



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

CAMILA ALENCAR MOREIRA

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS CONTRA BIOFILMES DE
STAPHYLOCOCCUS SPP. DE OTITE CANINA**

FORTALEZA - CE

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE AGENTES
ANTIMICROBIANOS CONTRA BIOFILMES DE
STAPHYLOCOCCUS SPP. DE OTITE CANINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Mestranda: Camila Alencar Moreira

FORTALEZA -CE

2011

M837a Moreira, Camila Alencar

Atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus* spp de otite canina / Camila Alencar Moreira. – Fortaleza, 2011.

101 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Barreto Mano de Carvalho

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica; Fortaleza-CE, 2011.

CAMILA ALENCAR MOREIRA

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA BIOFILMES
DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. DE OTITE CANINA**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Data da Defesa: 14 / 01 / 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho (orientadora)
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim
Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará

aos meus pais, Aurélia e Luciano

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos momentos mais difíceis me deu forças para erguer os olhos adiante e ver a luz.

À minha família, que eu amo de paixão e que eu sei que me ama também, mesmo nos momentos de irritação, angústia, ansiedade e "loucura temporária". Em especial, aos meus pais, Aurélia Lúcia Alencar Moreira e José Luciano Bezerra Moreira, que me criaram num ambiente de amor, respeito e liberdade, sendo exemplos diários de paciência, dedicação e bondade.

À Prof^a. Dr^a. Cibele Barreto Mano de Carvalho, por me receber de braços abertos. Obrigada pela paciência, por toda a orientação, pelo exemplo de educadora, profissional e pessoa. Sou grata pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pela participação na banca examinadora, pelos conselhos e "empurrões" na direção certa.

Ao Prof. Dr. Sebastião Diógenes Pinheiro, quem primeiro me apresentou ao "mundo dos biofilmes". Obrigada pelos ensinamentos e pela inspiração para esta pesquisa.

Às professoras Dr^a. Rossana de Aguiar Cordeiro e Dr^a. Ana Karoline Freire da Costa, pela disponibilidade e boa vontade, pelo incentivo, sugestões e ensinamentos transmitidos na apresentação de qualificação do mestrado.

Aos professores Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira e Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, membros da banca examinadora, pela generosidade de aceitarem avaliar esta dissertação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica – UFC, em especial à professora Dr^a. Lília Maria Carneiro Câmara, pela dedicação, pelas trocas de ideias e oportunidades de aprendizado.

Ao Prof. Said Gonçalves da Cruz Fonseca e a todos do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará pela colaboração realizada com tanta generosidade.

À Dra. Teresa Bandeira e aos funcionários do setor de microbiologia do LabPasteur – Medicina Diagnóstica pela disposição a ajudar e pelo suporte técnico.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bedê Barros e ao pós-graduando Thiago de Melo Santiago do Laboratório de Microscopia Avançada do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará pela paciência nas longas horas de trabalho.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia, em especial aos meus "professores" José Olavo de Moraes e Bruno Jaegger Laranjeira, sem os quais esta conquista não teria sido possível. Obrigada pela ajuda e incentivo durante os experimentos, pela troca de experiências e conhecimento, e por toda a força e apoio que recebi nestes dois anos juntos.

Aos meus colegas de mestrado, pelas boas lembranças, sorrisos e abraços, conversas e conselhos, em particular a Msc. Erica Pacheco Caetano.

À Universidade Federal do Ceará e a todos seus funcionários, com menção especial à nossa supersecretária, Carolina Vilma Soares de Oliveira, pela disponibilidade, simpatia e auxílio indispensável em momentos fundamentais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para esta conquista e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da força e da confiança de cada um de vocês.

Considere a diferença de tamanho entre algumas das mais pequeninas e das maiores criaturas existentes na Terra. Uma pequena bactéria pesa tão pouco quanto 0.000000000001 grama. A baleia azul pesa cerca de 100.000.000 gramas. Mas mesmo assim uma bactéria é capaz de matar uma baleia. ... Tamanha é a capacidade de adaptação e a versatilidade dos microrganismos, quando comparados aos seres humanos e outros organismos tidos como “superiores”, que eles sem dúvida continuarão a colonizar e alterar a superfície da Terra ainda muito depois que nós e o resto de nossos co-habitantes tivermos deixado a cena para sempre. Os micróbios, e não os macróbios, dominam o mundo.

Bernard Dixon, 1994.

A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.

Horácio, 64 - 68 a.C.

RESUMO

Historicamente, as bactérias foram vistas como organismos que vivem isolados, no entanto, é claro, agora, que a grande maioria de bactérias existe em comunidades complexas, conhecidas como biofilmes. As bactérias em biofilmes se encontram aderidas a superfícies diversas, tanto abióticas como bióticas (dente, osso, mucosa), compondo um ecossistema altamente estruturado, dinâmico e organizado. Um exemplo de infecção que pode envolver a presença formação de biofilme é a otite - definida como inflamação aguda ou crônica da orelha, podendo se estender desde o epitélio do conduto auditivo externo até a orelha interna. Descrita como a doença mais comum do canal auditivo externo em cães, possui uma etiologia multifatorial, que inclui fungos e bactérias, principalmente do gênero *Staphylococcus*. Bactérias desse gênero são comensais de pele e mucosas, mas podem atuar como patógenos oportunistas em condições propícias e são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções em seres humanos e animais com vários relatos de refratariedade aos tratamentos usuais. Em um biofilme, as bactérias podem ser dezenas de vezes mais resistentes aos antibióticos, quando comparadas às mesmas bactérias em crescimento planctônico. O combate a infecções envolvendo bactérias em biofilme é um grande desafio da microbiologia mundial, que leva à busca de novas opções terapêuticas. Com efeito, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito inibitório *in vitro* de seis substâncias – três agentes antimicrobianos clássicos, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina; e três agentes antimicrobianos não-clássicos timol, carvacrol, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – contra cepas estafilocócicas de otite canina em crescimento planctônico e em biofilme. Foram avaliadas 54 cepas clínicas isoladas de secreção purulenta de cães com otite, divididas entre cinco espécies: *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis*. As 16 cepas classificadas como produtoras de biofilme (11 de *S. intermedius* e cinco de *S. simulans*), segundo resultado obtido pelo teste do ágar vermelho Congo e confirmação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram usadas em ensaios de microdiluição em caldo para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração inibitória mínima em biofilme (CIMB). Com relação às cepas produtoras de biofilme, foram observados os seguintes resultados: os valores para ciprofloxacina foram $0,12 \leq \text{CIM} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ (média $0,28 \mu\text{g/mL}$) e $0,5 \leq \text{CIMB} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ (média $1,79 \mu\text{g/mL}$); para cloranfenicol $2 \leq \text{CIM} \leq 16 \mu\text{g/mL}$ (média $7,41 \mu\text{g/mL}$) e $8 \leq \text{CIMB} \leq 32 \mu\text{g/mL}$ (média $20,71 \mu\text{g/mL}$); para gentamicina $0,5 \leq \text{CIM} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ (média $2,09 \mu\text{g/mL}$) e $4 \leq \text{CIMB} \leq 64 \mu\text{g/mL}$ (média $24,24 \mu\text{g/mL}$); para timol $32 \leq \text{CIM} \leq 512 \mu\text{g/mL}$ (média $137,41 \mu\text{g/mL}$) e $256 \leq \text{CIMB} \leq 2048 \mu\text{g/mL}$ (média $768 \mu\text{g/mL}$); carvacrol $32 \leq \text{CIM} \leq 512 \mu\text{g/mL}$ (média $128 \mu\text{g/mL}$) e $256 \leq \text{CIMB} \leq 4096 \mu\text{g/mL}$ (média $993,88 \mu\text{g/mL}$); e para H₂O₂ $32 \leq \text{CIM} \leq 128 \text{ ppm}$ (média $99,76 \text{ ppm}$) e $128 \leq \text{CIMB} \leq 4096 \text{ ppm}$ (média $1874,82 \text{ ppm}$). Os dados obtidos apontam para o potencial terapêutico dos seis antibióticos estudados no tratamento de infecções estafilocócicas associadas a biofilme, sendo necessários novos estudos para investigar os mecanismos de ação dessas drogas sobre o biofilme, bem como o delineamento de experimentos *in vivo* para confirmar a significância desses achados.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., biofilmes, ágar vermelho Congo, testes de sensibilidade microbiana, agentes antibacterianos, timol, carvacrol, peróxido de hidrogênio.

ABSTRACT

Historically, bacteria have been seen as isolated organisms; however, it is now clear that the vast majority of bacteria exist in complex communities known as biofilms. Bacteria in biofilms are adhered to various surfaces, both abiotic and biotic (teeth, bones, mucosa), often forming a highly dynamic ecosystem, which is structured and organized. An example of infection, which can involve the formation of biofilm is otitis - defined as an acute or chronic inflammation of the ear, which may extend from the external ear canal to the inner ear. Described as the most common disease of the external ear canal in dogs, it has a multifactorial etiology, including fungi and bacteria, especially of the genus *Staphylococcus*. Bacteria of this genus are commensal to skin and mucous membranes, but can act as opportunistic pathogens in favorable conditions and are often associated with a wide variety of infections in humans and animals with many reports of refractoriness to usual treatments. In biofilm, bacteria can be ten to a hundred times more resistant to antibiotics when compared to the same bacteria in planktonic growth. The struggle to fight infections involving bacterial biofilms is a major challenge of microbiology today, which, in turn, leads to the search for new therapeutic options. Thus, this study aimed to evaluate the in vitro inhibitory effect of six substances – three classic antimicrobial agents ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin; and three non-classic antimicrobial agents thymol, carvacrol, hydrogen peroxide (H₂O₂) - against staphylococcal strains from canine otitis in planktonic growth and in biofilm. We analyzed 54 clinical strains isolated from purulent secretion of canine otitis, divided into five species: *S. intermedius*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* and *S. lugdunensis*. The 16 strains classified as biofilm producers (11 *S. intermedius* and five *S. simulans*), according to result obtained by the Congo red agar test and confirmed by scanning electron microscopy (SEM), were used in broth microdilution assay for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC). With regards to the biofilm-producing strains, the following results were observed: the values for ciprofloxacin were $0,12 \leq \text{MIC} \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ (mean $0,28 \mu\text{g/mL}$) and $0,5 \leq \text{MBIC} \leq 8 \mu\text{g/mL}$ (mean $1,79 \mu\text{g/mL}$); for chloramphenicol $2 \leq \text{MIC} \leq 16 \mu\text{g/mL}$ (mean $7,41 \mu\text{g/mL}$) and $8 \leq \text{MBIC} \leq 32 \mu\text{g/mL}$ (mean $20,71 \mu\text{g/mL}$); for gentamicin $0,5 \leq \text{MIC} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ (mean $2,09 \mu\text{g/mL}$) and $4 \leq \text{MBIC} \leq 64 \mu\text{g/mL}$ (mean $24,24 \mu\text{g/mL}$); for thymol $32 \leq \text{MIC} \leq 512 \mu\text{g/mL}$ (mean $137,41 \mu\text{g/mL}$) and $256 \leq \text{MBIC} \leq 2048 \mu\text{g/mL}$ (mean $768 \mu\text{g/mL}$); carvacrol $32 \leq \text{MIC} \leq 512 \mu\text{g/mL}$ (mean $128 \mu\text{g/mL}$) and $256 \leq \text{MBIC} \leq 4096 \mu\text{g/mL}$ (mean $993,88 \mu\text{g/mL}$); and for H₂O₂ for $32 \leq \text{MIC} \leq 128 \mu\text{g/mL}$ (mean $99,76 \text{ ppm}$) and $128 \leq \text{MBIC} \leq 4096 \text{ ppm}$ (mean $1874,82 \text{ ppm}$). The presented data indicates the therapeutic potential of the six antibiotics studied in the treatment of staphylococcal infections associated with biofilm, which warrants further studies to investigate the mechanisms of action of these drugs on biofilms and the design of in vivo experiments to confirm the significance of these findings.

Keywords: *Staphylococcus* spp., biofilms, Congo red agar, microbial susceptibility tests, antibacterial agents, thymol, carvacrol, hydrogen peroxide.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Biofilmes	18
<i>1.1.1 A Formação do Biofilme</i>	<i>19</i>
<i>1.1.2 Quorum Sensing</i>	<i>21</i>
<i>1.1.3 A Matriz e a Arquitetura do Biofilme</i>	<i>22</i>
<i>1.1.4 Sistemas in Vitro para o Estudo de Biofilmes Bacterianos</i>	<i>23</i>
<i>1.1.5 A Resistência Bacteriana em Biofilme</i>	<i>25</i>
<i>1.1.6 Biofilmes de Mucosas</i>	<i>26</i>
1.2 Aspectos Gerais da Otite Canina	27
1.3 <i>Staphylococcus spp.</i>	30
<i>1.3.1 Staphylococcus spp. em Biofilme</i>	<i>33</i>
1.4 Perspectivas para a Prevenção e o Tratamento de Infecções por Biofilmes Bacterianos	33
<i>1.4.1 Estratégias Antibiofilmes</i>	<i>34</i>

2	PERGUNTAS DE PARTIDA	36
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	37
4	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo Geral	38
4.2	Objetivos Específicos	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1	Locais de Trabalho	39
5.2	Cepas Bacterianas	39
5.2.1	<i>Cepas Clínicas</i>	39
5.2.2	<i>Cepas de Referência</i>	40
5.3	Identificação Bacteriana por Automação	40
5.4	Caracterização Fenotípica da Produção de Biofilme	40
5.4.1	<i>Ágar Vermelho Congo</i>	40
5.4.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	42
5.5	Testes de Sensibilidade	43
5.5.1	<i>Teste de Sensibilidade Automatizado</i>	43
5.5.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela Técnica de Microdiluição</i>	44
5.5.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima em Biofilme (CIMB) pela Técnica de Microdiluição</i>	47
5.6	Análise Estatística	50
6	RESULTADOS	51
6.1	Identificação Bacteriana	51
6.2	Caracterização Fenotípica da Produção de Biofilme	52
6.2.1	<i>Ágar Vermelho Congo</i>	52
6.2.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	55

6.3	Testes de Sensibilidade	58
6.3.1	<i>Teste de Sensibilidade Automatizado</i>	58
6.3.2	<i>Determinação da CIM pela Técnica de Microdiluição</i>	59
6.3.3	<i>Determinação da CIMB pela Técnica de Microdiluição</i>	62
7	DISCUSSÃO	67
	CONCLUSÕES	85
	ANEXO	86
	Anexo I – Agentes Antimicrobianos, Meios de Cultura e Reagentes	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Biofilme de <i>S. aureus</i> formado sobre membrana filtrante capturado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	19
FIGURA 2.	Princípio de funcionamento do <i>quorum sensing</i> .	22
FIGURA 3.	Representação da redução da molécula de resazurina a resofurina.	25
FIGURA 4.	Biofilme bacteriano colonizando o tecido ciliado da mucosa nasal de um paciente com rinosinusite crônica.	27
FIGURA 5.	Cão apresentando quadro de otite externa com edema intenso da orelha e obstrução completa do conduto auditivo externo.	28
FIGURA 6.	Video-otoscopia de cão apresentando quadro de otite média com presença de secreção purulenta originada da orelha média drenado para o conduto auditivo externo.	29
FIGURA 7.	Morfologia de bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> spp. caracterizada por células esféricas agrupadas de forma irregular, remetendo a cachos de uvas.	30
FIGURA 8.	Escala de cores adotada para classificação das cepas positivas e utilizada na avaliação da coloração das colônias de cepas estafilocócicas pelo método do ágar vermelho Congo.	41
FIGURA 9.	Escala de cores adotada para classificação das cepas negativas e utilizada na avaliação da coloração das colônias de cepas estafilocócicas pelo método do ágar vermelho Congo.	41
FIGURA 10.	Cepas estafilocócicas crescidas por 48 horas sobre lâminas de vidro, após processo de metalização com cobertura de ouro, montadas para a visualização em microscópio eletrônico de varredura.	43
FIGURA 11.	Configuração esquemática das placas de microtitulação com 96 poços para os testes de microdiluição em caldo.	46
FIGURA 12.	Leitura visual do teste de microdiluição com resazurina.	47

FIGURA 13.	Leitura visual da resazurina em placa de microdiluição.	49
FIGURA 14.	Cepas clínicas de <i>Staphylococcus</i> spp. não-produtoras de biofilme crescidas sobre ágar vermelho Congo.	52
FIGURA 15.	Cepas clínicas de <i>Staphylococcus</i> spp. produtoras de biofilme crescidas sobre ágar vermelho Congo.	53
FIGURA 16.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 cultivada em ágar vermelho Congo e caracterizada como cepa positiva devido à coloração enegrecida das colônias, indicando a capacidade de produção de biofilme.	55
FIGURA 17.	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 cultivada em ágar vermelho Congo e caracterizada como cepa negativa devido à coloração avermelhada das colônias, indicando que a cepa não produz biofilme.	55
FIGURA 18.	<i>S. intermedius</i> 21OEE cultivada em ágar vermelho Congo e caracterizada como cepa positiva devido à coloração enegrecida das colônias, indicando a capacidade de produção de biofilme.	56
FIGURA 19.	<i>S. simulans</i> 08 OEE cultivada em ágar vermelho Congo e caracterizada como cepa negativa devido à coloração avermelhada das colônias, indicando que a cepa não produz biofilme.	56
FIGURA 20.	Imagem de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes.	57
FIGURA 21.	Imagem de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes.	57
FIGURA 22.	Imagem de <i>S. intermedius</i> 21OEE capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes.	58
FIGURA 23.	Imagem de <i>S. simulans</i> 08 OEE capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes.	58
FIGURA 24.	Estrutura química das moléculas de carvacrol e timol.	78
FIGURA 25.	Meio ágar sangue, preparado a partir da adição de sangue de carneiro à solução de BHI Agar, colonizado por cepa de <i>S. intermedius</i> .	94
FIGURA 26.	Componentes do meio ágar vermelho Congo.	95

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. Valores dos pontos de corte, em $\mu\text{g/ml}$, para sensibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp. usados no teste de sensibilidade a antibióticos por automação 44
- QUADRO 2. Concentrações, em $\mu\text{g/ml}$, dos antimicrobianos usados no teste de concentração inibitória mínima por microdiluição 45
- QUADRO 3. Valores dos pontos de corte, em $\mu\text{g/ml}$, para sensibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp. usados no teste de sensibilidade a antibióticos por microdiluição 46
- QUADRO 4. Concentrações, em $\mu\text{g/ml}$, dos antimicrobianos usados no teste de concentração inibitória mínima em biofilme por microdiluição 48
- QUADRO 5. Valores de concentrações encontradas em formulações comerciais de uso otológico para os antibióticos ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Distribuição das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. identificadas pelo sistema de automação Vitek2.	51
TABELA 2.	Classificação fenotípica da produção de biofilme pelo teste do ágar vermelho Congo das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp.	54
TABELA 3.	Cepas resistentes de <i>Staphylococcus</i> spp. reconhecidas pelo sistema de automação Vitek2.	59
TABELA 4.	Valores de concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme definidos por microdiluição em caldo, em µg/mL, para cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. produtoras de biofilme.	61
TABELA 5.	Valores médios de concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme definidos por microdiluição em caldo, em µg/mL, para todas as cepas produtoras de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp., e para as espécies <i>S. intermedius</i> e <i>S. simulans</i> , separadamente.	62
TABELA 6.	Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. com padrões de sensibilidade inalterados para concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme, em µg/mL, pela técnica de microdiluição.	64
TABELA 7.	Cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. com valores de concentração inibitória mínima em biofilme 64 vezes maior do que valores de concentração inibitória mínima, pela técnica de microdiluição.	65
TABELA 8.	Taxas médias de aumento entre a concentração inibitória mínima e a concentração inibitória mínima em biofilme para todas as cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. produtoras de biofilme.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC – Coleção americana de tipos de cultura (*American Type Culture Collection*)
- ATP – Adenosina trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)
- AvC – Ágar vermelho Congo
- BHI – Infusão cérebro coração (*Brain Heart Infusion*)
- CIM – Concentração inibitória mínima
- CIMB – Concentração inibitória mínima em biofilme
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CNS – Estafilococo coagulase-negativo (*Coagulase Negative Staphylococcus*)
- CPS – Estafilococo coagulase-positivo (*Coagulase Positive Staphylococcus*)
- CTC – Cloreto de tetrazólio 5-ciano-2,3-ditolil
- DMMB – Azul de dimetilmetileno (*Dimethyl Methylene Blue*)
- DNA – Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- EEUU – Estados Unidos da América
- EPS – Exopolissacarídeo (*Extracellular Polymeric Substance*)
- GP – Gram-positivo
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- ISO – Organização Internacional de Padronização (*International Standard Organization*)
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MH – Mueller Hinton
- NPB – Não-produtor de biofilme
- OEC – Otite externa crônica

OED	–	Otite externa direita
OEE	–	Otite externa esquerda
OMD	–	Otite média direita
OME	–	Otite média esquerda
PB	–	Produtor de biofilme
pCO ₂	–	Pressão parcial de CO ₂ (gás carbônico)
PBS	–	Tampão salina fostato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PIA	–	Polissacarídeo intercelular adesina
pO ₂	–	Pressão parcial de O ₂ (oxigênio)
ppm	–	Partes por milhão
PS/A	–	Polissacarídeo/adesina
QS	–	Percepção de <i>quorum</i> (<i>Quorum Sensing</i>)
SIG	–	Grupo <i>Staphylococcus intermedius</i> (<i>Staphylococcus intermedius Group</i>)
VP	–	Voges-Proskauer
XTT	–	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino) carbonil] - 2H-tetrazólio hidróxido

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Biofilmes

A percepção de bactérias como organismos unicelulares baseia-se essencialmente no conceito de culturas puras, nas quais as células podem ser diluídas e estudadas em culturas líquidas. Historicamente, as bactérias foram vistas como organismos isolados, no entanto, agora, é claro que a grande maioria de bactérias existe em comunidades complexas, conhecidas como biofilmes (POST et al., 2007). Como praticamente todos os conceitos e conhecimentos microbiológicos foram adquiridos a partir do estudo de organismos em culturas puras, somente há alguns anos se começou a entender que, na realidade, a maioria das bactérias na natureza se encontra vivendo nessas comunidades, de maior ou menor estruturação.

O conceito de bactérias que vivem num contexto de comunidade, no lugar de simplesmente entidades autônomas ganha rápida aceitação entre a comunidade científica (APARNA; YADAV, 2008). Somente a partir da década de 1970, no entanto, começou-se a perceber que bactérias em biofilme (bactérias sésseis) são um componente importante da biomassa bacteriana em diversos ambientes; e apenas nos anos 1980 e 1990 percebeu-se que as bactérias, em biofilme, se organizam de forma tão elaborada (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999).

O tipo de "ecologia" que se imaginava em relação aos procariotos – células individuais crescendo de maneira planctônica (bactérias livres) raramente é encontrado na natureza. Aproximadamente 80% da biomassa microbiana do mundo residem como populações de biofilme (RICHARDS; MELANDER, 2009).

Sabe-se atualmente que, em seu hábitat natural, via de regra, as bactérias são encontradas em biofilmes de graus diferentes de complexidade, aderidas a superfícies diversas, geralmente compondo um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada. Praticamente todas as bactérias podem crescer como biofilme; e biofilmes podem ser encontrados em ecossistemas naturais, experimentais (FIGURA 4) e patológicos (CERI; OLSON; TURNER, 2010; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; LEMON et al., 2008).

