece haver um consenso de que machos são acometidos com menor frequência por cistite bacteriana do que fêmeas (OSBORNE; STEVENS, 1999; SEGUIN et al., 2003). A causa mais provável para esse fato é atribuída a uretra da fêmea ser curta e haver grande proximidade entre ânus e vulva (VASCONCELLOS, 2012) e em machos haver secreções prostáticas com ação bactericida (SENIOR, 2011).

Nessas amostras, foram encontradas culturas múltiplas e únicas, onde encontrou-se um total de 37 isolados. Observou-se que as bactérias encontrados com maior frequência foram *Escherichia coli* (11/37) sendo 29,8% do total, *Staphylococcus* spp. (8/37), aparecendo em 21,6% dos isolados, *Proteus mirabilis* (7/37) com porcentagem de 18,9 e *Enterococcus* spp. (5/37) com frequência de 13,5%. Outras bactérias encontradas foram *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterobacter aerogenes*. Esse resultado se assemelha ao estudo já citado, de Barsanti (2006), diferenciando apenas pelo fato de no presente trabalho ter sido encontrado *Enterococcus* spp. e não ter havido isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*.

De modo geral, a *E. coli* é a principal bactéria encontrada em infecções urinárias (NARCISO et al., 2011). Segundo Trabulsi e Alterthun (2009), a *E. coli* extra-intestinal (UPEC) possui adesinas que possibilitam a adesão e invasão nas células do trato urinário, sendo um dos principais fatores de virulência. As adesinas mais encontradas nas amostras de UPEC são as fimbrias tipo 1, que

também foram descobertas em vários membros da família *Enterobacteriaceae* (TRABULSI; ALTERTHUN, 2009).

Em relação a susceptibilidade a antimicrobianos, na Tabela 1 observa-se que *Staphylococcus* spp. apresentaram alta sensibilidade (>50% das bactérias testadas) a maioria dos antibióticos testados, porém para AMP e SUT, apresentaram resistência de 100% e 75%, respectivamente. Destaca-se que AMP e SUT são drogas de eleição para o tratamento de cistites causadas por essa bactéria (CRIVELLENTI; CRIVELLENTI, 2015). Todas as amostras de *Enterococcus* spp. testadas foram resistentes a CLI e SUT, e todas foram sensíveis para AMC. Quanto a *E. coli*, 81, 8% apresentaram sensibilidade a ceftriaxona e gentamicina, enquanto para cefalotina houve 72,7% de resistência. *P. mirabilis* apresentou alta sensibilidade a todos os antibióticos testados. O perfil de susceptibilidade para as demais bactérias não foi analisado, pois representou menos que 10% do total de bactérias isoladas.

A alta resistência apresentada até mesmo para antibióticos de eleição em alguns casos, provavelmente se deve ao fato destes princípios ativos serem amplamente utilizados na prática clínica. O emprego contínuo de determinadas drogas resulta em resistência ao longo do tempo por exercer uma pressão seletiva, o que torna os animais de companhia reservatórios de bactérias resistentes (CARVALHO et al., 2014).

Apesar disso, deve-se lembrar que os animais com cistite podem estar acometidos por outras doenças que debilitam o sistema imune e o impedem de reagir contra o microrganismo. Com isso, mesmo um microrganismo sensível ao antimicrobiano (*in vitro*) pode ter condições favoráveis para resistir ao mesmo.

Entretanto, a urocultura e respectivos antibiogramas proveniente de animais com suspeita de ITU, proporcionam dados relevantes para o conhecimento de vários agentes importantes no nosso meio e as informações a respeito do perfil de susceptibilidade necessário para prescrever um tratamento adequado. Além disso, evidenciam a relevância do médico veterinário na prevenção e controle de cistites afim de reduzir a disseminação de resistência bacteriana e seu impacto na saúde dos animais.

Tabela 1 - Porcentagem de sensibilidade e resistência a antibióticos utilizados em bactérias isoladas de urina proveniente de cães com cistite

Bactérias	<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Enterococcus</i> spp.		<i>E.coli</i>		<i>P. mirabilis</i>	
Antibiótico	S ¹	R ²	S ¹	R ²	S ¹	R ²	S ¹	R ²
AMC	100	0	100	0	54.5	18.2	85.7	0
AMP	0	100	80	20	54.5	45.5	71.4	33.3
CFL	_____	_____	_____	_____	18.2	72.7	71.4	16.7
CFZ	_____	_____	_____	_____	54.5	45.5	85.7	16.7
CRO	87.5	12.5	0	60	81.8	18.2	100	0
CIP	62.5	25	40	60	45.5	36.4	100	0
CLI	87.5	12.5	0	100	_____	_____	_____	_____
ERI	75	12.5	0	40	_____	_____	_____	_____
GEN	75	25	20	20	81.8	9.1	71.4	33.3
NOR	87.5	12.5	20	60	72.7	27.3	100	0
SUT	25	75	0	100	45.5	45.5	85.7	16.7