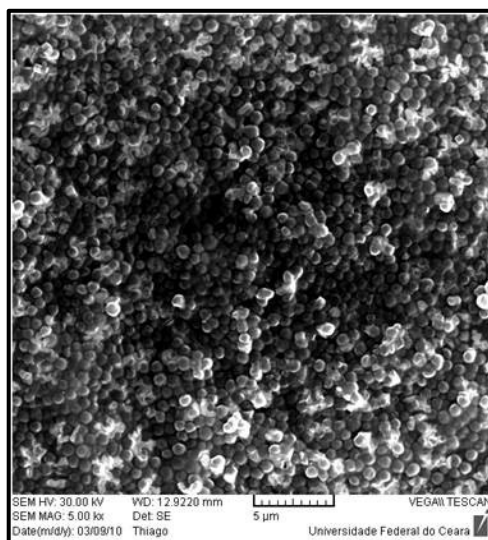


FIGURA 1. Biofilme de *S. aureus* formado sobre membrana filtrante capturado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Fonte: Moreira, 2010.

1.1.1 A Formação do Biofilme

Os biofilmes são formados por populações sésseis em várias camadas, desenvolvidas com origem em uma única ou múltiplas espécies, incorporadas a uma matriz polimérica extracelular, que se encontram irreversivelmente aderidas a uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Três elementos básicos se destacam: microrganismos, matriz e superfície. Se um desses elementos não está presente, um biofilme maduro não pode se desenvolver (APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; TOTÉ et al., 2008).

Biofilmes bacterianos compartilham de várias características comuns; como, por exemplo: (i) as células são mantidas juntas por uma matriz extracelular, composta principalmente de exopolissacarídeo (EPS), proteínas e ácidos nucleicos; (ii) o desenvolvimento de biofilme ocorre em resposta a sinais extracelulares, tanto ambientais quanto de origem bacteriana; (iii) os biofilmes protegem as bactérias de uma ampla e diversificada variedade de estresses ambientais, como antibióticos, predadores naturais e do sistema imunológico de hospedeiros (JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; LEMON et al. 2008; ROVETA et al., 2007).

Biofilmes, como outras comunidades, surgem de forma gradual ao longo do tempo. O desenvolvimento de biofilme em superfícies é um processo dinâmico que envolve etapas de adesão, produção do EPS, crescimento e desprendimento (APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

Há um ciclo universal, de cinco etapas, do crescimento de um biofilme, independentemente do fenótipo dos microrganismos envolvidos. Fase 1 é a fase de fixação que pode levar apenas alguns segundos para ser ativada e é provavelmente induzida por sinais ambientais. Estes sinais variam de acordo com os diferentes organismos, mas eles incluem mudanças de nutrientes e concentrações de nutrientes, do pH, da temperatura, da concentração de oxigênio, da pressão osmótica e da oferta de ferro. Inicialmente, há microrganismos denominados colonizadores primários, que aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. A ligação inicial desta fase é reversível. As células aderidas passam a se multiplicar numa taxa de crescimento logarítmica, originando microcolônias que sintetizam uma matriz rica em EPS, que passa a atuar como substrato para a aderência de novos microrganismos chamados de colonizadores secundários. A fase 2 é caracterizada pela ligação irreversível com a superfície e começa apenas minutos após o início da fase 1. Após esta adesão, as bactérias continuam a multiplicar-se, enquanto emitem sinais químicos que fazem a "comunicação" entre as células do biofilme. Assim que o sinal atinge uma intensidade superior a um certo limiar, mecanismos genéticos subjacentes à produção de EPS são ativados, permitindo a interceptação de nutrientes e mais células planctônicas. Durante a fase 2, grandes agregados são formados e a motilidade diminui em decorrência do empilhamento progressivo das camadas de células. O ciclo passa então para a fase 3, uma etapa de crescimento, também conhecida como fase de maturação 1. Após atingir uma espessura final, específica para cada biofilme, mas geralmente maior do que 100µm, chega-se à fase 4 ou fase de maturação 2, quando o biofilme atinge sua estrutura tridimensional mais complexa. A fase final 5 é o momento de desprendimento e dispersão de bactérias do biofilme. Esta fase se inicia vários dias após o começo da fase 4. As bactérias liberadas podem colonizar outras regiões/superfícies, formando novos biofilmes. Tal como acontece com as etapas anteriores, a dispersão é muito influenciada por estímulos ambientais (APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; KARATAN; WATNICK, 2009).

1.1.2 Quorum Sensing

Para que um biofilme de uma ou várias espécies seja formado, é necessário o estabelecimento de um comportamento multicelular, que se reflete em atividades coordenadas de interação e comunicação dos vários organismos. Assim, os biofilmes não são simples camadas viscosas contendo organismos, mas sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas (FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; KARATAN; WATNICK, 2009).

Um dos mecanismos de comunicação interbacteriana que se mostra muito importante na formação e desenvolvimento de biofilmes corresponde ao *quorum sensing* (QS), ou percepção de quorum ou densidade celular. Muito do desenvolvimento e integridade estrutural do biofilme é dependente de QS, que é sobretudo uma maneira pela qual moléculas extracelulares autoindutoras melhoram a comunicação entre as bactérias a partir de uma certa densidade populacional. Estas moléculas de comunicação intercelular, produzidas por bactérias e fungos, são análogas às citocinas produzidas pelas células de mamíferos. A viabilidade do biofilme é dependente do equilíbrio entre a expressão de genes de resposta e da sinalização intercelular por meio de QS (APARNA; YADAV, 2008; DONGARI-BATZOGLOU, 2008; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; KARATAN; WATNICK, 2009).

O princípio do QS é simples: quando uma só bactéria libera um autoindutor no ambiente, sua concentração é muito baixa para ser detectada; no entanto, quando um número suficiente de bactérias está presente, a concentração de autoindutores alcança um nível suficiente para fazer com que as células respondam ao estímulo, ativando ou reprimindo os genes-alvo (FIGURA 5). Desta forma, este sistema permite que as bactérias coordenem seu comportamento de acordo com as condições do ambiente. Isto inclui adaptação à disponibilidade de nutrientes, defesa contra outros microrganismos, que podem competir pelo mesmo nutriente ou ambiente, proteção contra componentes tóxicos, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, formação de biofilmes e outros (HARDMAN et al., 1998).

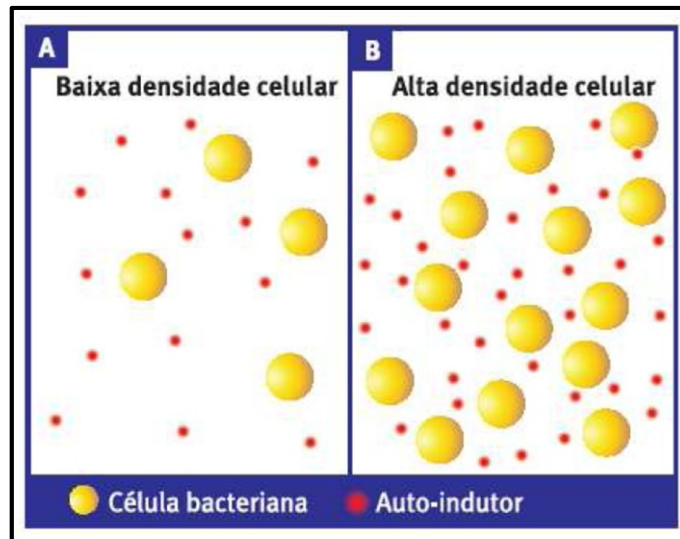


FIGURA 2. Princípio de funcionamento do *quorum sensing*: se há poucas bactérias (A), a concentração de auto-indutores é baixa e não detectável; mas se a densidade populacional aumenta (B), essa concentração atinge um limiar a partir do qual tais moléculas passam a ser detectáveis. Fonte: Figura adaptada de Hardman et al., 1998.

1.1.3 A Matriz e a Arquitetura do Biofilme

As bactérias em biofilme coordenam o seu comportamento, resultando na formação de complexas estruturas tridimensionais. As características visuais do biofilme crescendo em diversos ambientes são muito semelhantes, indicando que existem importantes estratégias de sobrevivência alcaçadas, em parte, pela especialização estrutural (HALL-STOODLEY et al., 2004). A estrutura tridimensional do biofilme pode ser plana ou em forma de cogumelo. O formato do biofilme é influenciado por fontes de nutrientes e estímulos mecânicos. Está bem estabelecido o fato de que as bactérias podem se adaptar a alterações do ambiente (KARATAN; WATNICK, 2009).

A arquitetura tridimensional clássica do biofilme maduro é em forma de cogumelo e tem três componentes básicos: (i) microcolônias aderidas ao (ii) substrato/superfície e envoltos por (iii) EPS, que responde por 50% a 90% do carbono orgânico da matriz. Muitos "cogumelos" juntos resultam em uma arquitetura complexa, com canais de fluxo entre o aglomerados de bactérias. Os canais de fluxo dos biofilmes podem ser comparados a um sistema circulatório primitivo, permitindo a troca de nutrientes e metabólitos, assim como a

remoção de substâncias potencialmente tóxicas (APARNA; YADAV, 2008; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

Apesar de certos componentes serem comuns aos biofilmes, porém, estas estruturas dinâmicas sofrem a influência do local onde o biofilme é formado, da relação dos microrganismos envolvidos e o possível hospedeiro e seu sistema imunológico, das condições físicas em que se encontra (temperatura, umidade, tensão mecânica, etc) (APARNA; YADAV, 2008).

1.1.4 Sistemas in Vitro para o Estudo de Biofilmes Bacterianos

As bactérias residentes em biofilme possuem uma série de características distintas daquelas em sua forma planctônica (DONLAN; COSTERTON, 2002). Incluem um padrão diferente de expressão gênica e resistência aumentada à ação dos antibióticos, assim como aos efeitos da imunidade inata e adquirida do hospedeiro. A eficácia reduzida dos antibióticos contra bactérias dentro do biofilme traz à tona a necessidade de novas estratégias de diagnóstico, terapêutica e prevenção (ARCIOLA et al., 2002; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

As técnicas usuais para o estudo de agentes antimicrobianos ante a bactérias na sua forma planctônica não são adequadas para ação contra bactérias em biofilme. Nas últimas décadas, várias técnicas foram propostas e avaliadas para o estudo dos biofilmes *in vitro* (ARCIOLA et al., 2002; CERI et al., 1999; FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989; LEMON et al., 2008; OKAJIMA et al., 2006; PALOMINO et al., 2002; PEETERS et al., 2008; PETTIT et al., 2005; ROVETA et al., 2007; STOODLEY et al., 2005).

O passo inicial corresponde estudos dos componentes envolvidos na formação de biofilme e para os testes que detectam esse potencial marcador de virulência. Em razão da necessidade de um método simples para a detecção de biofilme, vários estudos foram realizados (CHRISTENSEN et al., 1982; FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989; LEMON et al., 2008; PETTIT et al., 2005; STEPANOVIC et al., 2000).

O primeiro método de rotina utilizado para detectar a produção de biofilme em isolados bacterianos foi o "método do tubo" (também conhecido como método de Christensen) proposto por Christensen et al. (1982), mas este nem sempre foi bem-sucedido na detecção de cepas com produção fraca de biofilme, sofrendo também a influência de variações no preparo do meio. Em 1989, o método ágar vermelho Congo (AvC) foi proposto

como alternativa para a detecção da produção de biofilme, alegando ser mais confiável do que o método de Christensen (ARCIOLA et al., 2002; FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989; JAIN; AGARWAL, 2009).

O método fenotípico clássico mais utilizado para detectar a produção de biofilme em espécies estafilocócicas é o teste com placas de AvC (ARCIOLA et al., 2002; JAIN; AGARWAL, 2009). O teste do AvC é realizado em meio sólido, o ágar vermelho Congo. O corante vermelho Congo evidencia a formação de EPS, dando a este uma pigmentação preta. A análise direta das colônias formadas no meio sólido permite o reconhecimento das cepas produtoras de biofilme, caracterizadas por colônias de coloração preta, e de cepas não produtoras de slime, caracterizadas por colônias de cor vermelha (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). Assim, o ensaio não é quantitativo, e sim baseado em uma avaliação cromática, por vezes subjetiva (ARCIOLA et al., 2002).

Na última década, novos métodos moleculares desenvolvidos trouxeram evidência direta, com base genética, da produção de biofilme, desde a descoberta do operon *ica*, diretamente relacionado com a produção de EPS (ARCIOLA et al., 2002). A precisão do método do AvC para a detecção da produção de biofilme já foi avaliada não só por métodos de biologia molecular, como também empregando ensaios com placa de microtitulação quantitativa. Nos últimos anos, vários ensaios para quantificação do biofilme em microplacas foram descritos (ARCIOLA et al., 2002; JAIN; AGARWAL, 2009).

Peeters et al. (2008) classificam estes ensaios em três classes. (A) Ensaios que avaliam a biomassa do biofilme (incluindo matriz, células vivas e mortas). O cristal violeta é um corante básico que se liga a moléculas carregadas negativamente e a polissacarídeos na matriz. Como as células (vivas ou mortas), assim como a matriz, são coradas pelo cristal violeta, este método não é adequado para avaliar a ação de drogas sobre células do biofilme (avaliação da morte celular). Já o Syto 9 é um corante fluorogênico de ácido nucléico que se difunde passivamente através das membranas celulares e se liga ao DNA de ambas as células vivas e mortas. Como o DNA faz parte também da matriz extracelular, o corante fornecerá informações sobre a biomassa do biofilme. (B) Ensaios que avaliam a matriz do biofilme. O corante DMMB, originalmente usado na quantificação de glicosaminoglicanas de cultura de condrócitos, também já foi aplicado com sucesso na quantificação da matriz de biofilme de *S. aureus*. (C) Ensaios que avaliam atividade biológica do biofilme. Para distinguir células vivas, de células mortas, nos ensaios de sensibilidade, técnicas de quantificação baseadas na atividade metabólica das células foram recomendadas e são usados vários corantes, como os sais de tetrazolina (CTC, XTT), resazurina.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um indicador fluorescente e colorimétrico com propriedade redox. A forma oxidada é azul e não fluorescente, e é reduzida por células metabolicamente ativas a resofurina que é rosa e fluorescente (FIGURA 7). Inicialmente usado para ensaios com células mamárias, já foi empregado com sucesso em vários estudos de sensibilidade para fungos e bactérias, incluindo *S. epidermidis* (PALOMINO et al., 2002; PEETERS et al., 2008; PETTIT et al., 2005)

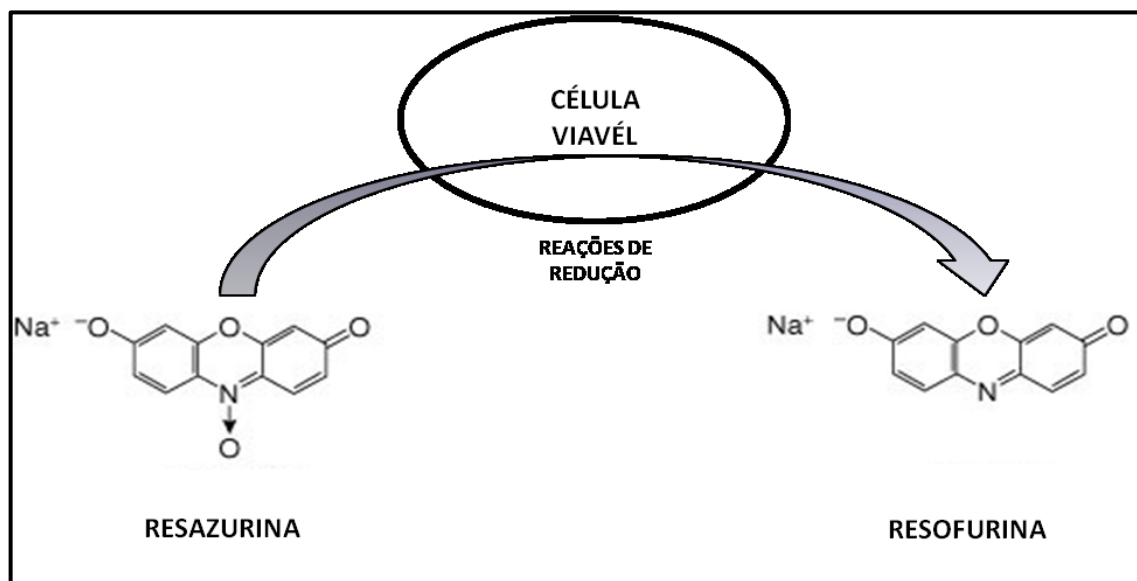


FIGURA 3. Representação da redução da molécula de resazurina a resofurina. Fonte: Figura adaptada de www.promega.com.

1.1.5 A Resistência Bacteriana em Biofilme

Até o momento, a maioria das doenças infecciosas é tratada eficientemente com antibióticos, entretanto, de acordo com as pesquisas mais recentes, sabe-se que tal tipo de estratégia pode ser ineficaz em duas situações: (1) com organismos exibindo resistência inata à droga e (2) em bactérias presentes em biofilmes (CERI; OLSON; TURNER, 2010; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; OLIVEIRA et al., 2008; OLSON et al., 2002). Em um biofilme, as bactérias podem ser dezenas de vezes mais resistentes a um antibiótico, quando comparadas às mesmas células planctônicas, embora os mecanismos envolvidos nesta resistência sejam ainda pouco conhecidos. 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 protéica, outros induzidos não em resposta à limitação nutritiva, mas respondendo ao crescimento em biofilme. 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 (CERI; OLSON; TURNER, 2010; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; GOTZ, 2002; HALL-STOODLEY et al., 2004; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; JAIN; AGARWAL, 2009)

Infecções associadas a biofilmes, geralmente, são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, as bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; HALL-STOODLEY et al., 2006;. POST et al., 2007).

1.1.6 Biofilmes de Mucosas

O significado clínico dos biofilme foi observado pela primeira vez em infecções relacionadas com dispositivos implantados (DONLAN; COSTERTON, 2002; HALL-STOODLEY et al., 2006). Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes incluem as infecções de implantes tais como válvulas cardíacas, cateteres, lentes de contato, etc. Os biofilmes, no entanto, podem ainda promover doenças se formados em tecidos vivos. A expressão "biofilme de mucosas" foi primeiro cunhada por Garth Ehrlich e descreve biofilmes que crescem sobre superfícies mucosas (POST et al., 2007). Biofilmes de mucosas estão envolvidos em uma ampla variedade de infecções humanas (DONGARI-BAGTZOGLU, 2008). Propostas de critérios clínicos de infecções por biofilme de mucosas incluem: sinais e sintomas de infecção com culturas negativas, cronicidade ou recorrência periódica com

exacerbações clínicas e remissões, e pouca ou nenhuma resposta aos antimicrobianos (STOODLEY et al., 2005). A 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 (FIGURA 6), 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-BAGTZOGLU, 2008; POST et al., 2007).

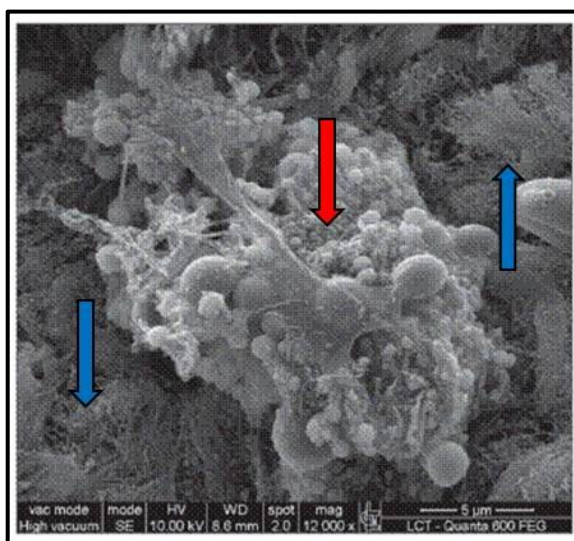


FIGURA 4. Biofilme bacteriano (seta vermelha) colonizando o tecido ciliado (setas azuis) da mucosa nasal de um paciente com rinossinusite crônica. Fonte: Bezerra et al., 2009.

1.2 Aspectos Gerais da Otite Canina

A otite canina é a afecção resultante de qualquer inflamação da orelha de cães envolvendo numerosos agentes etiológicos e fatores predisponentes que se relacionam ou não com o desencadear de um processo infeccioso. Assim sendo, o quadro clínico de otite abrange desde inflamações na porção externa do pavilhão auricular até complicações envolvendo o sistema vestibulo-coclear na orelha interna, não importando sua gravidade ou extensão (LEITE, 2000). As otites caninas podem ser classificadas, quanto à localização da inflamação, em otite externa, média ou interna e, quanto a sua evolução, como aguda, crônica ou recidivante (OLIVEIRA et al., 2006).

A otite externa é a doença mais comum do canal auditivo externo em cães (FIGURA 1), com uma etiologia multifatorial, que inclui fungos, parasitas e bactérias, principalmente do gênero *Staphylococcus* (CARDOSO et al., 2010; LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008). Uma definição de otite externa canina ainda amplamente aceita é: uma inflamação aguda ou crônica do epitélio do conduto auditivo externo (LOGAS, 1994; OLIVEIRA et al., 2008).



FIGURA 5. Cão apresentando quadro de otite externa com edema intenso da orelha e obstrução completa do conduto auditivo externo (seta vermelha). Fonte: www.olatheanimalhospital.com.

A otite externa crônica (OEC) é uma infecção contínua ou recorrente, acometendo o conduto auditivo externo por um período igual ou superior a seis meses. É a mais amplamente estudada por sua maior relevância na prática clínica veterinária, uma vez que é a classificação de cerca de 80% dos casos de otite animal (LOGAS, 1994; OLIVEIRA et al., 2006).

A otite média engloba alterações desde a membrana timpânica até cavidades anexas à tuba auditiva, envolvendo principalmente a mucosa da orelha média (FIGURA 2). Muitas vezes, é decorrente de um quadro agressivo de OEC que causa a ruptura da barreira natural que é o tímpano e passa a envolver também a caixa timpânica (COLE et al., 1998; LEITE, 2003). Entende-se, com efeito, que a otite média pode ser causada por uma OEC e, ao mesmo tempo, se não tratada adequadamente, pode agir como fator perpetuante da otite externa. Portanto, tornam-se de enorme importância o diagnóstico e o tratamento, tanto da otite externa quanto da otite média (COLE et al., 1998; COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000; LEITE, 2000; OLIVEIRA et al., 2006).

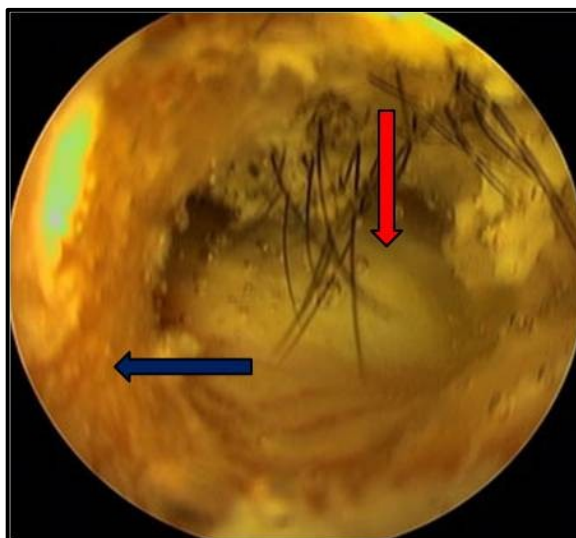


FIGURA 6. Video-otoscopia de cão apresentando quadro de otite média com presença de secreção purulenta (seta vermelha) originada da orelha média drenando para o conduto auditivo externo (seta azul). Fonte: www.olatheanimalhospital.com.

Muitos estudos descrevem o perfil de isolamento microbiológico e de sensibilidade a antimicrobianos da otite canina (COLE et al., 1998; COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000; LEITE, 2003; LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; VANNI et al., 2009; WERCKENTHIN et al., 2001). O isolamento bacteriano com base em amostras clínicas de otite externa canina é variável quanto aos microrganismos identificados, incluindo fungos e bactérias. A maioria dos cães com otite tem uma infecção mista com dois ou mais agentes etiológicos envolvidos. Os microrganismos mais frequentemente isolados de otite externa canina são *Malassezia pachydermatis*, levedura, e *Staphylococcus intermedius*, embora muitos outros agentes tenham sido descritos (CARDOSO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008). Outras espécies de *Staphylococcus* também frequentemente isolados de OEC canina incluem: *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. lentus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. saccharalyticus*, *S. warneri*, e *S. xylosus* (LEITE, 2003; LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008).

Em cães, *Staphylococcus intermedius* tem sido descrita como a espécie de coco mais frequentemente isolada (LILENBAUM et al., 2000). Há um interesse crescente em *S. intermedius* isolados nestes animais, principalmente considerando o potencial zoonótico evidente desta espécie (GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

O tratamento usual para as otites caninas envolve o uso de antimicrobianos, associados ou não a anti-inflamatórios. Muitos dos microrganismos envolvidos neste tipo de infecção, porém, variam em sua sensibilidade aos antibióticos, podendo apresentar elevadas taxas de resistência (CARDOSO et al., 2010; LILENBAUM et al., 2000; MORRIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). Apesar dos avanços na abordagem terapêutica, a OEC canina continua a ser, em muitos casos, refratária ao tratamento farmacológico, em razão da complexidade dos agentes etiológicos e do surgimento de resistência a antibióticos entre as espécies bacterianas envolvidas (OLIVEIRA et al., 2008).

1.3 *Staphylococcus* spp.

Os estafilococos – do grego *staphyle* (uvas em cacho) e *cocos* (grão) – são cocos Gram-positivos, imóveis, de 0,5-1,5µm, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva (FIGURA 3). Crescem bem nos meios de cultura mais comuns, como o caldo simples ou ágar simples, pH 7,0, a temperatura ótima de 37 °C. Em placa contendo ágar simples, após 24 horas de incubação a 37 °C, *Staphylococcus* spp. produzem colônias de cerca de 1-3 mm de diâmetro, convexas, de superfície livre e bordos circulares, opacas e brilhantes. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, e nisso se diferenciam dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (BAIRD-PARKER, 1990; KLOOS; BANNERMAN, 2003).

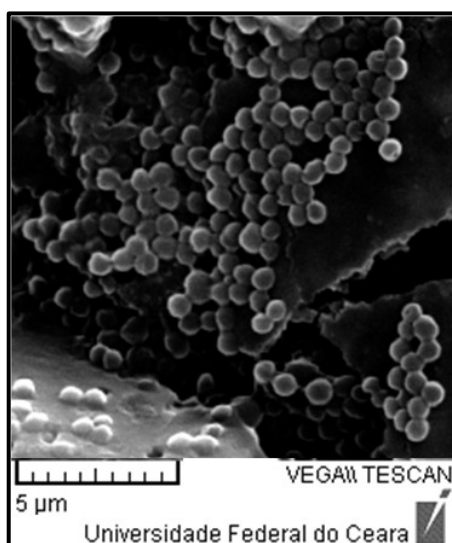


FIGURA 7. Morfologia de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. caracterizada por células esféricas agrupadas de forma irregular, remetendo a cachos de uvas. Fonte: Moreira, 2010.

A classificação taxonômica do gênero é:

Reino: Monera

Filo: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordem: Bacillales

Família: Staphylococcaceae

Família: Micrococcaceae

Gênero: *Staphylococcus*

(HOLT et al., 1994; LINDSAY, 2008)

Existem mais de 50 espécies e subespécies de *Staphylococcus* descritas atualmente, mas sua taxonomia está em constante evolução. Normalmente, são comensais de pele e mucosas; mas é interessante notar que, embora algumas espécies permaneçam sempre como tais, outras podem atuar como patógenos oportunistas em condições propícias e são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções oportunistas locais ou sistêmicas, em seres humanos e animais (ARCIOLA et al., 2002; GOTZ, 2002; JAIN; AGARWAL, 2009; PETTIT et al., 2005; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; VANNI et al., 2009).

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus* e *S. epidermidis* (na área médica), ou *S. simulans* e *S. intermedius* (na área veterinária) são rotineiramente associadas a infecções graves, muitas vezes em associação com a implantação de dispositivos médicos, como cateteres, válvulas e próteses (ARCIOLA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008; PETTIT et al., 2005). Membros desse gênero são frequentemente encontrados em cães saudáveis e doentes, produzindo uma variedade de condições, incluindo bacteremia, pneumonia, abscessos, piodermites, conjuntivite e otite externa (KLOOS; BANNERMAN, 2003; LINDSAY, 2008; OLIVEIRA et al., 2008)

O gênero é, comumente, dividido em estafilococos coagulase-positivos (CPS) e estafilococos coagulase-negativos (CNS), com base em sua capacidade de produção de coagulase e coagular plasma. Existem apenas sete espécies de CPS, *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp.coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius*, sendo a maioria das espécies do gênero CNS (KLOOS; BANNERMAN, 2003; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; SASAKI et al., 2007).

Staphylococcus simulans é um CNS, dificilmente encontrado na pele humana, mas é patógeno comum de gado bovino, ovino e animais domésticos, sendo considerada uma das

principais espécies de CNS na mastite bovina. Existem raros relatos de infecções humanas graves causadas pelo *S. simulans*, que, ao contrário de outros CNS, é bastante agressivo e tende a causar infecções que se assemelham àquelas causadas por *S. aureus*. Alguns autores argumentam que a escassez de diagnósticos de infecções humanas por *S. simulans* não decorre apenas do fato de que a espécie é um colonizador infrequente da pele humana, mas também em razão da prática comum de muitos laboratórios de microbiologia de não identificar CNS até o nível de espécie (BARNHAM et al. 1996; MALES; BARTHOLOMEW; AMSTERDAM, 1985; PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009; VALLIANOU et al., 2008).

Até 1976, quando *Staphylococcus intermedius* foi descrito como nova espécie de estafilococo isolada de pombos, cães, visons, gatos e cavalos, todas as cepas de CPS eram identificadas como *S. aureus*. A espécie foi nomeada de forma a refletir o compartilhamento de propriedades fenotípicas com outras duas espécies: *S. epidermidis* e *S. aureus*. Reconhecida como parte da microbiota normal da pele de várias espécies animais, especialmente em cães, *S. intermedius* foi também identificada como importante patógeno (AUTHIER et al., 2006; HAJEK, 1976; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; KEMPKER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008; SASAKI et al., 2007). A compreensão molecular da espécie, no entanto, continua a evoluir (BANNOEHR et al., 2007; KEMPKER et al., 2009). Diferenças fenotípicas e genotípicas encontradas entre isolados de *S. intermedius* motivaram estudos recentes que analisaram, mediante ensaio de filogenética molecular, se na verdade não existe um grupo *S. intermedius* (SIG). O SIG seria composto de quatro diferentes espécies: *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini* grupo A e *S. delphini* grupo B. Embora haja uma tendência recente na literatura a referir-se aos isolados de cães, mesmo que anteriormente identificados como *S. intermedius*, como *S. pseudintermedius*, nenhuma mudança oficial na nomenclatura atual foi realizada (BANNOEHR et al., 2009; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; KEMPKER et al., 2009; SASAKI et al., 2007).

Apesar de relatos de infecções humanas por *S. intermedius*, decorrentes de transmissão entre cães e seus proprietários, já terem sido notificados, a espécie é raramente isolada em seres humanos, mesmo entre indivíduos com exposição frequente a animais (GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008; KEMPKER et al., 2009)

1.3.1 Staphylococcus spp. em Biofilme

Desde as observações iniciais de que algumas espécies de estafilococos produziam EPS, grande volume de estudos se dedica a avaliar a importância clínica do biofilme como indicador de potencial de virulência. Existem vários relatos de produção de biofilme em estafilococos isolados de relevância clínica (ARCIOLA et al., 2002; FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989; OLSON et al, 2002; OTTO, 2008; WERCKENTHIN et al., 2001). O potencial de crescimento em biofilme é frequentemente citado como um dos importantes fatores de virulência microbiana encontrados em estafilococos (DONLAN; COSTERTON, 2002; GOTZ, 2002; JAIN; AGARWAL, 2009; OTTO, 2008). A base genética e molecular de formação de biofilme em estafilococos é multifacetada. A marca é a produção da substância PIA (polissacarídeo intercelular adesina), codificado por operon *ica*, em especial pelos genes *icaA* e *icaD* (ARCIOLA et al., 2002; OTTO, 2008).

1.4 Perspectivas para a Prevenção e o Tratamento de Infecções por Biofilmes Bacterianos

Os antibióticos revolucionaram o estado de saúde da humanidade, permitindo o tratamento de infecções anteriormente fatais. Entretanto, o arsenal atual de antibióticos disponíveis foi desenvolvido com o objetivo de matar ou impedir o crescimento de bactérias livres, sendo o tratamento das doenças infecciosas crônicas e recorrentes focado no uso desses antibióticos. Infelizmente, o uso constante de antibióticos provocou uma série de problemas, dentre os quais se destacam o desequilíbrio da microbiota humana e a resistência microbiana, fazendo com que se busquem novos antibióticos (FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; SARKER; NAHAR; KUMRASAMY, 2007).

Microrganismos, todavia, fazem uso de estratégias de sobrevivência, tais como o crescimento em biofilme, e driblam a ação dos antibióticos (DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002; MANNING, 2003; POST et al., 2007; ROVETA et al., 2007). Portanto, estratégias, que funcionam bem contra bactérias na sua forma livre, costumam funcionar mal contra bactérias na sua forma sésil (POST et al., 2007). Conseqüentemente, torna-se necessário o desenvolvimento de agentes que tenham ação contra biofilmes.

1.4.1 Estratégias Antibiofilmes

Os biofilmes estão envolvidos numa grande variedade de infecções diferentes, e muitas vezes contribuem de forma significativa para as dificuldades encontradas no tratamento dessas infecções. O combate a infecções envolvendo bactérias em biofilme é um grande desafio da microbiologia mundial, que leva à busca de novas opções terapêuticas com o objetivo de interromper o ciclo mantenedor de processos infecciosos recorrentes e a persistência de mecanismos inflamatórios crônicos desencadeados pela presença do biofilme. Medidas para inibir a formação ou erradicar os biofilmes são abordagens que devem ser adotadas no tratamento antibiofilme (APARNA; YADAV, 2008; CERI; OLSON; TURNER, 2010; OTTO, 2008).

A remoção mecânica por intermédio de vários métodos, incluindo sonificação, é empregada, em situações específicas (APARNA; YADAV, 2008). Em alguns casos refratários, a realização de tratamento cirúrgico com debridamento de tecido necrótico, remoção de corpos estranhos, implantados propositalmente ou não, e limpeza do sítio da infecção, pode trazer benefícios à terapia antibiofilme. A normalização da pO_2 , pCO_2 e pH tecidual obtida com a realização de cirurgia minimizam os estímulos do ambiente que possam direcionar as bactérias planctônicas a formar biofilmes (BEZERRA et al, 2009; POST et al., 2007).

Uma das opções para o uso de antibióticos sistêmicos nas doses habituais, muitas vezes sem os resultados esperados, é a aplicação tópica de antibióticos com intuito de se atingir concentrações maiores no sítio infeccioso, que atinjam propriedades antibiofilme, com menor potencial de absorção sistêmica e, portanto, com menores efeitos tóxicos (OTTO, 2008; POST et al., 2007).

O desenvolvimento de drogas, especificamente antibiofilme, pode visar ao controle direto do biofilme (matriz e microrganismos) desde a inibição da sua formação à destruição de um biofilme já formado. Outra opção é a combinação destas drogas com os antibióticos convencionais, restaurando, assim, a eficácia dos antimicrobianos ao que normalmente é contra bactérias fora do biofilme (CERI; OLSON; TURNER, 2010; OTTO, 2008).

Algumas novas sugestões de estratégias antibiofilme são: (1) desenvolvimento de um medicamento capaz de interferir com fatores essenciais ao biofilme bacteriano, como fator envolvido na síntese de EPS; (2) tratamento das possíveis superfícies de adesão para o biofilme, em implantes médicos invasivos, ou mesmo tecido vivo, reduzindo a aderência

bacteriana, e abordagens moleculares para controlar a formação de biofilme; (3) vacinação contra infecções bacterianas mais associadas com formação de biofilme, como as infecções estafilocócicas, ou a produção de antissoros contra PIA ou proteínas de superfície (CERI; OLSON; TURNER, 2010; OTTO, 2008).

Estima-se que até 75% de todas as infecções são causadas pela formação e persistência de biofilmes. Apesar de uma busca para “biofilme” no PubMed (07 de janeiro de 2011) render mais de 14500 citações, são relativamente poucos os estudos sobre o assunto associados com patógenos bacterianos de interesse veterinário. Considerando o amplo envolvimento de biofilmes em infecções e doenças em humanos, não é difícil imaginar que biofilmes provavelmente, sejam responsáveis por uma grande variedade de infecções em medicina veterinária também (JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010).

2 - PERGUNTAS DE PARTIDA

Antibióticos classicamente utilizados em soluções otológicas de uso tópico apresentam ação inibitória *in vitro* contra cepas estafilocócicas isoladas de otite canina em sua forma planctônica e/ou em biofilme?

Agentes com ação antimicrobiana, mas não considerados antibióticos clássicos, tais princípios ativos de óleos essenciais e agentes oxidantes, manifestam efeito *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de cães com otite ?

3 - HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Antibióticos clássicos utilizados em soluções otológicas tópicas são capazes de demonstrar atividade inibitória *in vitro* contra *Staphylococcus* spp. de otite canina em forma livre, como também em biofilme.

Antimicrobianos não clássicos, tais como princípios ativos de óleos essenciais e agentes oxidantes, têm ação inibitória *in vitro* sobre o crescimento planctônico e em biofilme de cepas estafilocócicas isoladas de cães otopatas.

4 - OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra cepas de *Staphylococcus* isoladas de otite canina em forma planctônica e em biofilme.

4.2 Objetivos Específicos

Verificar a sensibilidade *in vitro* de cepas estafilocócicas de isolados clínicos veterinários em estado planctônico contra antibióticos clássicos ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina.

Pesquisar se ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina exibem atividade *in vitro* sobre biofilmes de cepas estafilocócicas isoladas de otite canina.

Avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* dos componentes principais do óleo essencial de orégano – timol e carvacrol – contra cepas de *Staphylococcus* oriundos de otite canina em crescimento planctônico e sobre biofilmes maduros formados por estas cepas.

Investigar qual a ação *in vitro* do peróxido de hidrogênio sobre cepas estafilocócicas em forma planctônica e em biofilme, isoladas de material clínico de cães com otite.

5 - MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Locais de Trabalho

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Bacteriologia, Setor de Microbiologia, Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil, sob a supervisão da Prof^ª. Dr^ª. Cibele Barreto Mano de Carvalho.

A obtenção e/ou preparação dos agentes antimicrobianos utilizados nos ensaios de microdiluição foi realizada no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Prof. Msc. Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

Os teste automatizados foram realizados no LabPasteur – Laboratório de Medicina Diagnóstica, Fortaleza, Ceará, Brasil, sob a supervisão da Msc. Teresa Bandeira.

As imagens de microscopia eletrônica foram capturadas no Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Brasil, sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Bedê Barros.

5.2 Cepas Bacterianas

5.2.1 Cepas Clínicas

Inicialmente, 60 cepas em estoque, da coleção do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal do Ceará, isoladas de material clínico oriundo de secreção purulenta, colhido de orelha externa ou média de cães, no Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza–Ceará, entre os anos de 2003 e 2004 (OLIVEIRA et al., 2008), foram selecionadas para estudo. Os animais foram todos diagnosticados com quadro clínico de otite (externa, média ou ambas; uni ou bilateral) mediante exame clínico, citologia e bacterioscopia do material clínico colhido. Todas as cepas haviam sido previamente identificadas por coloração de Gram e por caracterização morfológica e bioquímica, como cepas estafilocócicas da espécie *S. intermedius*, segundo Kloos & Bannerman (2003). Cinquenta e quatro das 60 cepas foram

recuperadas com sucesso. As cepas são mantidas em Brain Heart Infusion (BHI) caldo (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) adicionado de 20% de glicerol a -20 °C.

5.2.2 Cepas de Referência

Duas cepas-padrão estafilocócicas foram utilizadas como referência para a produção de biofilme: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo – formador de biofilme - como descrito por Sandberg e al (2009), e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo – não-formador de biofilme – como descrito por Arciola e colaboradores (2002), e Mariana et al (2009).

5.3 Identificação Bacteriana por Automação

As cepas recuperadas com sucesso foram reidentificadas. A identificação das espécies foi realizada pelo sistema de automação Vitek2 (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França - *software* 4,03) com o uso do cartão de painel GP (cocos Gram-positivos e bacilos não-formadores de esporos) no LabPasteur – Laboratório de Medicina Diagnóstica, Fortaleza, Ceará, Brasil.

O sistema Vitek2 utiliza cartões de reagentes com 64 poços. Cada poço contém um substrato de teste individual. Os substratos medem atividades metabólicas diversas, como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática, e o crescimento na presença de substâncias inibitórias.

As instruções do fornecedor foram seguidas na preparação do inóculo e na incubação dos isolados.

5.4 Caracterização Fenotípica da Produção de Biofilme

5.4.1 Ágar Vermelho Congo

O método do AvC foi realizado de acordo como protocolo de Freeman e colaboradores (1989). Placas com o meio diferencial caracterizado pela presença do corante

vermelho Congo (Sigma, St. Louis, EEUU) foram semeadas e incubadas em ambiente aeróbio por 24 h - 48 h a 37 °C.

Para avaliar a coloração das colônias, foi adotada uma escala de seis tons de cores, com tonalidades que variam do preto ao vermelho (ARCIOLA et al., 2002). Foram consideradas como amostras produtoras de biofilme aquelas com colônias muito pretas, pretas e quase pretas (FIGURA 9). Amostras que apresentaram colônias com cores de muito vermelho a Bordeaux foram consideradas sem a capacidade de produzir esse fator de virulência (FIGURA 10).

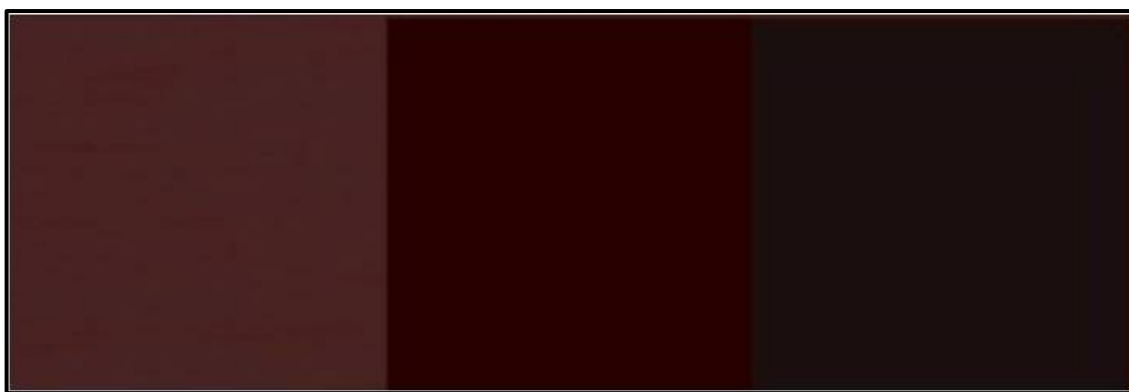


FIGURA 8. Escala de cores (quase preto – preto – muito preto) adotada para classificação das cepas positivas (produtoras de biofilme) e utilizada na avaliação da coloração das colônias de cepas estafilocócicas pelo método do ágar vermelho Congo. Fonte: Moreira, 2010.

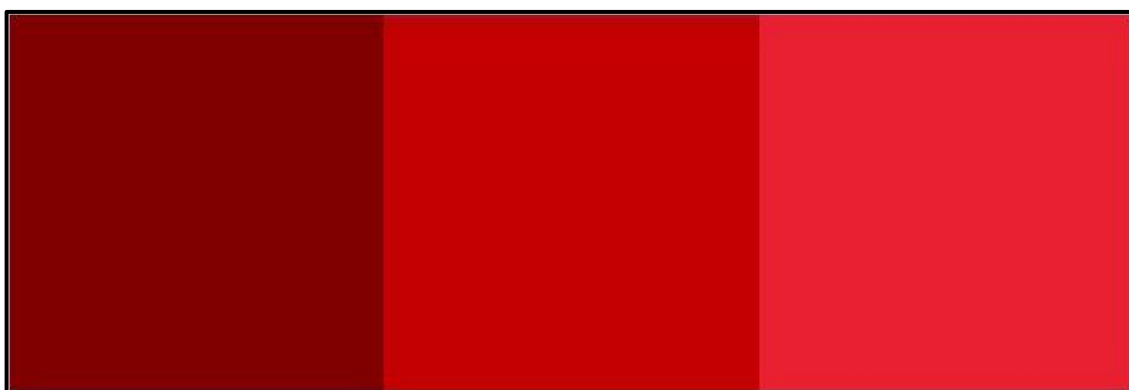


FIGURA 9. Escala de cores (Bordeaux– vermelho – muito vermelho) adotada para classificação das cepas negativas (não-produtoras de biofilme) e utilizada na avaliação da coloração das colônias de cepas estafilocócicas pelo método do ágar vermelho Congo. Fonte: Moreira, 2010.

Foram utilizadas a cepa *S. aureus* ATCC 29523, produtora de biofilme, como controle positivo (SANDBERG et al., 2009) e a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228, não produtora de biofilme, como controle negativo (ARCIOLA et al., 2002; PETTTIT et al., 2005) na prova do AvC.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Das 56 cepas (54 cepas clínicas, mais as duas cepas controle) cultivadas em AvC, quatro delas foram escolhidas para terem suas imagens em cultivo capturadas por MEV com base nos achados do teste AvC. Foram elas, as duas cepas ATCC usadas como controles (*S. aureus* ATCC 29523 e *S. epidermidis* ATCC 12228) e duas cepas clínicas: uma cepa fortemente positiva (colônias de cor preta) e uma claramente negativa (colônias de cor vermelha).