S¹: Sensível e R²:Resistente Observação: Resultados intermediários não foram contabilizados

Na Tabela 2, é possível observar a quantidade de bactérias formadoras de biofilme. Dos 37 isolados no total, 25 (67,6%) formaram biofilme em Ágar Vermelho Congo, o que é demonstrado na Figura 1, onde há colônias rugosas e negras. As colônias lisas e vermelhas demonstram a não formação desse mecanismo. Em relação ao teste de microplacas com corante cristal violeta, observa-se que 21 (56,8%) das bactérias formaram biofilme (Figura 2).

Tabela 2 - Distribuição de isolados bacterianos de urina de cães com cistite e avaliação da formação de biofilme em Ágar Vermelho Congo e Teste de microplacas com corante cristal violeta

Bactérias	N	%	Formadoras de biofilme			
			Vermelho Congo		Teste de microplacas com corante cristal violeta	
			N	%	N	%
<i>Escherichia coli</i>	11	29.8	7	28	5	23.8
<i>Staphylococcus</i> spp.	8	21.6	7	28	6	28.6
<i>Proteus mirabilis</i>	7	18.9	1	4	1	4.8
<i>Enterococcus</i> spp.	5	13.5	5	20	4	19.0
<i>Klebsiella</i> spp.	3	8.1	2	8	2	9.5
<i>Streptococcus</i> spp.	2	5.4	2	8	2	9.5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	2.7	1	4	1	4.8
Total de isolados	37	100	25	100	21	100

Figura 1 - A: *E. coli* oriunda de urina de cães com cistite, formadora de biofilme, apresentando colônias rugosas e negras em Ágar Vermelho Congo. B: *P. mirabilis* oriunda de urina de cães com cistite, não formadora de biofilme, apresentando colônias lisas e vermelhas

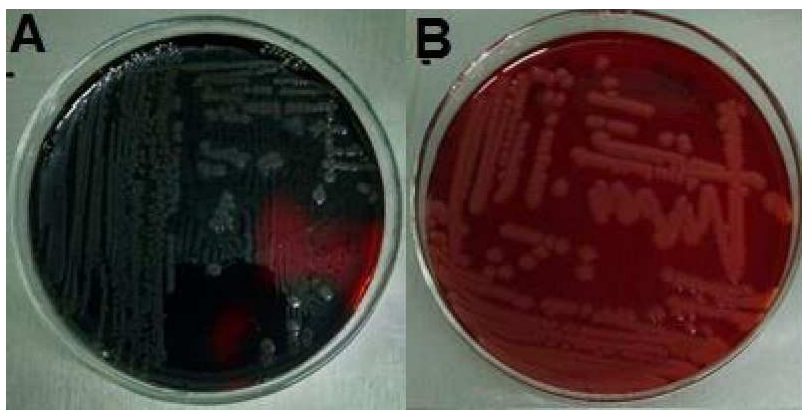
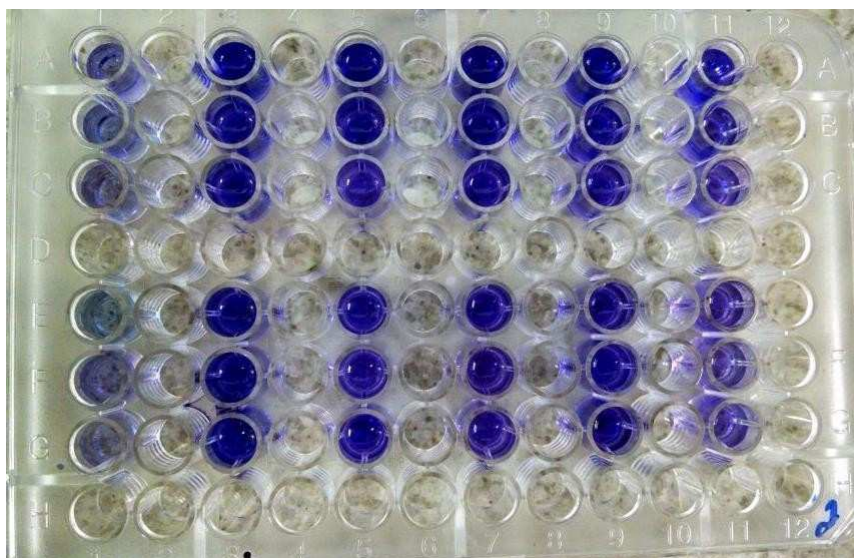