As quatro cepas escolhidas foram incubadas por 48 h a 37 °C BHI caldo (Oxoid), sem agitação, na presença de lâminas de vidro estéreis (diâmetro de 5 mm), em placas de 24 poços, para permitir o desenvolvimento de biofilme. O meio de cultura foi trocado após 24h de crescimento. Após a incubação, as lâminas removidas do fundo de cada poço foram lavadas três vezes, em solução estéril de tampão salina fosfato (PBS), para remoção de células não aderidas (PETTTIT et al., 2005). Seguindo a lavagem, as lâminas foram imersas em gluteraldeído 2,5% em temperatura ambiente por duas horas para fixação (OKAJIMA et al., 2006). Logo depois, o material foi desidratado em soluções de concentrações progressivamente maiores de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 95% e 100%) por 15 minutos cada qual (TRAN et al., 2009), para seguir a secagem em centrifuga a vácuo e ser recoberto com ouro na metalizadora BAL-TEC MED 020 (FIGURA 11). As superfícies superiores das lâminas foram examinadas por MEV (TESCAN VEGA XMU) à procura de biofilme formado e fotografadas. As imagens de microscopia eletrônica foram capturadas no Laboratório de Microscopia Avançada, Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Brasil, com magnificação de 10.000 vezes.

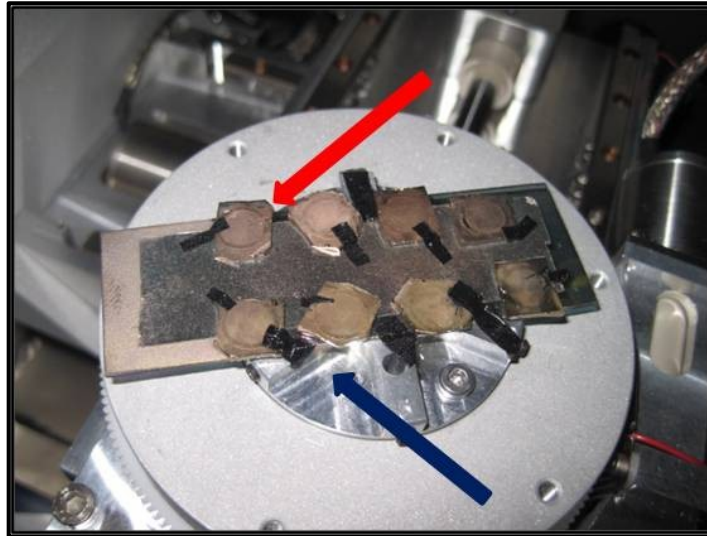


FIGURA 10. Cepas estafilocócicas crescidas por 48 horas sobre lâminas de vidro, após processo de metalização com cobertura de ouro, montadas para a visualização em microscópio eletrônico de varredura (seta vermelha). Fita condutora para propagação do feixe eletrônico (seta azul). Fonte: Moreira, 2010.

5.5 Testes de Sensibilidade

5.5.1 *Teste de Sensibilidade Automatizado*

O teste de sensibilidade a antimicrobianos para as 54 cepas identificadas foi realizado pelo sistema de automação Vitek2 (bioMérieux) com o uso do cartão de painel GP.

Os seguintes antibióticos foram testados: Ampicilina / Sulbactam, Benzilpenicilina, Cefazolina, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gatifloxacina, Gentamicina, Levofloxacina, Linezolida, Moxifloxacina, Nitrofurantoína, Oxacilina, Quinupristina / Dalfopristina, Rinfampicina, Tetraciclina, Vancomicina. Os pontos de corte para determinação de sensibilidade ou resistência são descritos no QUADRO 1.

As instruções do fornecedor foram seguidas na preparação do inóculo e na incubação dos isolados. Somente os isolados resistentes foram classificados como resistentes, enquanto os resultados intermediários foram classificados como sensíveis.

QUADRO 1. Valores dos pontos de corte, em µg/ml, para sensibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp. usados no teste de sensibilidade a antibióticos por automação

Antimicrobiano	Sensível	Resistente
AMPICILINA / SULBACTAM	≤ 8 / 4	≥ 32 / 16
BENZILPENICILINA	≤ 0,12	≥ 0,25
CEFAZOLINA	≤ 8	≥ 32
CLINDAMICINA	≤ 0,5	≥ 4
CLORANFENICOL	≤ 8	≥ 32
ERITROMICINA	≤ 0,5	≥ 8
GATIFLOXACINA	≤ 0,5	≥ 2
GENTAMICINA	≤ 4	≥ 16
LEVOFLOXACINA	≤ 1	≥ 4
LINEZOLIDA	≤ 4	-
MOXIFLOXACINA	≤ 0,5	≥ 2
NITROFURANTOÍNA	≤ 32	≥ 128
OXACILINA	≤ 2* ≤ 0,25**	≥ 4* ≤ 0,5**
QUINUPRISTINA / DALFOPRISTINA	≤ 1	≥ 4
RIFAMPICINA	≤ 1	≥ 4
TETRACICLINA	≤ 4	≥ 16
VANCOMICINA	≤ 2	≥ 16

* CPS e *S. lugdunensis*; ** CNS exceto *S. lugdunensis*

Fonte: CLSI, 2008

5.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela Técnica de Microdiluição

A concentração inibitória mínima das substâncias ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol, timol, carvacrol e peróxido de hidrogênio foi determinada para a cepa-controle *S. aureus* ATCC 25923, e para cada uma das cepas clínicas, caracterizadas como produtoras de biofilme, pelo teste do AvC. Com esse objetivo, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, descrito no documento M07-A8, padronizado pelo CLSI (2008), que mede quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. A CIM, neste caso, é definida como a menor concentração da droga que

impede o crescimento visível de um microrganismo após incubação por 24 horas (CLSI, 2008).

Para o ensaio de microdiluição, foram utilizadas placas plásticas estéreis de microtitulação, contendo 96 poços com fundo arredondado em forma de U (TPP, Trasadingen, Suíça). Os poços contendo meio de cultura receberam concentrações progressivamente menores dos agentes antimicrobianos e o inóculo do microrganismo a ser testado para comparação visual dos poços após incubação.

Com o auxílio de um pipetador automático, foram distribuídos em cada um dos poços 100 µL de meio Mueller Hinton (MH) caldo (Oxoid) estéril em 12 poços da mesma coluna e nos poços de controle positivo (meio de cultura e inóculo). Em seguida, 100 µL do antimicrobiano testado foram adicionados nos primeiros poços de cada coluna, a partir dos quais a droga foi diluída de forma seriada até os poços da décima segunda coluna. Os 100 µL retirados do último poço foram transferidos para parte dos poços usados como controle negativo do ensaio. Assim, os poços de esterilidade continham apenas meio de cultura, e os poços do controle negativo continham meio e antimicrobiano.

As concentrações das drogas testadas variaram conforme apresentado no QUADRO 2. Para os antimicrobianos, timol, carvacrol e H₂O₂, as concentrações usadas nos ensaios foram determinadas com base em experimentos-pilotos (dados não apresentados), uma vez que não existem valores padronizados de sensibilidade e resistência para estas substâncias. Os valores de referência para sensibilidade e resistência usados para os antibióticos ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina são apresentados no QUADRO 3.

QUADRO 2. Concentrações, em µg/ml, dos antimicrobianos usados no teste de concentração inibitória mínima por microdiluição

ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO MÁXIMA	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA
CIPROFLOXACINA	64	0,03
CLORANFENICOL	256	0,12
GENTAMICINA	128	0,06
TIMOL	1024	0,5
CARVACROL	1024	0,5
H2O2*	1024	0,5

*valores em ppm (m/v)

Fonte: Pesquisa direta

QUADRO 3. Valores dos pontos de corte, em µg/ml, para sensibilidade e resistência de *Staphylococcus* spp. usados no teste de sensibilidade a antibióticos por microdiluição

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL	RESISTENTE
CIPROFLOXACINA	≤ 1	≥ 4
CLORANFENICOL	≤ 8	≥ 32
GENTAMICINA	≤ 4	≥ 8

Fonte: CLSI, 2008

Por fim, 5µL do inóculo bacteriano foram distribuídos em cada poço-teste. Controles positivos de crescimento e esterilidade foram incluídos para cada observação testada (FIGURA 12). Os procedimentos foram realizados em duplicata. A leitura visual dos resultados para a determinação das CIMs foi realizada após 24 h de incubação a 37 °C (CLSI, 2008).

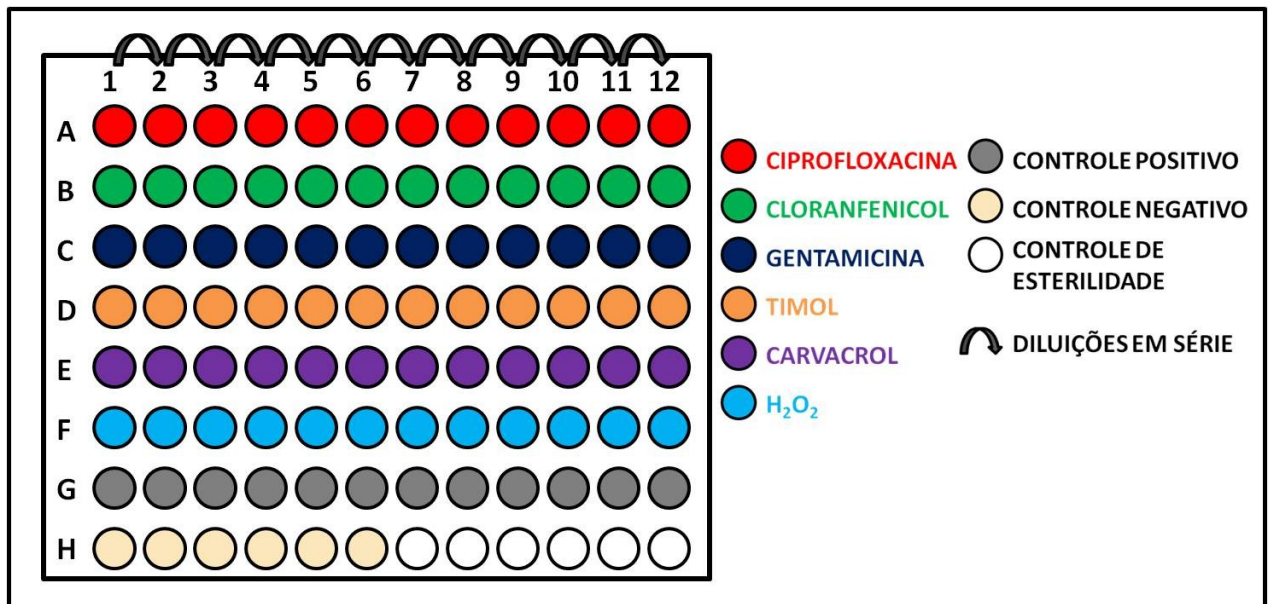


FIGURA 11. Configuração esquemática das placas de microtitulação com 96 poços para os testes de microdiluição em caldo. Fonte: Moreira, 2010.

Em decorrência da turvação própria das substâncias timol e carvacrol, que dificulta a leitura visual do teste, após o período de incubação, foram adicionados a cada poço 10µL de

resazurina em solução aquosa estéril (0,05%). As microplacas foram reincubadas por 45 minutos e após este período foram observadas e analisadas a olho nu (FIGURA 13). Desta forma, foi possível determinar a menor concentração de cada óleo capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores (COBAN, et al., 2006; SARKER; NAHAR; KUMRASAMY, 2007).

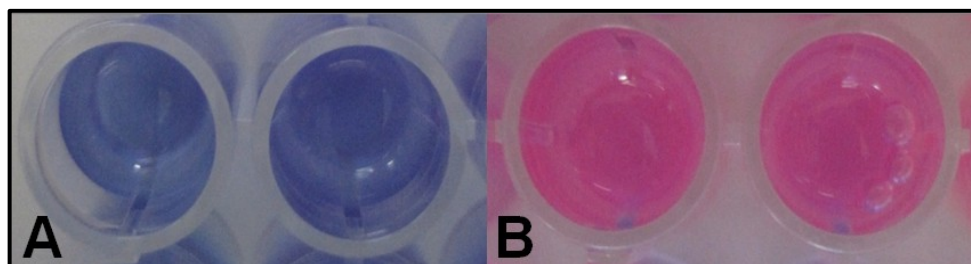


FIGURA 12. Leitura visual do teste de microdiluição com resazurina. (A) Resazurina permanece azul em poços sem atividade metabólica/crescimento bacteriano. (B) Resazurina é reduzida a resofurina de tom rosa em poços com atividade metabólica/crescimento bacteriano. Fonte: Moreira, 2010.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos em três momentos diferentes.

5.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima em Biofilme (CIMB) pela Técnica de Microdiluição

A concentração inibitória mínima em biofilme das substâncias ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol, timol, carvacrol e peróxido de hidrogênio foi determinada para a cepa controle *S. aureus* ATCC 25923 e, para cada uma das cepas clínicas, caracterizadas como produtoras de biofilme pelo teste do AvC. A CIMB foi determinada utilizando-se o método de microdiluição em caldo, que mede quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano após a formação de biofilme (PEETERS et al., 2008; ROVETA et al., 2007).

Para realizar o teste, as cepas foram inicialmente cultivadas em meio BHI caldo a 37 °C por 18 a 24 horas. Os biofilmes aderentes foram formados em placas estéreis de microtitulação de 96 poços de fundo chato (TPP). Para tanto, uma alíquota de 25 µL das culturas bacterianas (pelo menos 18 h de crescimento em 37 °C, contendo cerca de

2×10^9 cels/ml – aproximadamente entre 6 e 7 na escala de McFarland) foi adicionada de forma asséptica a cada poço, contendo 175 μ L de meio de crescimento BHI caldo enriquecido com 1% de glicose. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e em seguida lavadas três vezes em 200 μ L de PBS para a remoção de bactérias livres não aderidas às paredes dos poços. Os poços de controle positivo (meio e inóculo), negativo (meio e antimicrobiano) e de esterilidade (apenas meios de cultura) foram objeto do mesmo processo de lavagem e em seguida 200 μ L de MH caldo foram adicionados a estes poços. Os demais poços receberam apenas 100 μ L de MH caldo nesse momento.

Em uma placa separada, a fim de evitar contaminação indevida, foram diluídos os antimicrobianos em concentrações decrescentes da mesma forma que no ensaio de CIM descrito anteriormente. A partir da placa de diluição, 100 μ L de cada poço foram transferidos para o poço correspondente na placa com biofilme aderente, que já continha 100 μ L de meio MH caldo distribuídos logo após a lavagem (FIGURA 12). As placas foram então incubadas em ambiente aeróbio por 24 h a 37 °C. MH caldo foi usado nesta etapa para facilitar a comparação dos resultados entre os ensaios de CIM e CIMB. As concentrações dos antimicrobianos variaram conforme apresentado no QUADRO 4, podendo ser comparadas as concentrações encontradas em formulações comerciais de uso tópico no QUADRO 5.

QUADRO 4. Concentrações, em μ g/ml, dos antimicrobianos usados no teste de concentração inibitória mínima em biofilme por microdiluição

CONCENTRAÇÕES	MÁXIMA	MÍNIMA
CIPROFLOXACINA	256	0,12
CLORANFENICOL	2048	1
GENTAMICINA	1024	0,5
TIMOL	8192	4
CARVACROL	8192	4
H ₂ O ₂ *	8192	4

*valores em ppm (m/v)

Fonte: Pesquisa direta

QUADRO 5. Valores de concentrações encontradas em formulações comerciais de uso otológico para os antibióticos ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÕES
CIPROFLOXACINA	2000 a 5000 µg/mL
CLORANFENICOL	5000 a 25000 µg/mL
GENTAMICINA	3000 µg/mL

Fonte: DEF, 2009.

Após 24 horas de incubação, foram adicionados 20 µL da solução de resazurina 0,05% em cada poço (todos os poços-teste, todos os poços de controle positivo, e metade dos poços de controle negativo) e, após incubação de uma hora, foi realizada a leitura visual dos poços (FIGURA 14). A CIMB de cada antimicrobiano foi estabelecida como aquela igual à concentração do poço de menor concentração, onde não havia evidência de atividade celular (ausência de mudança de cor – corante permanece azul). Ainda não existem critérios padronizados para sensibilidade e resistência de bactérias em biofilme.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos em dois momentos diferentes.

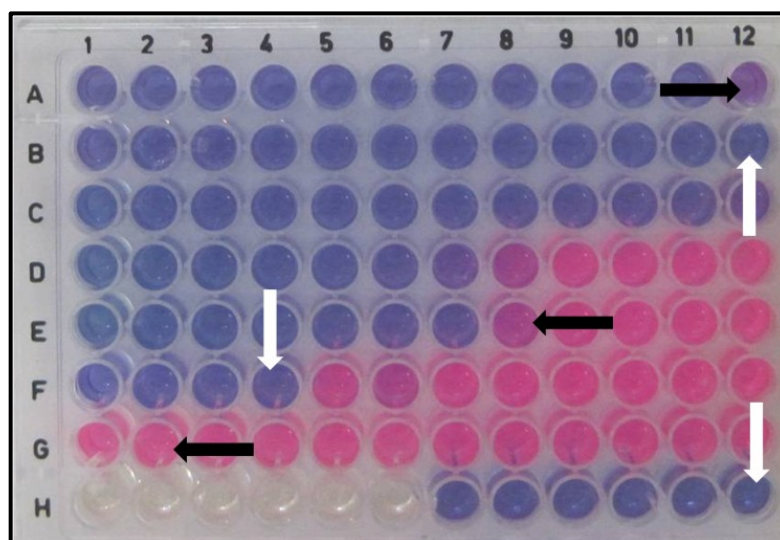


FIGURA 13. Leitura visual da resazurina em placa de microdiluição. Poços sem produtos do metabolismo bacteriano permanecem com cor azul (setas brancas). Poços com bactérias viáveis reduzem a resazurina a resofurina e mudam de cor para diferentes tons de rosa (setas pretas). Fonte: Moreira, 2010.

5.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados nos *Softwares R 2.10.1* e *SPSS 18.0*. A análise ocorreu mediante os testes de hipóteses: o teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como médias. O nível de significância utilizado foi de 5%, e este será comparado com o p-valor.

6 - RESULTADOS

6.1 Identificação Bacteriana

As 54 cepas reativadas com sucesso e identificadas pelo sistema de automação Vitek2 (bioMérieux) se dividiram em cinco espécies de estafilococos da seguinte forma: 28 cepas (52%) confirmadas de *S. intermedius*, 22 cepas (41%) de *S. simulans*, duas cepas (4%) de *S. haemolyticus*, uma cepa (1,5%) de *S. epidermidis* e uma cepa (1,5%) de *S. lugdunensis* (TABELA 1).

TABELA 1. Distribuição das cepas de *Staphylococcus* spp. identificadas pelo sistema de automação Vitek2 (n=54).

ESPÉCIE (n)	CEPAS*
<i>S. intermedius</i> (28)	P1 OED; 03 OEE; 06 OEE; 08 OED; 09 OED; 12 OED; 13 OEE; 15 OED; 16 OEE; 17 OEE; 18 OED; 19 OEE; 21 OEE; 22 OEE; 23 OED; 23 OEE; 27 OEE; 29 OED; 30 OED; 32 OED; 35 OEE; 37 OED; 38 OED; 44 OED 16 OMD; 26 OMD; 27 OMD; 34 OMD
<i>S. simulans</i> (22)	P2 OED; P2 OEE; 01 OEE; 02 OED; 02 OEE; 03 OED; 04 OED; 04 OEE; 08 OEE; 10 OED; 10 OEE; 11 OED; 13 OED; 20 OEE; 28 OEE; 29 OEE; 30 OEE P2 OMD; 10 OMD; 12 OMD; 14 OMD; 28 OME
<i>S. haemolyticus</i> (2)	07 OED; 09 OEE
<i>S. epidermidis</i> (1)	01 OED
<i>S. lugdunensis</i> (1)	24 OED

*As cepas são enumeradas pelo código usado no estoque.

Legenda: OED – otite externa direita; OEE – otite externa esquerda; OMD – otite média direita; OME – otite média esquerda.

6.2 Caracterização Fenotípica da Produção de Biofilme

6.2.1 Ágar Vermelho Congo

A caracterização fenotípica da produção de biofilme pelas 56 cepas do estudo (54 cepas clínicas mais duas cepas-controle) foi realizada pela análise da coloração das colônias em AvC (FIGURAS 15 e 16). Considerando como resultado final as observações após 48h de incubação, 16 dos 54 isolados estudados foram considerados produtores de biofilme.



FIGURA 14. Cepas clínicas de *Staphylococcus* spp. não-produtoras de biofilme crescidas sobre o ágar vermelho Congo (AvC). As cepas caracterizadas como negativas pelo teste do AvC apresentam colônias com diversas tonalidades de vermelho, desde tons mais intensos, como visto na imagem da placa central, a tons mais escuros, como nas placas da linha superior da prancha. Fonte: Moreira, 2010.

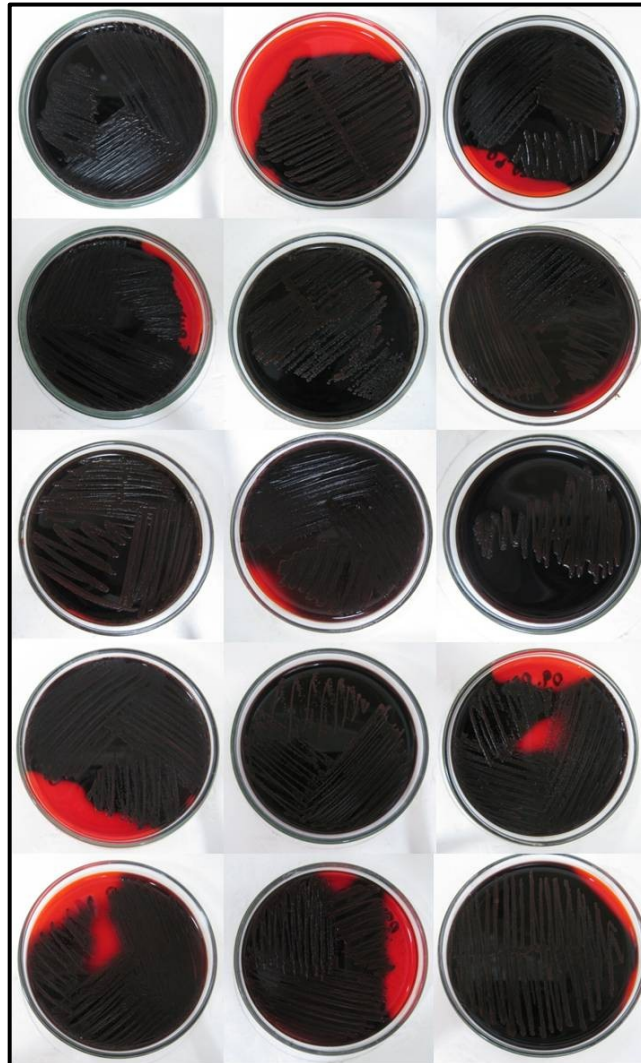


FIGURA 15. Cepas clínicas de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme crescidas sobre o ágar vermelho Congo (AvC). As cepas caracterizadas como positivas pelo teste do AvC apresentam colônias com diversas tonalidades de preto, por vezes com um discreto aspecto cristalizado. Fonte: Moreira, 2010.

Entre os 28 isolados de *S. intermedius*, 11 (39%) foram considerados produtores, ao passo que, dos 22 isolados de *S. simulans*, cinco (23%) receberam a classificação de produtores. Nenhuma das cepas isoladas de *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* e *S. lugdunensis* foi caracterizada como produtora de biofilme (TABELA 2).

TABELA 2. Classificação fenotípica da produção de biofilme pelo teste do ágar vermelho Congo (AvC) das cepas de *Staphylococcus* spp. (n=54).

ESPÉCIE (n)	AvC	
	PB (TOTAL DE CEPAS)	NPB (TOTAL DE CEPAS)
<i>S. intermedius</i> (28)	03 OEE; 06 OEE; 08 OED; 15 OED; 17 OEE; 18 OED; 21 OEE; 27 OEE; 35 OEE 26 OMD; 34 OMD (11)	P1 OED; 09 OED; 12 OED; 13 OEE; 16 OEE; 19 OEE; 22 OEE; 23 OED; 23 OEE; 29 OED; 30 OED; 32 OED; 37 OED; 38 OED; 44 OED 16 OMD; 27 OMD (17)
<i>S. simulans</i> (22)	02 OED; 02 OEE; 04 OEE 14 OMD; 28 OME (5)	P2 OED; P2 OEE; 01 OEE; 03 OED; 04 OED; 08 OEE; 10 OED; 10 OEE; 11 OED; 13 OED; 20 OEE; 28 OEE; 29 OEE; 30 OEE P2 OMD; 10 OMD; 12 OMD (17)
<i>S. haemolyticus</i> (2)	-	07 OED; 09 OEE (2)
<i>S. epidermidis</i> (1)	-	01 OED (1)
<i>S. lugdunensis</i> (1)	-	24 OED (1)

Legenda: PB – Produtores de biofilme; NPB – Não produtores de biofilme

As duas cepas-controle se comportaram como esperado e foram classificadas de acordo (FIGURAS 17 e 18). O prolongamento do tempo de incubação e observação além de 24h até 48 h só alterou a categoria de três isolados três (*S. simulans* 04 OEE, *S. simulans* 14 OMD e *S. simulans* 28 OME), que apresentavam colônias de coloração limítrofe entre o Bordeaux e o quase-preto, embora a tonalidade tenha se tornado mais característica após as 48 h em vários outros casos. Ao todo, 30% das cepas isoladas foram classificadas como produtoras de biofilme.

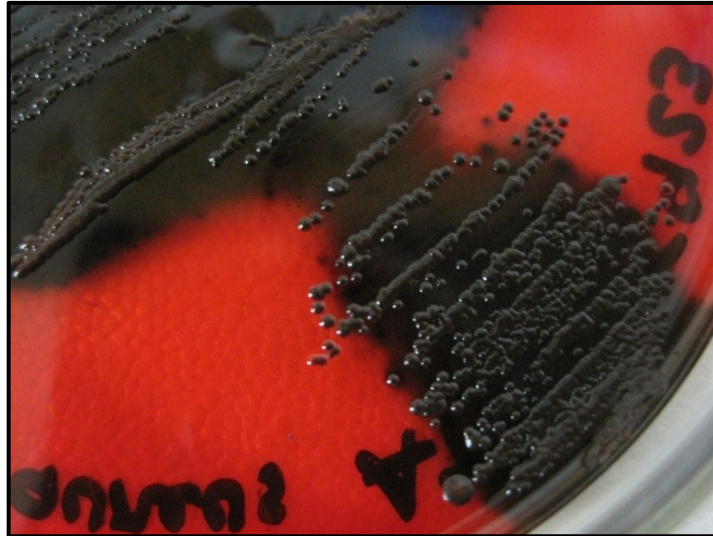


FIGURA 16. *S. aureus* ATCC 25923 cultivada em ágar vermelho Congo (AvC) e caracterizada como cepa positiva (controle positivo) devido à coloração enegrecida das colônias, indicando a capacidade de produção de biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

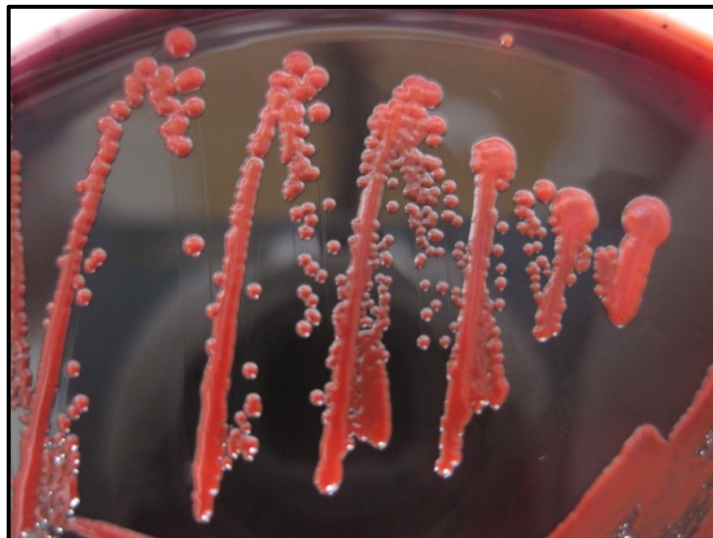


FIGURA 17. *S. epidermidis* ATCC 12228 cultivada em ágar vermelho Congo (AvC) e caracterizada como cepa negativa (controle negativo) devido à coloração avermelhada das colônias, indicando que a cepa não produz biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

6.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi realizada a captura de imagens por MEV de quatro cepas escolhidas após terem sido cultivadas em condições adequadas para a formação de biofilme. Além das duas cepas-

controle, as duas cepas clínicas escolhidas foram: *S. intermedius* 21 OEE, claramente positiva (FIGURA 19) e *S. simulans* 08 OEE, claramente negativa (FIGURA 20).



FIGURA 18. *S. intermedius* 21 OEE cultivada em ágar vermelho Congo (AvC) e caracterizada como cepa positiva (exemplo clínico) devido à coloração enegrecida das colônias, indicando a capacidade de produção de biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

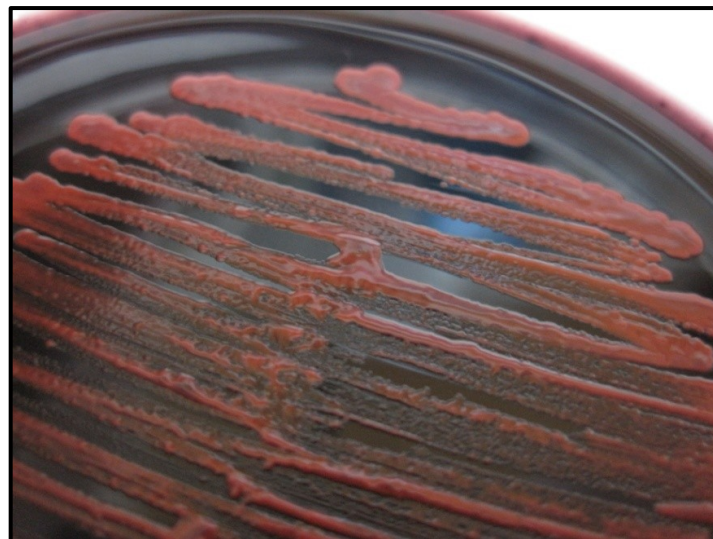


FIGURA 19. *S. simulans* 08 OEE cultivada em ágar vermelho Congo (AvC) e caracterizada como cepa negativa (exemplo clínico) devido à coloração avermelhada das colônias, indicando que a cepa não produz biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

As duas cepas produtoras de biofilme formaram uma biomassa facilmente detectada com estrutura tridimensional de multicamadas e EPS (FIGURAS 21 e 22). As cepas não-

produtoras de biofilme não foram capazes de colonizar a maior parte da superfície da lâmina de vidro. Pequenas aglomerações de células foram observadas, mas não ao ponto de formar camada única ou qualquer estrutura de biofilme maduro (FIGURAS 23 e 24). As imagens representam campos de visão típicos para cada lâmina.

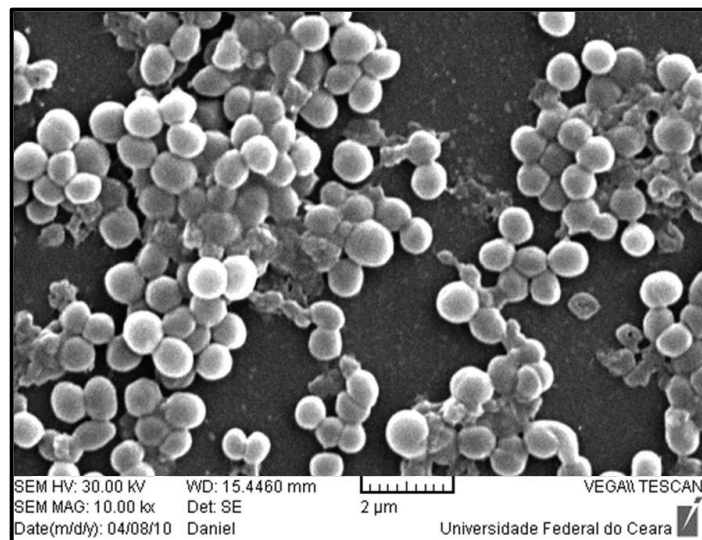


FIGURA 20. Imagem de *S. aureus* ATCC 25923 (cepa de controle positivo da produção de biofilme) capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes. Presença de bactérias agrupadas em camadas múltiplas e presença inicial de matriz caracterizando a formação de biofilme aderido à superfície da lâmina de vidro. Fonte: Moreira, 2010.

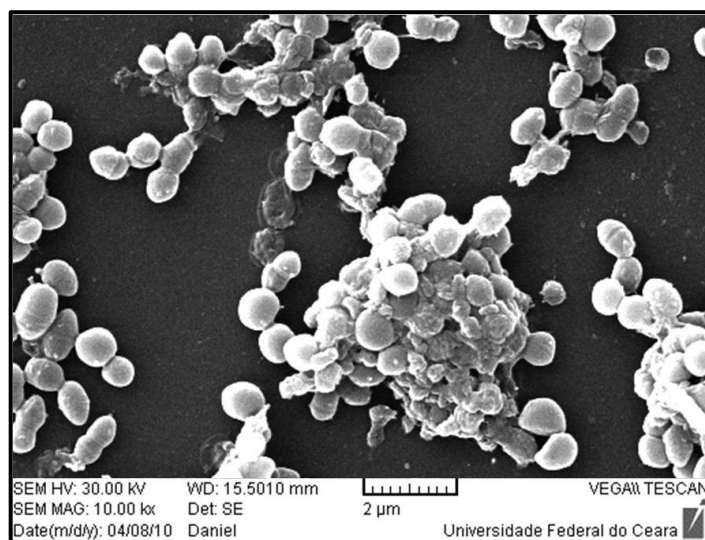


FIGURA 21. Imagem de *S. intermedius* 21 OEE (cepa clínica produtora de biofilme) capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes. Presença de bactérias agrupadas em camadas múltiplas e presença inicial de matriz caracterizando a formação de biofilme aderido à superfície da lâmina de vidro. Fonte: Moreira, 2010.

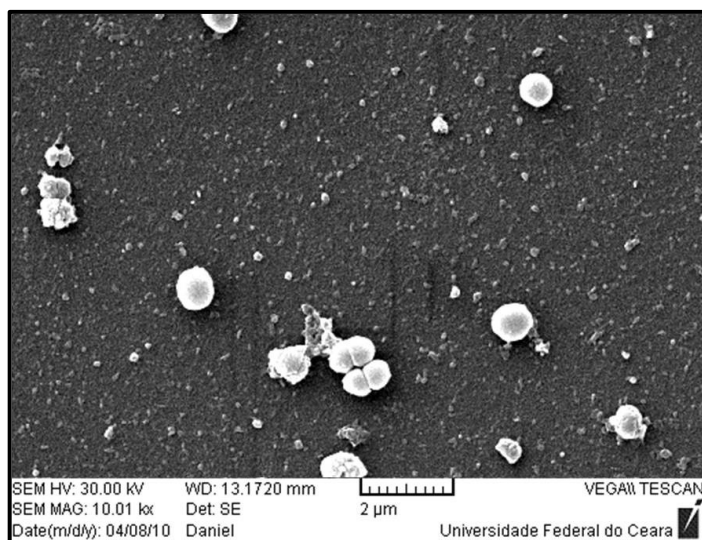


FIGURA 22. Imagem de *S. epidermidis* ATCC 12228 (cepa de controle negativo da produção de biofilme) capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes. Presença de bactérias escassas aderidas à superfície da lâmina, sem formação de biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

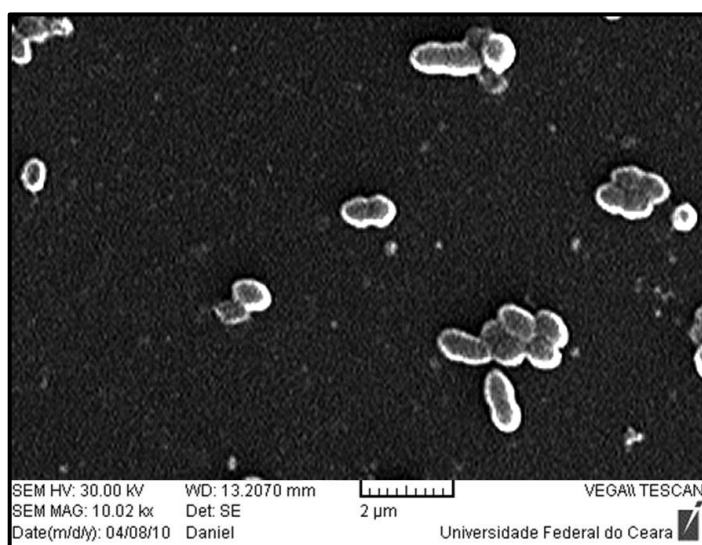


FIGURA 23. Imagem de *S. simulans* 08 OEE (cepa clínica não produtora de biofilme) capturada por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes. Presença de bactérias escassas aderidas à superfície da lâmina, sem formação de biofilme. Fonte: Moreira, 2010.

6.3 Testes de Sensibilidade

6.3.1 Teste de Sensibilidade Automatizado

As 54 cepas identificadas pelo sistema de automação Vitek2 foram também submetidas ao teste de sensibilidade a antibióticos pelo mesmo sistema. A maioria das cepas submetidas ao

teste se mostrou sensível aos 17 antibióticos testados. Somente 14 cepas (26%) mostraram algum padrão de resistência (TABELA 3). Apenas uma cepa, *S. haemolyticus* 09 OEE, apresentou um padrão de resistência múltipla a nove antibióticos diferentes. Seis cepas foram resistentes a benzilpenicilina, 11 a tetraciclina, duas a eritromicina e clindamicina; e uma foi resistente a ampicilina/sulbactam, oxacilina, cefazolina, gatifloxacina, levofloxacina e moxifloxacina. Nenhuma das cepas produtoras de biofilme, porém, se mostrou resistente aos antibióticos das classes utilizadas no teste de microdiluição em caldo, quinolonas, anfenicóis e aminoglicosídeos.

TABELA 3. Cepas resistentes de *Staphylococcus* spp. reconhecidas pelo sistema de automação Vitek2 (n=14).

ANTIBIÓTICOS (TOTAL DE CEPAS)	ESPÉCIE	CEPA
BZP (2)	<i>S. simulans</i>	13 OED 10 OMD
TTC (8)	<i>S. intermedius</i>	03 OEE; 22 OEE; 29 OED
BZP; TTC (2)	<i>S. simulans</i>	02 OED; 02 OEE; 08 OEE; 10 OEE; 30 OEE
BZP; TTC (2)	<i>S. intermedius</i>	P1 OED; 17 OEE
BZP; TTC; ERC; CLD (1)	<i>S. intermedius</i>	23 OED
BZP; ERC; CLD; AMP/SBT; OXC; CFZ; GTF; LVF; MXF (1)	<i>S. haemolyticus</i>	09 OEE

BZP – BENZILPENICILINA; TTC – TETRACICLINA; ERC – ERITROMICINA;
CLD – CLINDAMICINA; AMP/SBT - AMPICILINA/SULBACTAM;
OXC – OXACILINA; CFZ – CEFAZOLINA; GTF – GATIFLOXACINA;
LVF – LEVOFLOXACINA; MXF – MOXIFLOXACINA

6.3.2 Determinação da CIM pela Técnica de Microdiluição

A concentração inibitória mínima foi determinada para as 16 cepas produtoras de biofilme e para a cepa-controle *S. aureus* ATCC 25923, pelo método de microdiluição em caldo com ou sem o uso de resazurina (TABELA 4).

Em concordância com os resultados do teste automatizado, nenhuma das cepas testadas se mostrou individualmente resistente a ciprofloxacina, cloranfenicol e/ou gentamicina, conforme os pontos de corte determinados pelo CLSI (2008).

Os valores de CIM para *Staphylococcus* spp. variaram de 0,12 - 0,5 µg/mL (média 0,28 µg/mL) para ciprofloxacina; 2 - 16 µg/mL (média 7,41 µg/mL) para cloranfenicol e 0,5 - 4 µg/mL (média 2,09 µg/mL) para gentamicina.

No tocante às cepas de *S. intermedius* apenas, os valores de CIM estiveram entre 0,12 - 0,5 µg/mL (média 0,27 µg/mL) para ciprofloxacina; 2 - 8 µg/mL (média 5,64 µg/mL) para cloranfenicol e 0,5 - 4 µg/mL (média 2,04 µg/mL) para gentamicina.

Com relação às cepas de *S. simulans* somente, os valores de CIM apresentaram variações de 0,12 - 0,5 µg/mL (média 0,32 µg/mL) para ciprofloxacina; 8 - 16 µg/mL (média 11,2 µg/mL) para cloranfenicol e 2 - 4 µg/mL (média 2,4 µg/mL) para gentamicina. Todos os dados estão apresentados nas TABELAS 4 e 5.

Mesmo sem um padrão de referência estabelecido, CIMs foram determinadas para os outros três agentes antimicrobianos (timol, carvacrol e H₂O₂) com sucesso. Quanto a estes antimicrobianos não clássicos, observou-se que todos foram capazes de inibir o crescimento, *in vitro*, de *Staphylococcus* spp., sendo determinados valores de CIM que se distribuíram de 32 - 512 µg/mL (média 137,41 µg/mL) para timol; 32 - 512 µg/mL (média 128 µg/mL) para carvacrol e 32 - 128 ppm (média 99,76 ppm) para H₂O₂.

Para as cepas de *S. intermedius*, isoladamente, os valores de CIM apresentaram variações de 32 - 512 µg/mL (média 142,54 µg/mL) para timol; 32 - 512 µg/mL (média 162,91 µg/mL) para carvacrol e 64 - 128 ppm (média 98,91 ppm) para H₂O₂.

Avaliando apenas as cepas de *S. simulans*, as CIMs se dispuseram entre 32 - 64 µg/mL (média 51,2 µg/mL) para timol; 32 - 64 µg/mL (média 51,2 µg/mL) para carvacrol e 32 - 128 ppm (média 96 ppm) para H₂O₂. Dados apresentados nas TABELAS 4 e 5.

Com relação ao controle de qualidade das drogas antibióticas clássicas, foram determinadas as CIMs para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (ciprofloxacina: 0,25 µg/mL; cloranfenicol: 8 µg/mL e gentamicina: 1 µg/mL). Todos estes resultados obedeceram aos limites recomendados pelo CLSI, conforme observado no QUADRO 3.

TABELA 4. Valores de concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme definidos por microdiluição em caldo, em µg/mL, para cepas de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme (n=17).

CEPAS	CIPROFLOXACINO		CLORANFENICOL		GENTAMICINA		TIMOL		CARVACROL		*H2O2	
	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB
	<i>S. aureus</i> 25923	0,25	2	8	16	1	32	512	1024	128	1024	128
<i>S. intermedius</i> 03OEE	0,25	0,5	4	8	2	4	64	512	64	256	64	2048
<i>S. intermedius</i> 06OEE	0,25	8	8	32	2	16	64	1024	64	512	128	4096
<i>S. intermedius</i> 08OED	0,12	0,5	2	16	2	16	64	512	64	512	64	2048
<i>S. intermedius</i> 15OED	0,12	1	4	16	2	16	64	512	64	2048	64	4096
<i>S. intermedius</i> 17OEE	0,25	0,5	4	16	4	32	256	512	512	512	128	256
<i>S. intermedius</i> 18OED	0,25	2	8	8	2	16	512	512	256	512	128	256
<i>S. intermedius</i> 21OED	0,5	2	4	32	4	4	256	256	512	512	128	512
<i>S. intermedius</i> 26OMD	0,5	0,5	8	16	0,5	32	128	256	128	512	128	2048
<i>S. intermedius</i> 27OEE	0,25	4	8	32	2	64	64	2048	64	1024	64	4096
<i>S. intermedius</i> 34OMD	0,25	1	8	16	1	16	64	1024	32	1024	64	2048
<i>S. intermedius</i> 35OEE	0,25	0,5	4	16	1	16	32	2048	32	2048	128	1024
<i>S. simulans</i> 02OED	0,25	0,5	8	32	2	16	64	256	64	256	64	128
<i>S. simulans</i> 02OEE	0,25	4	8	32	2	32	64	1024	64	4096	128	4096
<i>S. simulans</i> 04OEE	0,12	1	8	32	2	64	64	512	64	1024	128	1024
<i>S. simulans</i> 14OMD	0,5	2	16	16	4	4	32	512	32	512	128	2048
<i>S. simulans</i> 28OME	0,5	0,5	16	16	2	32	32	512	32	512	32	1024

*valores em ppm (m/v)

TABELA 5. Valores médios de concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme definidos por microdiluição em caldo, em µg/mL, para todas as cepas produtoras de biofilme de *Staphylococcus* spp., e para as espécies *S. intermedius* e *S. simulans*, separadamente.

ANTIBIÓTICOS	MÉDIAS					
	<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>S. intermedius</i>		<i>S. simulans</i>	
	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB
CIPROFLOXACINA	0,28	1,79	0,27	1,86	0,32	1,6
CLORANFENICOL	7,41	20,71	5,64	18,91	11,2	25,6
GENTAMICINA	2,09	24,24	2,04	21,09	2,4	29,6
TIMOL	137,41	768	142,54	837,82	51,2	563,2
CARVACROL	128	993,88	162,91	861,09	51,2	1280
H2O2*	99,76	1874,82	98,91	2048	96	1664

*valores em ppm (m/v)

6.3.3 Determinação da CIMB pela Técnica de Microdiluição

A concentração inibitória mínima em biofilme foi determinada para as 16 cepas produtoras de biofilme e para a cepa controle *S. aureus* ATCC 25923, pelo método de microdiluição em caldo, com o uso de resazurina, contra seis antimicrobianos, com sucesso, como apresentado na TABELA 4.

Observou-se que todas as formulações antibióticas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus* spp., sendo determinados valores de CIMB que variaram de 0,5 - 8 µg/mL (média 1,79 µg/mL) para ciprofloxacina; 8 - 32 µg/mL (média 20,71 µg/mL) para cloranfenicol; 4 - 64 µg/mL (média 24,24 µg/mL) para gentamicina; 256 - 2048 µg/mL (média 768 µg/mL) para timol; 256 - 4096 µg/mL (média 993,88 µg/mL) para carvacrol e 128 - 4096 ppm (média 1874,82 ppm) para H₂O₂.

Para as cepas de *S. intermedius*, isoladamente, os valores de CIMB entre 0,5 - 8 µg/mL (média 1,86 µg/mL) para ciprofloxacina; 8 - 32 µg/mL (média 18,91 µg/mL) para cloranfenicol; 4 - 64 µg/mL (média 21,09 µg/mL) para gentamicina; 256 - 2048 µg/mL (média 837,82 µg/mL) para timol; 256 - 2048 µg/mL (média 861,09 µg/mL) para carvacrol e 256 - 4096 ppm (média 2048 ppm) para H₂O₂.