Figura 2 - Teste de microplacas de 96 poços com corante cristal violeta realizado com bactérias oriundas de urina de cães com cistite e executado com comprimento de onda de 492nm no leitor de ELISA



A investigação desse trabalho mostrou que houve alto índice (>50% das bactérias isoladas) de bactérias capazes de formar biofilme *in vitro* o que pode ser indicativo que estas poderiam já estar produzindo *in vivo*, promovendo defesa e resistência contra o sistema imune e antimicrobianos.

Outros estudos corroboram esse resultado, como o de Singh et al. (2013) que mostraram que 96% dos isolados clínicos de cães colonizados por *Staphylococcus pseudointermedius* apresentaram produção de biofilme forte ou moderada *in vitro*. Niveditha et al. (2012) conduziram um estudo no qual isolaram e avaliaram a formação de biofilmes por uropatógenos provenientes de amostras de urina de pacientes humanos com infecções do trato urinário associadas ao uso de cateter. Eles concluíram que a *E. coli* foi a bactéria isolada com maior frequência e que 60% das bactérias encontradas foram positivas para a formação de biofilme.

A alta incidência de formação de biofilme pode ser causada pela grande capacidade de aderência da célula nesse estado, já que eles são formados por bactérias que são aderidas a qualquer superfície por meio de uma matriz de polímeros orgânicos. Ou seja, são depósitos nos quais os microrganismos se fixam firmemente à superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica (glicocálice). Existem diversos polissacarídeos que compõem a camada do biofilme, porém um denominado polissacarídeo capsular/adesina

(PS/A) possui alto peso molecular, assume a mesma função da cápsula bacteriana, auxilia no primeiro passo da adesão primária (acompanhada da proliferação das células em agrupamentos de multicamadas), e protege as bactérias das defesas do hospedeiro e da fagocitose (MELO,2008).

Deve-se lembrar que em condições normais de atuação do sistema imune, o microrganismo pode ser combatido a ponto de não formar biofilme. Por outro lado, os animais desse estudo estavam com cistite, ou seja, já havia uma infecção instalada. Acredita-se que o microrganismo nas condições de adversidade *in vivo*, devido a inflamação, estava usando todo seu potencial para se defender (pili, fimbrias, adesinas, produção de toxinas, hemolisina, formação de biofilmes etc).

6- CONCLUSÃO

As bactérias isoladas com maior frequência em urina de cães com cistite deste estudo foram *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *P. mirabilis* e *Enterococcus*. Os isolados de *E. coli* apresentaram 72,7% de resistência para cefalotina. *Staphylococcus* spp. demonstram alta resistência a duas das principais drogas de eleição para o tratamento de cistite, ampicilina e sulfametoxazol+trimetropim. Em relação a *P. mirabilis*, notou-se alta sensibilidade a todos os antibióticos testados. Todos os isolados de *Enterococcus* spp. apresentaram resistência a sulfametoxazol+trimetropim e a clindamicina.

Bactérias envolvidas em casos de cistite em cães formaram biofilmes *in vitro*, destacando-se *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. como as bactérias que mais formaram biofilme *in vitro*.

O médico veterinário clínico deve considerar as diferenças individuais sem esquecer as inter-relações entre hospedeiro-bactéria para ter uma terapêutica de sucesso.

REFERÊNCIAS

BARSANTI, J. A. Genitourinary infections. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3. ed. St Louis, Missouri: **Saunders/Elsevier**, p. 935-961, 2006.

BEAUDOIN, T.; YAU, Y. C. W.; STAPLETON, P. J.; GONG, Y.; WANG, P. W.; GUTTMAN, D. S.; WATERS, V. *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. **Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 25, 2017.

CARVALHO, V. M.; SPINOLA, T.; TAVOLARI, F.; IRINO, K.; OLIVEIRA, R. M.; RAMOS, M. C. C. Urinary tract infection (UTI) in dogs and cats: etiology and antimicrobial resistance. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 62-70, 2014.

CLUTTERBUCK, A. L.; WOODS, E. J.; KNOTTENBELT, D. C.; CLEGG, P. D.; COCHRANE, C. A.; PERCIVAL, S. L. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 121, n. 1-2, p. 1-17, 2007.