Com relação às cepas de *S. simulans* somente, os valores de CIMB apresentaram variações de 0,5 - 4 µg/mL (média 1,6 µg/mL) para ciprofloxacina; 16 - 32 µg/mL (média 25,6 µg/mL) para cloranfenicol; 4 - 64 µg/mL (média 29,6 µg/mL) para gentamicina; 256 - 1024 µg/mL (média 563,2 µg/mL) para timol; 256 - 4096 µg/mL (média 1280 µg/mL) para carvacrol e 128 - 4096 ppm (média 1664 ppm) para H₂O₂. Todos os dados estão apresentados nas TABELAS 4 e 5.

De acordo com os resultados obtidos para as 17 cepas de *Staphylococcus* spp., foi observado que os seis agentes antimicrobianos testados apresentaram concentrações inibitórias aumentadas em relação às CIMs para a maioria das cepas avaliadas. Valores individuais de CIMB para dez (63%) das cepas clínicas, assim como todas as médias gerais, foram maiores do que os valores de CIM para os mesmos microrganismos. As demais cepas mantiveram o mesmo padrão de sensibilidade em biofilme que haviam manifestado em suas formas planctônicas contra um ou mais dos agentes testados, com exceção do H₂O₂. Três cepas mantiveram o padrão de sensibilidade para apenas uma droga (*S. intermedius* 17 OEE, *S. intermedius* 26 OMD e *S. simulans* 14 OMD) e as outras três a dois ou mais antimicrobianos (*S. intermedius* 18 OED, *S. intermedius* 21 OEE e *S. simulans* 28 OME). Estes dados podem ser observados na TABELA 6. Pela falta de padronização de valores de CIM e, conseqüentemente, de pontos de corte para os antibióticos não clássicos, timol, carvacrol e H₂O₂, uma análise como a que foi há pouco descrita não pode ser realizada para estas substâncias.

TABELA 6. Cepas de *Staphylococcus* spp. com padrões de sensibilidade inalterados para concentração inibitória mínima e concentração inibitória mínima em biofilme, em µg/mL, pela técnica de microdiluição (n=6).

CEPAS	CIPROFLOXACINA		CLORANFENICOL		GENTAMICINA		TIMOL		CARVACROL	
	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB
<i>S. intermedius</i> 17 OEE	0,25	0,5	4	16	4	32	256	512	512	512
<i>S. intermedius</i> 18 OED	0,25	2	8	8	2	16	512	512	256	512
<i>S. intermedius</i> 21 OEE	0,5	2	4	32	4	4	256	256	512	512
<i>S. intermedius</i> 26 OMD	0,5	0,5	8	16	0,5	32	128	256	128	512
<i>S. simulans</i> 14 OMD	0,5	2	16	16	4	4	32	512	32	512
<i>S. simulans</i> 28 OME	0,5	0,5	16	16	2	32	32	512	32	512

Conforme os resultados alcançados para as 16 cepas clínicas, três (5%) cepas inicialmente sensíveis a ciprofloxacina pelo teste de microdiluição em suas formas planctônicas passaram a exibir resistência ao antibiótico (*S. simulans* 02 OEE, *S. intermedius* 06 OEE e *S. intermedius* 27OEE). De forma semelhante, seis (37,5%) cepas apresentaram resistência ao cloranfenicol (*S. simulans* 02 OED, *S. simulans* 02 OEE, *S. simulans* 04 OEE, *S. intermedius* 06 OEE, *S. intermedius* 21 OEE e *S. intermedius* 27OEE). Para a gentamicina, o número foi ainda maior – 13 (81%) cepas exibiram resistência, e apenas três cepas se mantiveram sensíveis a droga (*S. intermedius* 03 OEE, *S. simulans* 14 OMD e *S. intermedius* 21 OEE).

Para algumas cepas, o valor da CIMB chegou a ser 64 vezes maior do que o valor da CIM (*S. intermedius* 15 OED, *S. intermedius* 26 OMD, *S. intermedius* 27 OEE, *S. intermedius* 35 OEE e *S. simulans* 02 OEE), mostrando grande aumento da resistência dessas cepas quando em biofilme (TABELA 7).

TABELA 7. Cepas de *Staphylococcus* spp. com valores de concentração inibitória mínima em biofilme 64 vezes maior do que valores de concentração inibitória mínima, em µg/mL, pela técnica de microdiluição (n=5).

CEPAS	GENTAMICINA		TIMOL		CARVACROL		* H ₂ O ₂	
	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB	CIM	CIMB
<i>S. intermedius</i> 15OED	2	16	64	512	64	2048	64	4096
<i>S. intermedius</i> 26OMD	0,5	32	128	256	128	512	128	2048
<i>S. intermedius</i> 27OEE	2	64	64	2048	64	1024	64	4096
<i>S. intermedius</i> 35OEE	1	16	32	2048	32	2048	128	1024
<i>S. simulans</i> 02OEE	2	32	64	1024	64	4096	128	4096

*valores em ppm (m/v)

Os cálculos estatísticos indicaram que, ante os seis antibióticos, os valores de CIMB foram maiores do que os valores de CIM para todas as cepas consideradas juntamente (p-valor de 0,0000008 a 0,00001); para as cepas de *S. intermedius* (p-valor de 0,00005 a 0,0004) e *S. simulans* (p-valor de 0,0072 a 0,0232). Quando as taxas de aumento dos valores de CIMB em relação aos de CIM foram estatisticamente avaliadas, comparando cada um dos agentes antimicrobianos, observou-se que essas taxas eram diferentes entre si (p-valor 0,0001) e que era possível ordenar estas drogas de acordo com seu potencial de ação antibiofilme. Estes dados são expostos na TABELA 8.

TABELA 8. Taxas médias de aumento entre a concentração inibitória mínima e a concentração inibitória mínima em biofilme para todas as cepas de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme.

ANTIBIÓTICOS	TAXAS DE AUMENTO		
	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>S. intermedius</i>	<i>S. simulans</i>
CIPROFLOXACINA	7,23	7,59	6,27
CLORANFENICOL	3,47	3,91	2,8
GENTAMICINA	16,24	15,55	14,6
TIMOL	12,94	14,36	12
CARVACROL	17,41	15,64	23,2
H2O2	22,71	26,18	18

7 - DISCUSSÃO

Otite canina é uma afecção muito comum que, quando não diagnosticada ou tratada corretamente, pode levar os animais acometidos à surdez e, ainda, a alterações de postura e comportamento, como o balançar constante da cabeça ou andar em círculos. Sinais clínicos encontrados em cães otopatas incluem odor fétido, edema local e otorreia (CARDOSO et al., 2010; LEITE, 2000; LOGAS, 1994). A otite externa canina representa 8-15% dos casos atendidos na prática veterinária no Brasil, com destaque para a OEC, responsável por até 76,7% dos casos (FARIAS, 2008; OLIVEIRA et al., 2008). Em doenças infecciosas de grande importância, como a otite canina, o diagnóstico clínico e etiológico, seguido de tratamento, adequado é fundamental. Vários estudos descrevem o perfil de isolamento microbiológico e de sensibilidade a antimicrobianos da otite canina (COLE et al., 1998; COLOMBINI; MERCHANT; HOSGOOD, 2000; LEITE, 2003; LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006; VANNI et al., 2009; WERCKENTHIN et al., 2001).

A identificação precisa e definitiva de microorganismos, incluindo bactérias, é um dos pilares que formam a fundação conjunta dos campos de microbiologia e doenças infecciosas. A nomenclatura bacteriana, portanto, fornece o fundamento no qual as relações parasita-hospedeiro são definidas, os esquemas terapêuticos são desenvolvidos e as investigações epidemiológicas são incitadas. Porém, a identificação bacteriana é um processo complexo e de constante evolução, em decorrência de novos conhecimentos adquiridos e novas técnicas desenvolvidas pela comunidade científica (JANDA; ABBOTT, 2002; SCHLEIFER, 2009; STALEY, 2006).

Nos últimos anos, o gênero *Staphylococcus* passou por inúmeras mudanças taxonômicas, decorrentes da introdução de novas ferramentas para identificação destas bactérias. Acompanhar estas mudanças é uma tarefa importante para os microbiologistas, uma vez que a taxonomia é sugestiva do potencial de virulência e da resistência a antimicrobianos (DEVRIESE et al., 2009; JANDA; ABBOTT, 2002; SASAKI, 2007).

Neste estudo, 54 cepas clínicas isoladas de cães com diagnóstico clínico e laboratorial de otite foram estudadas. Inicialmente seguiu-se a identificação das cepas. Os resultados da identificação bacteriana por automação diferiram dos resultados obtidos anteriormente por identificação manual (OLIVEIRA et al., 2006). Enquanto todos os isolados foram originalmente identificados como cepas de *S. intermedius*, na nova identificação, as cepas

foram divididas entre cinco espécies diferentes, e somente cerca de 50% das cepas foram reclassificadas como *S. intermedius*. Todas as cepas, contudo, foram reconhecidas como do gênero *Staphylococcus*. Além das 28 cepas de *S. intermedius* (52%), o outro grande grupo foi de cepas da espécie *S. simulans* (41%).

Apesar de ambas as identificações realizadas – no momento do isolamento e neste estudo – serem baseadas em testes fenotípicos, a discordância entre os resultados das duas pode ser explicada pela diferença no número de testes realizados (27 testes na primeira identificação contra 47 realizados desta vez) e por deficiências próprias da identificação fenotípica (JANDA; ABBOTT, 2002).

Todos os sistemas usados para identificar as bactérias, sejam por provas fenotípicas ou genotípicas, têm limitações, pois não possuem uma metodologia simples que fornecerá resultados 100% exatos. Os sistemas de identificação fenotípica, abordagem mais comum utilizada em laboratórios clínicos para identificação de bactérias, têm algumas desvantagens. Em contraste com as propriedades determinadas por métodos de biologia molecular, como a hibridização de DNA, as propriedades bioquímicas não refletem exatamente a extensão completa da complexidade genômica de uma determinada espécie. Além disso, propriedades fenotípicas podem ser instáveis e, por vezes, a expressão pode ser dependente de mudanças nas condições ambientais, por exemplo, o substrato de crescimento, temperatura e níveis de pH (STALEY, 2006).

Apesar dessas deficiências, os sistemas comerciais servem muito bem os laboratórios de microbiologia clínica na identificação de rotina dos agentes infecciosos de importância clínica. Dado o número de isolados testados com esses sistemas de alta capacidade, os sistemas comerciais são muito precisos para as espécies mais comuns. O sistema Vitek2 foi escolhido em virtude de sua rapidez e acurácia (LIGOZZI et al., 2002).

O *S. intermedius* é rotineiramente descrito como um dos principais microrganismos isolados de cães (LEITE, 2003; LILENBAUM et al., 2000; NOBRE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Neste relatório, mesmo com a reidentificação de várias cepas da coleção estudada, *S. intermedius* permaneceu a espécie de maior expressão do conjunto. Porém, devido a pressões da comunidade científica para a mudança da classificação de cepas dessa espécie, há uma nítida tendência para mudança nesse perfil, onde *S. intermedius* não seria mais a principal espécie de estafilococos isolada de cães (DEVRIESE et al., 2009).

Estudos recentes asseguram que a maioria dos estafilococos identificados como *S. intermedius*, principalmente isolados de cães, são na verdade cepas de *S. pseudintermedius* (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2009; SASAKI et al., 2007). Um estudo

japonês, de 2007, reavaliou isolados clínicos, fenotipicamente identificados como *S. intermedius*, usando sequências de DNA dos genes *sodA* e *hsp60* que identificaram as cepas como três espécies diferentes (SASAKI et al., 2007). Os autores sugerem, para a reidentificação, o conceito de um SIG, formado por quatro divisões: (1) *S. pseudintermedius*, nova espécie descrita por Devriese et al. (2005), agora reconhecida como a mais frequentemente isolada de cães e com comprovada transmissão zoonótica para humanos; (2) *S. delphini* grupo A, e (3) *S. delphini* grupo B, isoladas de golfinhos, pombos domésticos e equinos, potencialmente com maior importância clínica do que antes pensado; e, por fim, (4) *S. intermedius*, até então tida como a principal responsável por infecções de pele em cães, fica com seu isolamento restrito a cepas isoladas de pombos selvagens (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2005; GUARDABASSI; LOEBER; JACOBSON, 2004; GUARDABASSI; SCHARZ; LLOYD, 2004; SASAKI et al., 2007). Há, portanto, intensa pressão para a reclassificação das cepas de *S. intermedius* já identificadas (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2009; SASAKI et al., 2007).

Neste estudo, o uso do sistema automatizado Vitek2, como a maioria das técnicas de identificação adotadas em laboratórios clínicos, não permite essa diferenciação adequada entre as duas espécies: *S. intermedius* e *S. pseudintermedius*. A diferenciação só é realizada de forma definitiva com o uso de provas genéticas (BANNOEHR et al., 2009; DEVRIESE et al., 2005; HANSELMAN; KRUTH; WEESE, 2008). Sasaki et al. (2007), no entanto, sugerem que essa reclassificação poderia ser inferida com a reavaliação de algumas provas bioquímicas. O *S. intermedius*, diferente das outras duas espécies do SIG, é capaz de acidificar beta-gentiobiose em aerobiose e D-manitol em anaerobiose, mas falha em reagir aos testes de arginina di-hidrolase. Essa análise permite diferenciar o *S. intermedius* do restante do SIG, porém, não há diferença nos testes fenotípicos capaz de diferenciar entre cepas de *S. pseudintermedius* e *S. delphini* grupo A ou B de forma definitiva.

Desta forma, se os testes do Vitek2 forem analisados individualmente (dados não mostrados), mesmo que fugindo um pouco da metodologia original da técnica, pode-se sugerir que as cepas deste estudo reidentificadas como da espécie *S. intermedius* seriam provavelmente de outras espécies do grupo SIG, sem ser possível definir qual (SASAKI et al., 2007). O fato de as cepas avaliadas neste estudo, porém, terem sido isoladas de cães é indício de que sejam na realidade cepas de *S. pseudintermedius*. Devriese e colaboradores (2009) chegam a afirmar: "*Pode-se concluir que cepas de cães identificadas por métodos tradicionais (como S. intermedius) devem ser referidas como S. pseudintermedius, a não ser que uma investigação genômica mostre que pertençam a outra espécie relacionada.*"

S. simulans não é tão comumente isolado de cães com otite, mas existem relatos, em concordância com a identificação aqui procedida, que mostram uma presença expressiva dessa espécie de estafilococos entre isolados clínicos de cães otopatas. Lilenbaum et al. (2000) isolaram cepas estafilocócicas de cães com otite e relataram frequência de quase 16% de *S. simulans* entre os isolados. Uma espécie que aufere importância, principalmente em razão do papel crescente na etiologia da mastite bovina, *S. simulans* é uma bactéria com potencial zoonótico (BARNHAM et al. 1996; LILENBAUM et al., 2000; MALES; BARTHOLOMEW; AMSTERDAM, 1985; VALLIANOU et al., 2008).

Entre as 54 cepas clínicas identificadas, apenas nove cepas (17%) eram provenientes de cães com otite média, sendo os 83% restantes isolados de animais com otite externa, refletindo a predominância deste quadro nos atendimentos veterinários (CARDOSO et al., 2010; LILENBAUM et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008). Entre as cepas provindas de cães com otite média há um predomínio de cepas de *S. simulans*. Observa-se que 56% dessas cepas são *S. simulans* (44% são *S. intermedius*) e que, entre as cepas de *S. simulans*, 23% são isoladas de otite média, comparando a somente 14% das cepas de *S. intermedius*.

A formação de biofilme é considerada por muitos autores como um marcador de virulência, que pode ser detectado fenotipicamente por diversos métodos (ARCIOLA et al., 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002; GOTZ, 2002; JAIN; AGARWAL, 2009). Porém, outros defendem a idéia de que a produção de biofilme pode não ser um fator de virulência, uma vez que muitas bactérias não patogênicas também são capazes de formar o biofilme (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005; HANCOCK, V.; DAHL, M.; KLEMM, 2010). No segundo momento, a classificação fenotípica das cepas, em produtoras e não-produtoras de biofilme, foi realizada.

Em estudo pioneiro, Olson et al. (2002) usaram o dispositivo de Calgary para testar a capacidade de formação de biofilme de várias bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de importância veterinária, isoladas de bovinos, ovinos, suínos e aves (CERI et al., 1999; OLSON et al., 2002). Neste experimento, a escolha por um teste fenotípico em detrimento de outras metodologias foi feita em virtude da implicação desse resultado nos demais tentames a serem realizados. O teste do AvC permite identificar cepas estafilocócicas que são capazes de produzir EPS e formar biofilme por si, na apresentação fenotípica expressada no momento do teste (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989). Isso, de fato, não implica que as cepas classificadas como não-produtoras não possam ser, em outras condições, encontradas em ambiente de biofilme. Como descrito anteriormente, muitos biofilmes envolvem mais de um microorganismo; e nem todas as espécies vivendo nesses biofilmes têm participação na

produção da matriz extracelular, podendo ter outras funções nessa comunidade (APARNA; YADAV, 2008; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Para que os testes de sensibilidade, que foram realizados com cada cepa individualmente, fossem fidedignos era crucial, contudo, que as cepas fossem capazes de formar biofilme por si, nas condições de estudo. Vale ressaltar, ainda, a existência de vários estudos que defendem a acurácia e confiabilidade dessa prova, e mostram, também, forte relação entre os resultados do AvC e outros métodos que evidenciam a formação de biofilme (ARCIOLA et al., 2002; JAIN; AGARWAL, 2009; DHANAWADE et al., 2010).

Jain & Agarwal (2009) utilizaram o teste do AvC para confirmar a produção de biofilme em cepas de estafilococos (patogênicas e comensais), avaliando sua sensibilidade e especificidade em comparação ao método de microplaca com o uso de cristal violeta para caracterizar a produção de biofilme. A sensibilidade e a especificidade do AvC para detecção de cepas de *S. aureus* produtoras de biofilme foram de 90.63% e 90.79%, respectivamente, e de 75.86% e 96.88%, para CNS. Os autores concluem que o AvC é um método que pode ser usado com sucesso para determinar o potencial de produção de biofilme de isolados clínicos.

Já existem métodos moleculares desenvolvidos para fornecer evidência direta da base genética das características reconhecidas fenotipicamente pelo teste do AvC e envolvidas na formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. Tais provas se tornaram disponíveis com a descoberta de que a síntese de EPS/PIA nessas espécies é controlada pelo operon *ica*. O locus de adesão intercelular (*ica*) consiste dos genes *icaADBC* e codifica proteínas que mediam a síntese de PIA e PS/A (polissacarídeo/adesina) nas espécies estafilocócicas. Entre os genes *ica*, *icaA* e *icaD* desempenham papéis significantes na formação de biofilme (ARCIOLA et al., 2001; GAD et al., 2009; GOTZ, 2002).

Dois grupos de estudo, Arciola e colaboradores (2002) e Dhanawade et al. (2010), compararam separadamente os resultados do teste do AvC com resultados de ensaios por técnicas de biologia molecular para determinar a formação de biofilme por cepas de *Staphylococcus* spp. Os autores dos dois estudos reconhecem que, apesar das provas genéticas apresentarem maior precisão na classificação de produtores e não-produtores de biofilme, o AvC é método rápido, confiável, com boa reprodutibilidade, que exibe concordância notável com os demais métodos.

Ao todo, 30% das cepas se mostraram capazes de produzir biofilme de acordo com os resultados do AvC. Analisando as duas espécies com cepas produtoras, separadamente, 40% das cepas de *S. intermedius* foram classificadas como produtoras de biofilme, e 23% das cepas de *S. simulans* receberam a mesma classificação. O estudo indiano de Dhanawade et al.

(2010) identificou cerca de 45% de cepas produtoras de biofilme entre 102 isolados de *S. aureus* de origem bovina (mastite subclínica), mostrando uma proporção entre produtores e não produtores próximas aos resultados aqui descritos.

De acordo com pesquisa recente da literatura internacional, este é o primeiro estudo que relata a produção de biofilme monoespécie por cepas de *S. simulans*. Alguns relatos encontrados fazem apenas menção a *S. simulans* dentro de biofilme multiespécie, mas não como o microrganismo principal formador de biofilme (CHORIANOPOULOS et al., 2008; TEH; FLINT; FRENCH, 2010).

Em pesquisa semelhante, apenas um estudo avalia a formação de biofilme por cepas de *S. intermedius*. No estudo japonês, os autores optaram, no entanto, por aceitar a premissa de que todas as cepas clínicas de *S. intermedius* estudadas eram formadoras de biofilme. Portanto, é realizada apenas a avaliação do grau de atividade de formação de biofilme por essas cepas, sem antes ser aplicado um teste prévio para determinar quais cepas são, de fato, capazes de formar biofilme (FUTAGAWA-SAITO et al., 2006).

Assim como outros autores, percebeu-se, durante o teste do agar vermelho Congo, que, apesar de a maioria das cepas apresentar colônias facilmente classificadas com 24 horas de incubação, três cepas (*S. simulans* 04 OEE, *S. simulans* 14 OMD e *S. simulans* 28 OME) precisaram de cultivo por 48 horas para apresentar um aspecto definitivamente positivo (ARCIOLA et al., 2002; MARIANA et al., 2009). Isto decorre do fato de que as colônias não se apresentam sempre em cores nitidamente distintas. Não existem apenas cepas negativas ao teste com colônias claramente vermelhas e cepas positivas com colônias notadamente enegrecidas, mas há um leque de cores e tons como descrito nas escalas de avaliação apresentadas nas FIGURAS 9 e 10, de forma semelhante a outros estudos. Alguns autores relacionam esses nuances com os diferentes graus de formação de biofilme (ARCIOLA et al., 2002). Enquanto os fortes produtores apresentam cepas bem escuras (como visto na cepa controle de *S. aureus* ATCC 25923 – FIGURA 17), os produtores fracos podem apresentar colônias mais claras, mesmo que ainda dentro da escala de tonalidades positivas (FIGURA 16). Esse caráter subjetivo do teste é por vezes criticado, mas tal característica não foi empecilho para uma fácil classificação das cepas avaliadas neste estudo, no entanto, foi realizada nova prova para fornecer uma confirmação visual da propriedade de formação de biofilme para quatro cepas selecionadas.

A visualização das cepas, após cultivo em condições que permitiriam a formação de biofilme por aquelas capazes, por MEV, permitiu a corroboração dos achados pelo AvC. A MEV foi um dos primeiros métodos utilizados para visualização e estudo dos biofilmes e

ainda hoje é largamente usada para a avaliação direta de biofilme em diversas superfícies (BEZERRA et al., 2009; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; GAD et al., 2009; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; OKAJIMA et al., 2006; TRAN et al., 2009; VERGARA-IRIGARAY et al., 2009). A grande desvantagem do método é a perda de alguns componentes estruturais durante o preparo (fixação, desidratação e metalização). É, todavia, um método mais rápido e prático para quando se quer apenas a confirmação da presença de biofilme ou não (BEZERRA et al., 2009; GAD et al., 2009; TRAN et al., 2009).

Existe uma nítida diferença entre as imagens das cepas produtoras (FIGURAS 21 e 22) e não-produtoras (FIGURAS 23 e 24) de biofilme a MEV. Apesar das cepas produtoras não ocuparem todo campo da lâmina, formando um biofilme vigoroso, como talvez esperado, observa-se a presença de uma matriz extracelular inicial, envolvendo as bactérias, que, por sua vez, estão aglomeradas em várias camadas.

Um dos fatores que influenciam a formação de biofilme é a superfície de adesão. A forma, composição e localização deste substrato podem ser cruciais. As superfícies ásperas são mais suscetíveis à formação de biofilme, provavelmente em consequência à redução das tensões de cisalhamento e ao aumento da área de superfície disponível. Estudos indicam que os biofilmes tendem a se formar mais facilmente em materiais hidrofóbicos, como o teflon e outros plásticos, comparando ao vidro e metais (APARNA; YADAV, 2008; KOSTENKO et al., 2010).

Em experimentos-pilotos (dados não apresentados), o cultivo do biofilme em membrana filtrante permitiu o desenvolvimento de um biofilme mais exuberante (FIGURA 4). Contudo, o material, ao qual este biofilme se encontrava aderido (celulose) não resistiu ao calor produzido pelo feixe de elétrons necessário para captura de imagens de maior magnitude, fato que inviabilizou se empregar na metodologia esse tipo de substrato. Por outro lado, embora resistente aos feixes de elétrons, o vidro das lâminas usadas não é um material que permite boa adesão e conseqüente formação de biofilme ótima. Levando tais fatos em consideração, e apesar da visualização de apenas biofilmes de crescimento tímido, foi possível confirmar que as cepas classificadas pelo teste do AvC eram realmente produtoras ou não-produtoras, como esperado.

Em um momento diferente, as 54 cepas foram submetidas a um ou mais testes de sensibilidade a antimicrobianos. O teste realizado por automação foi universal para todas as cepas clínicas, e os testes por técnicas de microdiluição foram reservados apenas para as cepas produtoras de biofilme.

No estudo sob relatório, de modo geral, os percentuais de resistência encontrados foram baixos, não ultrapassando a taxa de 30% das cepas avaliadas para nenhuma das drogas. Segundo Clarke (2006), a resistência a antimicrobianos de patógenos em pequenos animais varia consideravelmente, dependendo do microrganismo estudado, da história de exposição a antimicrobianos e da região geográfica.

Na medicina veterinária, doenças bacterianas podem exibir um elevado nível de resistência aos antibióticos (CARDOSO et al., 2010; LILENBAUM et al., 2000; MORRIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; PEDERSEN et al., 2007). Werckenthin e colaboradores (2001), contudo, asseveram que embora os estafilococos isolados de animais apresentem resistência a certos antibióticos, em sua maioria, suas taxas de resistência são mais baixas do que as de isolados clínicos humanos. Diferente de grande parte da literatura, as cepas deste estudo não apresentaram elevada resistência aos antibióticos testados pelo painel GP, do sistema Vitek2 (CARDOSO et al., 2010; GANIÈRE, MÉDAILLE; MANGION, 2005; LILENBAUM et al., 2000; PEDERSEN et al., 2007). Apenas uma cepa de *S. haemolyticus* exibiu largo espectro de resistência, englobando nove formulações antimicrobianas diferentes. Ao todo, só 26% das cepas foram resistentes a pelo menos um dos 17 antibióticos do painel GP. Em estudo canadense, Authier et al (2006) também encontraram baixas taxas de resistência para isolados bacterianos de cães e gatos entre as espécies de *Staphylococcus*. As taxas de resistência variaram de 5 a 22% nos dois momentos avaliados no estudo, com exceção de penicilina e ampicilina, que apresentaram taxas de 67% ou mais.

No Brasil, um estudo de 2000 apresentou dados de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. de otite externa canina, com índices de resistência elevados. Cerca de 90% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos uma das oito drogas testadas (LILENBAUM et al., 2000). Shimizu et al. (2001) relataram os padrões e taxas de resistência de cepas clínicas de *S. intermedius* isoladas de cães hígidos e doentes, durante um intervalo de 18 anos no Japão, e encontraram uma taxa geral de 36,7% para os antibióticos tetraciclina, kanamicina, eritromicina, valomicina e lincomicina. Ganière, Médaille & Mangion (2005), na França, analisaram a resistência a antimicrobianos de cepas de *S. intermedius* isoladas de piodermite em cães. Encontraram percentuais de 60% de resistência a penicilina, 46% ao cloranfenicol, 30% a eritromicina, 28% a clindamicina, 22% a doxiciclina, 6% a gentamicina e 2% a fluoroquinolonas. Varges e colaboradores (2009) apresentaram, além de altos índices de resistência de cepas de estafilococos (92%), a caracterização de cepas multirresistentes de *S. intermedius* e *S. simulans*.

A grande variedade de padrões de resistência para os *Staphylococcus* spp. reforça a importância do uso de teste de sensibilidade para guiar o tratamento de infecções caninas causadas por bactérias deste gênero. O monitoramento continuado de isolados estafilocócicos de cães hígidos e doentes é, portanto, de grande importância na escolha dos agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções e para encorajar o uso prudente de antibióticos em animais de estimação (VANNI et al., 2009).

É interessante notar que os isolados produtores de biofilme não apresentaram maior resistência, *in vitro*, do que os não-produtores, em sua forma livre; contrariando a idéia de que estes microrganismos seriam, por definição, mais resistentes a estas drogas. Deve-se atentar para o fato de que a resistência aos antibióticos por bactérias produtoras de biofilme está vinculada ao crescimento dentro do ambiente específico do biofilme, e não em crescimento planctônico (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005).

Para os testes de microdiluição foram escolhidas seis substâncias a serem testadas que podem ser divididas em dois grandes grupos: (i) drogas classicamente definidas como antibióticos e usualmente encontradas em formulações comerciais de uso otológico – ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina; e (ii) drogas que apresentam resultados experimentais de ação antimicrobiana, mas não são considerados como antibióticos clássicos – timol, carvacrol e peróxido de hidrogênio.

Entre os antibióticos clássicos a ciprofloxacina é uma quinolona de 3ª geração com atividade *in vitro* contra Gram-negativas (incluindo pseudomonas) e estafilococos, estendendo sua atuação para tratamentos sistêmicos. A ação bactericida da ciprofloxacina resulta da inibição da topoisomerase bacteriana do tipo II (DNA girase) e topoisomerase IV, necessárias para a replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano. (GOERKE; KOLLER; WOLZ, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Já o cloranfenicol, potente inibidor da síntese de proteínas microbianas e, em menor grau, de células eucarióticas, é um antibiótico bacteriostático. Considerado um antimicrobiano de amplo espectro, este foi o primeiro antibiótico a ser manufaturado sinteticamente em grande escala. Eficaz contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e riquetsias, hoje tem aplicação restrita como tratamento alternativo de infecções graves do sistema nervoso central e epiglote aguda em crianças ou em formulações de uso tópico. Tal restrição decorre de sua associação com anemia aplástica, situação rara, porém fatal. A permanência de uso decorre mais do baixo custo. A ação do cloranfenicol resulta da ligação à subunidade 50s do ribossomo, interferindo na ligação de novos aminoácidos, e, o crescimento microbiano recomeça quando se interrompe a administração (FALAGAS; GRAMMATIKOS;

MICHALOPOULOS, 2008; HAHN; WISSEMAN JR.; HOPP, 1955; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008)

Enfim, a gentamicina, protótipo do grupo dos aminoglicosídeos é usada principalmente no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas aeróbias e alguns estafilococos. Conhecidamente ototóxica e nefrotóxica, continua sendo largamente utilizada, no entanto, por ter comprovada eficácia, bem como raro desenvolvimento de resistência bacteriana, pequeno risco de alergias e baixo custo, especialmente no tratamento de pacientes hospitalizados com infecções graves. Este bactericida inibe a síntese protéica ao se ligar à subunidade 30s do ribossomo microbiano, causando, por fim, a morte bacteriana (DRUSANO et al., 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

No teste de microdiluição em caldo para determinação de CIM, todas as cepas clínicas formadoras de biofilme se mostraram sensíveis aos antibióticos clássicos ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina. Este resultado era de certa forma esperado, após o teste de sensibilidade automatizado, uma vez que nenhuma das cepas produtoras de biofilme apresentou resistência a estas classes de antimicrobianos.

A capacidade de resistência de microrganismos ao sistema imune de hospedeiros e a antibióticos, dentro e fora do ambiente de biofilme, são a razão para que vários grupos de pesquisa investiguem possíveis estratégias, que podem ser usadas auxiliando ou como alternativas à terapia antimicrobiana. Atualmente muitos compostos de origem vegetal são foco de estudo para desenvolvimento de novas drogas antibióticas e drogas com ação antibiofilme (BURT, 2004; FRANK et al., 2007; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; GANDER et al., 2004; KNOWLES et al., 2005; KUZMA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007; NOSTRO et al., 2009).

Nos últimos anos, vários produtos antimicrobianos naturais foram e são isolados de um largo espectro de espécies animais, vegetais e bacterianas. Estes compostos, que compreendem uma classe diversificada de moléculas usadas na defesa natural dessas espécies, podem ter um potencial terapêutico no tratamento de infecções na medicina humana e veterinária (KUZMA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2007; NURYASTUTI et al., 2009).

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Óleos essenciais, conforme a Organização Internacional de Padronização (ISO), no documento 9235 (1997), são produtos obtidos de partes de plantas mediante a destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos pelo processamento mecânico (prensagem) dos pericarpos de frutos cítricos de rutáceas (ISO, 1997; SIMÕES et al., 2007).

Estes produtos podem ser adquiridos de material vegetal aromático (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) (GUENTHER, 1948, apud BURT, 2004). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, normalmente odoríferas e líquidas, que normalmente possuem um ou dois compostos farmacologicamente ativos majoritários. Assim, no tomilho, há o timol (até 60%); na canela, o cinamaldeído (até 75%); e, no orégano, o carvacrol (até 80%) e o timol (até 64%) (BURT, 2004). Já há algum tempo se reconhece o fato de que alguns óleos essenciais e seus componentes majoritários têm propriedades antimicrobianas, por outro lado, os mecanismos de ação destes compostos e seus constituintes não estão totalmente estabelecidos (BURT; REINDERS, 2003; DORMAN; DEANS, 2000; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; KALEMBA; KUSEWICZ; SWIADER, 2002; LAMBERT et al., 2001; POZZATTI, et al., 2010; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

Dorman & Deans (2000) sugerem que a maioria dos óleos essenciais exerça sua atividade antimicrobiana por intermédio de modificações na estrutura da parede celular de microrganismo, com a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática pela modificação no gradiente de íons de hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). Desta forma, ocorre perda do controle quimiosmótico da célula e consequente morte do microrganismo.

Para este trabalho, foram investigadas a ação antibiótica e antibiofilme *in vitro* de carvacrol e timol, isoladamente. Os dois isômeros (2-isopropil-5-metil-fenol), extraídos do óleo essencial de orégano, se diferenciam apenas pelo posicionamento do grupo hidroxila em um local diferente no anel fenólico (FIGURA 8) (BURT, 2004; LAMBERT et al., 2001). Lambert et al. (2001) afirmam que os componentes fenólicos são os principais responsáveis por essa atividade e demonstraram que timol e carvacrol se acumulam na membrana celular de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, resultando no aumento da permeabilidade em 90% das células destes microrganismos.

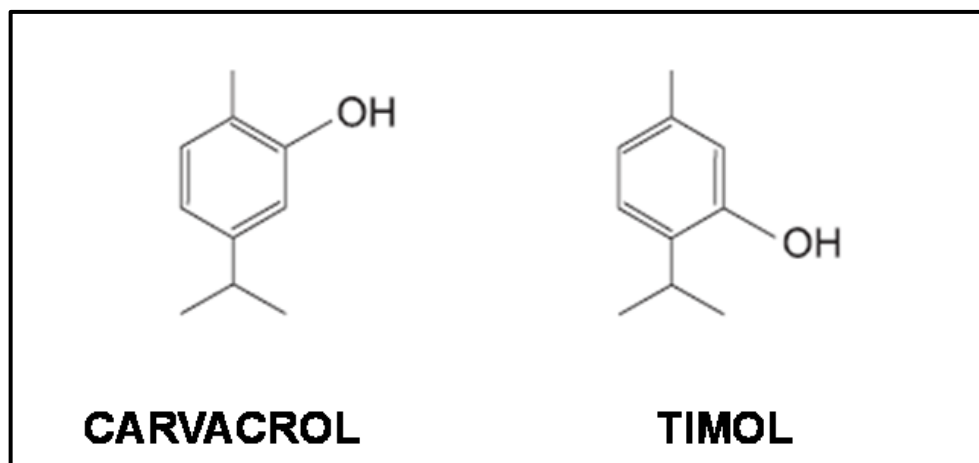


FIGURA 24. Estrutura química das moléculas de carvacrol e timol. Fonte: Figura adaptada de Burt, 2004.

A atividade antibacteriana *in vitro* de timol e carvacrol é bem demonstrada contra uma variedade de bactérias, especialmente Gram-positivas (KNOWLES et al., 2005; LAMBERT et al., 2001; NOSTRO et al., 2004). A ação especificamente contra *Staphylococcus* spp. destes compostos também é relatada. Em 2004, Nostro et al. observaram que carvacrol e timol foram mais ativos contra isolados de *Staphylococcus aureus* do que o óleo essencial de orégano. Alguns anos depois, Nostro et al. (2007) mostraram a atividade antimicrobiana, do óleo essencial de orégano e das suas frações majoritárias de carvacrol (> 97%) e timol (> 99%), contra isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis* formadores de biofilmes.

Lambert e colaboradores (2001) descrevem CIMs para *S. aureus* de 140 µg/mL e 175 µg/mL, ante o timol e o carvacrol, respectivamente; enquanto este ensaio, no presente estudo, demonstrou que timol e carvacrol nas concentrações médias de 137 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente, têm ação inibitória contra cepas de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. simulans*. A ação biocida destes agentes é alcançada por alterações na membrana da célula bacteriana que resultam em extravasamento de ATP e íons potássio intracelulares e consequente morte celular (KNOWLES et al., 2005; LAMBERT et al., 2001).

A associação da resazurina ao ensaio de microdiluição em caldo é um procedimento simples, que acrescenta apenas uma etapa ao processo, sendo de fácil uso em ensaios com placas de microtitulação ou mesmo em estudos de larga escala. A resazurina não é tóxica ao investigador ou às células de estudo, sendo de fácil descarte e menos provável de interferir no metabolismo das células-teste. Usada em ensaios com microrganismo, tanto em estado livre como sésil, os resultados após a adição da resazurina podem ser coletados a olho nu ou com o auxílio de instrumentos de leitura de fluorescência ou absorvância (PETTIT et al., 2005; SARKER; NAHAR; KUMRASAMY, 2007; TOTÉ et al., 2008).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um oxidante poderoso presente na natureza e participa do metabolismo de vários seres vivos. Relativamente inerte do ponto de vista químico, é potencialmente citotóxico para células de mamíferos e a maioria dos procariontes. Reconhecido como um agente antimicrobiano e um agente oxidante de grande versatilidade, o peróxido de hidrogênio é comumente usado para fins medicinais. Popularmente conhecido como água oxigenada, é um líquido, claro, ligeiramente mais viscoso do que a água, que parece incolor em soluções diluídas e tem odor característico. O H_2O_2 é um subproduto natural do metabolismo oxidativo de muitos organismos, o qual, quando decomposto cataliticamente, resulta em oxigênio molecular e água. Não é inflamável, é miscível com água em todas as proporções (ASAD et al., 2004; ASHBY, 2008; EARNSHAW; GREENWOOD, 2002; JONES, 1999; WARD, 1991).

Utilizado para as mais variadas finalidades, o H_2O_2 pode ser empregado tanto de forma isolada quanto combinada. Comumente empregado como alvejante, é também aplicado como oxidante de poluentes orgânicos e, na pesquisa aeroespacial, é aplicado para esterilizar os satélites artificiais e sondas espaciais. O H_2O_2 é amplamente utilizado na indústria farmacêutica (EARNSHAW; GREENWOOD, 2002; JONES, 1999; MATTOS, et al, 2003).

O H_2O_2 é mais comumente disponível como solução aquosa em concentrações que podem ser descritas em porcentagem. Por exemplo, uma solução a 5% apresenta 5% de H_2O_2 e 95% de H_2O em massa. As concentrações são, também, descritas em termos de volume de gás oxigênio gerado; um mililitro de solução de 20 volumes produz vinte mililitros de gás oxigênio quando completamente decomposto. Para o consumo geral e medicinal, está disponível em concentrações de 3 a 6% (m/v), que equivalem a 30.000 a 60.000 ppm, sendo empregado como um agente debridante oral, para a limpeza de feridas e remoção de tecido morto, incluído a limpeza de sítios de infecções de mucosa tais como otite externa e otite média (ASHBY, 2008; JONES, 1999; MATTOS, et al, 2003).

Com base em vários estudos *in vitro*, é sugerido que, em situações de competição por nutrientes e sítios de fixação, algumas bactérias produzem metabólitos, tais como ácidos graxos de cadeia curta, e substâncias antimicrobianas como H_2O_2 e bacteriocinas, como fatores competitivos bacterianos (BOWDEN; LI, 1997; HOJO, et al, 2009; KRETH, et al, 2005;. PANGSOMBOON, et al, 2009; VAN HOOGMOED, et al, 2008). Em ambiente oral, peroxidases de defesa associadas ao H_2O_2 usam ions inorgânicos para produzir ainda mais potentes do que o H_2O_2 . Mediante processos de glicólise anaeróbica, bactérias orais, como várias espécies de *Streptococcus*, podem produzir H_2O_2 , que será usado como antibiótico natural no controle de populações bacterianas na competição por nutrientes e áreas de adesão

(ASAD et al., 2004; ASHBY, 2008; BOWDEN; LI, 1997; HOJO et al., 2009; KRETH; ZHANG; HERZBERG, 2008; KRETH, et al, 2005;. PANGSOMBOON, et al, 2009; VAN HOOGMOED, et al, 2008; WARD, 1991). Dessa forma, a ação antimicrobiana observada neste estudo é não só explicada, como também esperada. Vale ressaltar que a média de CIM encontrada para as cepas de *Staphylococcus* spp. ante o H₂O₂, apesar de aparentemente alta, está bem abaixo das concentrações usadas em formulações de uso medicinal.

A determinação da CIM é o teste padrão para definir sensibilidade aos antibióticos. A CIM mede a ação de antibióticos contra microrganismos planctônicos e serve como referência importante no tratamento de muitas infecções agudas de interesse médico e veterinário (CERI et al., 1999; CLSI, 2008; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; OLSON et al., 2002). É razoável considerar, todavia que os resultados de testes convencionais para estabelecer sensibilidade a antibióticos, tais como metodologias de determinação de CIM, não são confiáveis para orientar o tratamento de infecções, a partir do momento em que é estabelecida a presença de biofilme. O uso de metodologia apropriada para a determinação de CIMB pode permitir uma seleção mais adequada de antibiótico e dosagem a ser usada no tratamento de infecções bacterianas específicas, se associadas a biofilme (CERI et al., 1999; JACQUES; ARAGON; TREMBLAY, 2010; OLSON et al., 2002).

No estudo sob relação, foi demonstrado que todos os antimicrobianos testados foram capazes de inibir biofilmes de estafilococos. Observou-se clara diferença de sensibilidade aos antimicrobianos entre as populações planctônicas (CIM) de cada uma das bactérias testadas e as populações em biofilme (CIMB) do mesmo microrganismo. Todos os isolados produtores de biofilme apresentaram médias de CIMB maiores do que as médias de CIM para os seis antibióticos usados (TABELA 5).

Entre as cepas clínicas formadoras de biofilme, 87,5% passaram a exibir valores de CIMB que ultrapassavam os pontos de corte para determinação de resistência para um ou mais dos três antibióticos clássicos, de acordo com o CLSI (2008). Para ciprofloxacina, 18,8% das cepas passaram para a categoria de resistentes; o mesmo acontecendo para 37,5% e 81,3% dos isolados testados em biofilme, ante o cloranfenicol e a gentamicina, respectivamente. Todas as amostras, no entanto, apresentaram valores de CIM para as três drogas, dentro do intervalo da categoria "sensível", pelos mesmos critérios.

Qu e colaboradores (2010) testaram a ação de gentamicina e ciprofloxacina contra biofilmes de CNS. Contrário aos achados deste estudo, esses autores demonstraram que nenhuma das duas drogas ora citadas, mesmo em altas doses, inibiu a maioria dos biofilmes de estafilococos. Por outro lado, concordando com os resultados deste estudo com cepas

estafilocócicas, Roveta e colaboradores (2007) e Wang, Wang & Liu (2009) descrevem efeito inibitório significativo de ciprofloxacina contra biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae*, respectivamente. Estes ensaios demonstram a capacidade das fluoroquinolonas de penetrar o EPS (ROVETA et al., 2007; WANG; WANG; LIU, 2009). Nuryastuti et al. (2009) apresentaram resultados variáveis do efeito antibiofilme da gentamicina, dependendo principalmente se as cepas envolvidas eram ou não resistentes à droga, já em sua forma planctônica.

Resultados obtidos no ensaio sob exame, assim como os obtidos por Dobinsky et al. (2003), comprovam o efeito do cloranfenicol sobre biofilme de cepas estafilocócicas. Os autores do estudo alemão sugerem que o efeito antibiofilme deste antibiótico está relacionado com um fator independente de *icaADBC* (DOBINSKY et al., 2003).

Com base nas taxas de aumento dos valores de CIMB em relação aos de CIM (TABELA 8), pode-se afirmar que, dentre os antibióticos clássicos, o cloranfenicol se mostrou o mais efetivo contra cepas de *Staphylococcus* spp. em biofilme. Com as concentrações médias cerca de 3,5 vezes maiores do que a CIM, foi comprovada uma ação inibitória sobre biofilme, porém, da mesma forma que ocorrido para ciprofloxacina, este aumento foi suficiente para levar os valores médios de CIMB para a faixa de sensibilidade intermediária, enquanto os valores para CIM se encontravam dentro da faixa sensível, de acordo com os critérios do CLSI (2008), expostos no QUADRO 3. Já a gentamicina apresenta o maior aumento, e passa a apresentar uma concentração inibitória média para as cepas em biofilme dentro da faixa de resistência (CLSI, 2008).

Estudos recentes confirmam os resultados dos experimentos ora relatados, que mostram atividade inibitória *in vitro* de timol e carvacrol contra biofilme de *Staphylococcus*, em concentrações elevadas (KNOWLES et al., 2005; NOSTRO et al., 2007; NOSTRO et al., 2009). Knowles e colaboradores (2005) observaram uma ação inibitória de carvacrol sobre biofilmes de *S. aureus*, porém, este efeito foi mais notável nas primeiras etapas de formação do biofilme que contra biofilme maduro. Por analogia, estes resultados podem ser extrapolados também para o timol. Em 2009, Nostro e colaboradores deram continuidade aos estudos publicados em 2007 com timol e carvacrol, inibindo biofilme de *Staphylococcus* spp., e testaram o uso de carvacrol em duas apresentações: líquido e vapor. Na publicação de 2007, o grupo italiano apresentou resultados que evidenciavam a ação de carvacrol e timol líquidos sobre a formação de biofilme e sobre biofilme maduro. Já em 2009, o mesmo grupo relata a atividade inibitória do carvacrol sobre bactérias dentro da matriz do biofilme e alterações provocadas na arquitetura típica do biofilme de estafilococos (NOSTRO et al, 2007;

NOSTRO et al, 2009). Especula-se a ideia de que a atividade antibiofilme *in vitro* de produtos fitoquímicos, como timol e carvacrol, tenha relação com a pequena massa molecular e relativa hidrofilicidade desses agentes, e que, associada com suas propriedades antibióticas inatas, seja suficiente para desestabilizar a matriz e iniciar o descolamento do biofilme (EL-AZIZI et al., 2005; KNOWLES et al., 2005). Esses achados apontam para um papel proeminente dos componentes do óleo essencial de orégano em novas pesquisas de agentes antimicrobianos com ação antibiofilme.