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

CRIVELLENTIN, L. Z.; S. BORIN-CRIVELLENTIN. **Casos de rotina em medicina veterinária de pequenos animais**. São Paulo, 2ª edição, MedVet, 2015.

CUCARELLA, C.; TORMO, M.Á.; ÚBEDA, C.; TROTONDA, M.P.; MONZÓN, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, Í.; PENADÉS, J.R. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 4, pp. 2177-2185, 2004.

DINESH, D.; BEHL, S. M.; SINGH, P.; TAYAL, R.; PAL, M.; CHANDOLIA, R. K. Diagnosis of urinary bladder diseases in dogs by using two-dimensional and three-dimensional ultrasonography. **Veterinary world**, v. 8, n.7, p. 819, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v.42, p.872-874, 1989.

GOMES, D.O.; *Estudo da produção de biofilme de isolados de Leptospira spp.* 2016. 63 f. Tese (Mestre em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária da UFU. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

ISHII, J. B.; FREITAS, J. C.; ARIAS, M. V. B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n.6, p.533-537, 2011.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Crescimento microbiano em biofilmes. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em < <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>.

JAY, J.M. Biofilmes. In: _____ **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed. 6ed. , p.673-674, 711p. 2005.

LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A.; BARTGES, J. W.; LEKCHAROENSUK, C. Distúrbios do trato urinário inferior dos caninos. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5ª ed, vol. 2, São Paulo: Manole, p. 1841-1867, 2008.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCH, J. K. M.; ELSNER, H. A.; FEUCHT, H. H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p.3799-3807, 2000.

MAUKONEN, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n.6, p. 327-356, 2003.

MELO, P. de C. *Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de Staphylococcus aureus isoladas dos casos de mastite subclínica Pbovina*. 2008. 103 f. Tese (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NARCISO, A., FONSECA, F., CERQUEIRA, S. A., DUARTE, A. Susceptibilidade aos antibióticos de bactérias responsáveis por cistites não complicadas: estudo comparativo dos isolados de 2008 e 2010. **Acta Urológica Portuguesa**, v.1, p.16-21, 2011.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm—"City of Microbes" or an Analogue of Multicellular Organisms? **Microbiology**, v. 76, p.125-138, 2007.

NIVEDITHA, S.; PRAMODHINI, S.; UMADEVI, S.; KUMAR, S.; STEPHEN, S. The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). **Journal of clinical and diagnostic research**, v. 6, n. 9, p.1478, 2012.

OLIVEIRA, D. C. V. *Produção de biofilme por Salmonella sp. isolada de frango*. 2011. 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011, Botucatu.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária. Guia Bacteriológico Prático**. 2.ed. Canoas:Editora da ULBRA, p. 237, 2000.

OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B. **Urinalysis: A Clinical Guide to Compassionate Patient Care**, Bayer Corporation and Bayer AG Leverkusen, p. 214, 1999.

PALLO-ZIMMERMAN L. M.; BYRON J. K.; GRAVES T. K. Fluoro-quinolonas: Then and now. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 32, p.1-8, 2010.

PEDERSEN K.; PEDERSEN K.; JENSEN H.; FINSTER K.; JENSEN V. F.; HEUER O. E. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic sample from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p.775-781, 2007.

PYE C. C.; YU A. A.; WEESE J. S. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 446–499, 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E., DONNELLY, W. J., LEONARDO, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

SEGUIN, M. A.; VADEN, S. L.; ALTIER, C.; STONE, E.; LEVINE, J. F. Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 622-631, 2003.

SENIOR, D. Urinary tract infection – bacterial. In: BARTGES, J.; POLZIN, D.J. **Nephrology and Urology of Small Animals**, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, p.710-716, 2011.

SINGH, A.; WEESE, J. S.; ROUSSEAU, J.; WALKER, M. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC veterinary research**, v. 9, n.1, p. 93, 2013.

TABASI, M.; ASADI KARAM, M. R.; HABIBI, M.; YEKANINEJAD, M. S. Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. **Osong Public Health and Research Perspectives – Journal**, v. 6, n. 4, p. 261-268, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. **Microbiologia**. 4. ed. e 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

VASCONCELLOS, A. L; *Diagnóstico de cistite em cães- Contribuição dos métodos de avaliação*. 2012. 71 f. Tese (Mestre em Medicina Veterinária) -

Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp. Universidade Estadual Paulista,
Jaboticabal.