O H_2O_2 , diferente de outras espécies reativas de oxigênio, não é carregado e pode penetrar membranas celulares facilmente; desta forma, o estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 ocorre dentro das células sempre que há H_2O_2 no ambiente extracelular. O peróxido de hidrogênio é produzido como um antibiótico natural por e para a defesa de células bacterianas, vegetais e animais (FEE, 1982; IMLAY, 2008).

Knowles et al. (2005) apresentaram resultados da atividade antibiofilme de um desinfetante comercial que tem entre seus componentes o peróxido de hidrogênio a 0,8% (8000 ppm) e ácido peracético a 0,06%. Para os ensaios realizados, o produto foi diluído em água a 20%, resultando numa concentração final de 1600 ppm para o H_2O_2 . Em comparação ao carvacrol, a ação inibitória do desinfetante foi superior nas etapas iniciais da formação do biofilme. Os autores relacionam a atividade antibiofilme deste produto com a habilidade de seus componentes em formar espécies reativas de oxigênio altamente biocidas. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no estudo sob relatório, onde o H_2O_2 foi capaz de inibir bactérias em biofilme a concentrações médias cerca de 20 vezes maiores do que as CIMs para as mesmas cepas. Apesar de a taxa de aumento entre as concentrações de CIM e CIMB para o peróxido de hidrogênio ser a maior, quando comparada às taxas dos demais antimicrobianos testados, mesmo os valores no limite superior dentre os encontrados para CIMB (4096 ppm) ainda estão abaixo das concentrações normalmente usadas em formulações comerciais de uso médico, que variam entre 30000 e 60000 ppm.

Biofilmes formados por baterias de importância médica podem resistir às repostas do sistema imune do hospedeiro, e bactérias em biofilme são menos sensíveis a antibióticos e biocidas do que suas versões planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005; POST et al., 2007). De fato, existem relatos de infecções associadas a biofilmes que são dezenas ou até centenas de vezes mais resistentes aos efeitos dos antibióticos (CERI; OLSON; TURNER, 2010; OLSON et al., 2002). Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste estudo, onde seis cepas apresentaram CIMB 64 vezes maiores do que os respectivos valores

de CIM. A associação entre o crescimento em biofilme e resistência foi também descrita por Ceri e colaboradores (1999); Dongari-Bagtzoglou (2008); Toté et al. (2009). Estes dados reforçam a idéia de que a determinação de CIM não é o melhor preditor para a terapia de infecções relacionadas a biofilmes.

A tolerância dos biofilmes à ação dos antibióticos é de grande importância clínica, uma vez que o biofilme está implicado em mais de 60% das infecções bacterianas atualmente tratadas por médicos no mundo (CERI; OLSON; TURNER, 2010; FUX; COSTERTON; STOODLEY, 2005). Não obstante, algumas cepas apresentaram valores de CIM e CIMB idênticos perante cinco dos agentes testados (TABELA 6). Spoering & Lewis (2001) defendem a teoria de que, se as bactérias de crescimento rápido são mais suscetíveis a serem inibidas ou mesmo mortas, a tolerância das bactérias em biofilme é dependente, quase que exclusivamente, de células persistentes capazes de resistir à ação dos antibióticos em razão do seu metabolismo imensamente reduzido. Asserem, também que bactérias de crescimento planctônico em fase estacionária de crescimento não são menos resistentes do que bactérias em estado sésil, podendo até exibir uma resistência maior. Por outro lado, as células persistentes, após a retirada do antibiótico, poderiam recriar o biofilme e levar ao relapso da infecção após tratamento. Baseando-se nesta idéia, pode-se sugerir duas hipóteses para explicar os achados descritos neste estudo: (1) as cepas citadas se encontravam em fase estacionária de crescimento durante a determinação de CIM, apresentando tolerância aumentada aos antimicrobianos e se igualando ao biofilme; (2) a presença de muitas células persistentes no biofilme formado levaram a um falso resultado de inibição. De fato, pode-se observar que as cinco cepas que exibiram valores inalterados para ambos os ensaios apresentavam CIMs nos limites superiores dos valores do conjunto de isolados. A tentativa de reativação das cepas com a remoção dos antibióticos e recultivo em meio estéril não foi realizada durante este estudo para testar a segunda hipótese.

O trabalho desenvolvido no decorrer deste estudo permitiu a comprovação de várias das hipóteses levantadas inicialmente, mas ao mesmo tempo, trouxe muitos outros questionamentos, incluindo quais seriam os momentos de atuação das substâncias estudadas no ciclo de vida do biofilme e quais os mecanismos de ação das mesmas. Evidenciou-se o fato de que a identificação de microrganismos, apesar de realizada diariamente por inúmeros estabelecimentos no mundo todo, é um trabalho complexo que requer constante atualização de conceitos. Avaliou-se que as 54 cepas clínicas estudadas apresentaram baixas taxas de resistência aos antibióticos testados.

Comprovou-se a formação de biofilme por cepas de *S. intermedius* e *S. simulans* e que o comportamento das duas espécies, perante os antibióticos, não foi estatisticamente diferente, comparando uma a outra. Observou-se que os seis agentes antimicrobianos testados nos ensaios de microdiluição apresentam atividade inibitória ante as cepas clínicas de otite canina, tanto em crescimento planctônico como em biofilme, porém não se pode estabelecer se esta ação é duradoura/persistente, ou mesmo se esta ação se repetiria em outras etapas do ciclo de vida do biofilme.

O estudo dos biofilmes é um tópico vasto e que ainda será explorado em muitos outros trabalhos. Esta dissertação é uma tentativa de aumentar os conhecimentos da comunidade científica sobre biofilme e melhorar as chances na luta eterna de macróbios contra micróbios.

CONCLUSÕES

Os seis agentes antimicrobianos testados – ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, timol, carvacrol e peróxido de hidrogênio – têm ação inibitória contra cepas estafilocócicas produtoras de biofilme isoladas de otite canina em crescimento planctônico e em biofilme.

As bactérias em biofilme são mais resistentes aos antibióticos clássicos - ciprofloxacina, cloranfenicol e gentamicina – mesmo quando sensíveis a estas drogas na sua forma planctônica. Neste estudo, as concentrações médias necessárias para inibição dessas bactérias em biofilme foram até 16 vezes maiores do que as usadas com sucesso para inibição das mesmas cepas em estado livre. Porém, estas concentrações capazes de inibir biofilme são dezenas de vezes inferiores às concentrações encontradas em formulações tópicas comerciais.

Os componentes majoritários do óleo essencial de orégano – timol e carvacrol – apresentam atividade antibiofilme em concentrações de 12 a 17 vezes maiores do que as CIMs observadas para os isolados bacterianos de otite canina.

O H₂O₂ foi capaz de inibir biofilme de espécies estafilocócicas em concentrações inferiores àquelas encontradas em apresentações comerciais, mesmo que a média dos valores de CIMB tenha sido mais de 22 vezes maior do que a média de dos valores de CIM perante os mesmos microrganismos.

As seis drogas antibióticas avaliadas neste estudo apresentam potencial terapêutico no tratamento de infecções estafilocócicas associadas com biofilme.

ANEXOS

Anexo I

Agentes Antimicrobianos, Meios de Cultura e Reagentes

AGENTES ANTIMICROBIANOS

1 Antibióticos Comerciais

Ciprofloxacina (Sigma), Cloranfenicol (Sigma), Gentamicina (Sigma).

2 Componentes de Óleos Essenciais

A obtenção dos componentes do óleo essencial do orégano de timol e carvacrol foi realizada no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Professor Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

3 Agente Oxidante

A preparação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi realizada no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, sob a orientação do Professor Said Gonçalves da Cruz Fonseca.

MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1 Meios de Cultura em Forma Desidratada

Brain Heart Infusion agar (BHI ágar; Oxoid), Brain Heart Infusion broth (BHI caldo; Oxoid), Mueller Hinton broth (MH caldo; Oxoid).

2 Meios de Cultura Formulados

Ágar Sangue – Meio enriquecido preparado adicionando 5% de sangue de carneiro desfibrinado à solução de BHI ágar. Após a preparação de BHI ágar ser autoclavada separadamente e resfriada a temperatura aproximada de 50°C, o sangue foi adicionado a solução. Em seguida foi distribuído, assepticamente, em placas de Petri (FIGURA 25);

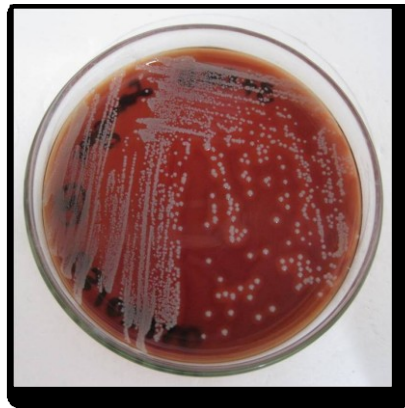


FIGURA 25. Meio ágar sangue, preparado a partir da adição de sangue de carneiro à solução de BHI ágar, colonizado por cepa de *S. intermedius*. Fonte: Moreira, 2010.

Ágar Vermelho Congo (AVC) – Meio diferencial preparado adicionando-se 0,8g de vermelho Congo (Sigma) e 36g de sacarose (Sigma) a 1L da solução de BHI ágar. Para tanto foi preparada uma tintura do vermelho Congo, como uma solução aquosa concentrada, utilizando 25% da água destilada total usada para diluição do ágar e autoclavada

separadamente (FIGURA 26). Em outro recipiente os 75% restantes da água destilada foram utilizados para diluir o BHI ágar e a sacarose (FIGURA 26). Após a esterilização a tintura foi adicionada a solução de BHI ágar e sacarose quando esta havia esfriado a temperatura aproximada de 55°C. Em seguida foi distribuído, assepticamente, em placas de Petri (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989).



FIGURA 26. Componentes do meio ágar vermelho Congo: BHI ágar e sacarose diluídos em 75% da água destilada (esquerda) e solução aquosa concentrada do vermelho congo diluído em 25% da água destilada total (direita). Fonte: Moreira, 2010.

3 Reagentes

Resazurina (Sigma) – O indicador colorimétrico foi preparado em solução aquosa na concentração de 0,05%, em água destilada e esterilizado por filtração. A solução foi acondicionada a 4°C (PALOMINO et al., 2002). A resazurina de cor azul na sua forma não oxidada muda de cor quando o meio ao redor é reduzido, como resultado de depleção bacteriana de oxigênio e produção de ácidos. A redução ocorre em dois estágios: no primeiro estágio a resazurina azul, na presença de células viáveis, é irreversivelmente reduzida à resofurina de coloração rosada. Em um segundo estágio a resofurina é reversivelmente reduzida a dihidroresofurina - incolor (MANN; MARKHAM, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APARNA, MS.; YADAV, S. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.
- ARCIOLA, CR. et al. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in periprostheses infections. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 10, n. 2, p. 130–137, 2001.
- ARCIOLA, CR. et al. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, v. 23, p. 4233-4239, 2002.
- ASAD, NR. et al. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 291-303, 2004.
- ASHBY, MT. Inorganic Chemistry of Defensive Peroxidases in the Human Oral Cavity. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 10, p.900-914, 2008.
- AUTHIER, S. et al. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 774–778, 2006.
- BAIRD-PARKER, AC. The Staphylococci: an introduction. **Journal for Applied Bacteriology**, Symposium Supplement, New York, p. 1S-8S, 1990.
- BANNOEHR, J. et al. Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8685–8692, 2007.
- BANNOEHR, J. et al. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 469–471, 2009.
- BARNHAM, M. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus simulans* masquerading as MRSA in a nursing home. **Journal of Hospital Infection**, v. 34, p. 331-333, 1996.
- BEZERRA, TFP. et al. Biofilme em rinosinusite crônica com polipose nasossinusal: estudo piloto. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.75, n.6, p. 788-793, 2009.
- BOWDEN, GH.; LI, YH. Nutritional influences on biofilm development. **Advanced Dental Research**, v. 11, p. 81-99, 1997.
- BURT, SA. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- BURT, SA.; REINDERS, RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters of Applied Microbiology**, v. 36, n.3, p. 162-167, 2003.

CARDOSO, RL. et al. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 432-434, 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.

CERI, H. et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n. 6, p. 1771–1776, 1999.

CHORIANOPOULOS, NG. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

CHRISTENSEN, GD. et al. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, p. 318-326, 1982.

CLARKE, CR. Antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 5, p.987-1001, 2006.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, M07-A8, 8. ed. CLSI, Wayne, USA, 2008.

COBAN, AY. et al. Two New Colorimetric Methods for Early Detection of Vancomycin and Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 580-582, 2006.

COLE, LK. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. **The Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n.4, p.534-538, 1998.

COLOMBINI, S.; MERCHANT, SR.; HOSGOOD, G. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns form dogs with otitis media. **Veterinary Dermatology**, v.11, p. 235-239, 2000.

COSTERTON, JW.; STEWART, PS.; GREENBERG, EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v.284, n. 21, p. 1318–1322, 1999.

DEVRIESE, LA. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulasepositive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569–1573, 2005.

DEVRIESE, LA. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 206–207, 2009.

DHANAWADE, NB. et al. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 81-89, 2010.

DOBINSKI, S. et al. Glucose-related dissociation between icaA/BC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesion synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2879- 2886, 2003.

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

DONLAN, RM.; COSTERTON, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n. 2, p. 167– 193, 2002.

DORMAN, HJD.; DEANS, SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied Microbiology**, v. 88, n. 22, p. 308-316. 2000.

DRUSANO, GL. et al. Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, n. 6, p. 753-60, 2007.

DUNNE, WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155–166, 2002.

EARNSHAW, A.; GREENWOOD, N. **Chemistry of the Elements**. 2 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2002. 1600p.

EL-AZIZI, M. et al. In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against and disrupted biofilms of staphylococci. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, p. 1–9, 2005.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

FALAGAS, ME.; GRAMMATIKOS, AP.; MICHALOPOULOS, A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 6, n. 5, p. 593–600, 2008.

FARIAS, M. R. Terapêutica otológica. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3^a ed. São Paulo: Roca, 2008, p. 530-531.

FEE, JA. Is superoxide important in oxygen poisoning? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 7; p. 84-86, 1982.

FRANK, KL. et al. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 888–95, 2007.

FREEMAN, DJ.; FALKINER, FR.; KEANE, CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872-874, 1989.

FUTAGAWA-SAITO, K. et al. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC Veterinary Research**, 2:4. 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/2/4>> Acesso em: 21 de junho de 2010. (doi: 10.1186/1746-6148-2-4)

FUX, CA.; COSTERTON, JW.; STOODLEY, P. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GAD, GFM. et al. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 5, p. 342-351, 2009.

GANDER, S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 37, p. 1047-1050, 2004.

GANIÈRE, JP.; MÉDAILLE, C.; MANGION, C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 52, p. 25– 31, 2005.

GOERKE, C.; KOLLER, J.; WOLZ, C. Ciprofloxacin and Trimethoprim Cause Phage Induction and Virulence Modulation in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.1, p. 171–177, 2005.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, ME.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v. 98, n. 23–27, 2004.

GUARDABASSI, L.; SCHARZ, S.; LLOYD, DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 321-332, 2004.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. v. 1. New York: D. Van Nostrand, 1948. In: BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

HAHN, FE.; WISSEMAN JR., CL.; HOPP, HE. Mode of Action of Chloramphenicol III. Action of Chloramphenicol on Bacterial Energy Metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 69, n. 2, p. 215-223, 1955.

HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.26, n. 4, p. 401-408, 1976.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 7–10, 2005.

HALL-STOODLEY, L. et al. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 2, n. 95–108, 2004.

HALL-STOODLEY, L. et al. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. **JAMA**, v. 296, n. 2, p. 202–211, 2006.

HAMMER, KA.; CARSON, CF.; RILEY, TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HANCOCK, V.; DAHL, M.; KLEMM, P. Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 out-competes intestinal pathogens during biofilm formation. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p. 392–399, 2010.

HANSELMAN, BA.; KRUTH, S.; WEESE, JS. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Veterinary Microbiology**. v. 126, p. 277-281, 2008.

HARDMAN, AM. et al. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and nonpathogenic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 74, p. 199, 1998.

HOJO, K. et al. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 11, p.982-990, 2009.

HOLT, JG. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

IMLAY, JA. Cellular Defenses Against Superoxide and Hydrogen Peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77; p. 755-776, 2008.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Aromatic natural raw materials – Vocabulary**. ISO 9235. ISO, Geneva, 1997.

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

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

JANDA, JM.; ABBOTT, SL. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 1887-1891, 2002.

JONES, CW. **Applications of Hydrogen Peroxide and Derivatives**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. 268 p. (RSC Clean Technology Monographs).

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 3, p. 288-291, 2002.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73 p. 310–347, 2009.

KEMPKER, R. et al. Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.338, p. 425–427, 2009.

KLOOS, WE.; BANNERMAN, TL. Staphylococcus and Micrococcus. In: MURRAY, PR. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 8. ed. Washington: ASM PRESS, 2003. p. 264-282.

KNOWLES, JR. et al. Antimicrobial Action of Carvacrol at Different Stages of Dual-Species Biofilm Development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 797–803, 2005.

KOSTENKO, V. et al. Staphylococcus aureus biofilm formation and tolerance to antibiotics in response to oscillatory shear stresses of physiological levels. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, p. 421-431, 2010.

KRETH, J.; ZHANG, Y.; HERZBERG MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 4632-4640, 2008.

KRETH, J. et al. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7193-7203, 2005.

KUZMA, L. et al. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 31-35, 2007.

LAMBERT, RJW. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LEITE, CAL. **Entendendo a otite externa de cães & gatos: um guia prático para o profissional veterinário**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2000, 39p.

LEITE, CAL. **Caracterização clínica e laboratorial de caninos hígidos e otopatas, com ênfase nas microbiotas aeróbica e anaeróbica dos condutos auditivos**. 2003, 237p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade Estadual Paulista.

LEMON, KP. et al. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322 p. 1–16, 2008.

LINDSAY, J. **Staphylococcus: Molecular Genetics**. Norwich: Caister Academic Press, 2008, 278p.

LIGOZZI, M. et al. Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1681–1686, 2002.

LILENBAUM, W. et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters of Applied Microbiology**, v.31, p.42-45, 2000.

LOGAS, DB. Diseases of the ear canal. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 24, n. 5, p.905-919, 1994.

MALES, BM.; BARTHOLOMEW, WR.; AMSTERDAM, D. *Staphylococcus simulans* septicemia in a patient with chronic osteomyelitis and pyarthrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, p.255-257, 1985.

MANN, CM.; MARKHAM, JL. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538-544, 1998.

MANNING, SC. Basics of biofilm in clinical otolaryngology. **ENT-Ear, Nose & Throat Journal**, v. 82 (Supl 2), p. 18-20, ago, 2003.

MARIANA, NS., et al. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 6, p. 330-338, 2009.

MATTOS, IL. et al. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MORRIS, DO. et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–04). **Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 332–337, 2006.

NASCIMENTO, PFC. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007.

NOBRE, MO. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p.243-247, 2001.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicilin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519-523, 2007.

NOSTRO, A. et al. In vitro activity of carvacrol against staphylococcal preformed biofilm by liquid and vapour contact. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 791-797, 2009.

NURYASTUTI, T. et al. Effect of Cinnamon Oil on *icaA* Expression and Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 21, p. 6850–6855, 2009.

OKAJIMA, Y. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* on intraocular lens material. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 47, n. 7, p.2971-2975, 2006.

OLIVEIRA, LC. et al. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 1009–1017, 2006.

OLIVEIRA, LC. et al. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 49, p. 785–788, 2008.

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

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

PALOMINO, JC. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANGSOMBOON, K. et al. Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1928-1940, 2009.

PEDERSEN, K. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 775–781, 2007.

PEETERS, E. et al. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

PETTIT, RK. et al. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2612-2617, 2005.

POST, JC. et al. Biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. **Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery**, v.15, n. 5, p. 347–351, 2007.

POZZATTI, P. et al. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950-956, 2008.

POZZATTI, P. et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 12-15, 2010.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, n. 3–8, 2009.

QU, Y. et al. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 9:16. 2010. Disponível em: <<http://www.ann-clinmicrob.com/content/9/1/16>> Acesso em: 07 de agosto de 2010. (doi: 10.1186/1476-0711-9-16)

RICHARDS, JJ.; MELANDER, C. Controlling bacterial biofilms. **ChemBioChem**, v. 10, p. 2287–2294, 2009.

ROVETA, S. et al. Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 415-421, 2007.

SANDBERG, ME., et al. Pros and cons of using resazurina staining for quantification of viable *Staphylococcus aureus* biofilm in a screening assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 78, p. 104-106, 2009.

SARKER, SD.; NAHAR, L.; KUMRASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321-324, 2007.

SASAKI, T. et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 2770-2778, 2007.

SCHLEIFER, KH. Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 533-542, 2009.

SHIMIZU, A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* isolated from healthy and diseased dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.63, n.3, p.357-360, 2001.

SIMÕES, CMO. et al. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 6ª ed. São Paulo: PharmaBooks, 2007. 1102 p.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters of Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SPOERING, AL.; LEWIS, K. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 23, p. 6746-6751, 2001.

STALEY, JT. The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**. Series B, Biological sciences, v. 361, n. 1475, p. 1899-909, 2006.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 49, p. 175-179, 2000.

STOODLEY, P. et al. Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in arthroplastic joint infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 437, p.31–40, 2005.

TEH, KH.; FLINT, S.; FRENCH, N. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 118-124, 2010.

TOTÉ, K. et al. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 249-254, 2008.

TOTÉ, K. et al. Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 525-531, 2009.

TRABULSI, LR.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5a ed., São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TRAN, PL. et al. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p.3586-3592, 2009.

VALLIANOU, N. et al. Vertebral osteomyelitis and native valve endocarditis due to *Staphylococcus simulans*: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, 2:183. 2008. Disponível em: <<http://www.jmedicalcasereports.com/content/2/1/183>> Acesso em: 03 de março de 2010. (doi:10.1186/1752-1947-2-183)

VAN HOOGLMOED, CG. et al. Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 43-48, 2008.

VANNI, M. et al., Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 192-195, 2009.

VARGES, R., et al. Antimicrobial susceptibility os *Staphylococci* isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 4, 216-220, 2009.

VERGARA-IRIGARAY, M. et al. Relevant Role of Fibronectin-Binding Proteins in *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Foreign-Body Infections. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3978-3991, 2009.

WANG, D.; WANG, Y.; LIU, Y. Activity of ciprofloxacin and azitromycin on biofilms produced *in vitro* by *Haemophilus influenza*. **Chinese Medical Journal**, v. 122, n. 11, p. 1305-1310, 2009.

WARD, PA. Mechanisms of endothelial cell killing by hydrogen peroxide or products of activated neutrophils. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3C, p. 89-94, 1991.

WERCKENTHIN, C. et al. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Research**. v. 32, p. 341-62, 2001.