

RELAÇÃO ENTRE PRODUÇÃO DE BIOFILME E *SLIME LAYER* EM CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS*

MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA¹; RODRIGO CASQUERO CUNHA²; SÍLVIA REGINA LEAL LADEIRA³; MARIA ELISABETH AIRES BERNE⁴; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – micha.hornes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rodrigocunha_vet@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – s.ladeira@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

O gênero de bactérias Gram-positivas *Staphylococcus* normalmente coloniza a pele e mucosas de seres humanos e animais, podendo ser facilmente isolado do ambiente, inclusive de ar (PLANCHON et al., 2006). O início da infecção estafilocócica depende de fixação em superfícies, tanto de materiais como de tecidos vivos, fato que ocorre por uma combinação de variáveis, como condições ambientais desfavoráveis; e propriedades inerentes à cepa, como capacidade de adesão e formação de biofilme (CUCARELLA et al., 2002).

Biofilmes são aglomerados de microrganismos aderidos a uma superfície sólida, envoltos por uma matriz extracelular polimérica por eles secretada. Este fator, juntamente com o *Slime Layer* (SL) – pseudo-cápsula constituída majoritariamente de polissacarídeos e adesinas –, contribui de forma significativa para o aumento da resistência bacteriana a antibióticos e defesas inatas dos hospedeiros (HEILMANN et al., 1996; SHIRTLIFF et al., 2002).

Infecções associadas a biofilmes, de acordo com as estimativas recentes, tem aumentado o custo dos sistemas de saúde pública. Cerca de 65% das infecções clínicas tratadas em países desenvolvidos são marcadas pelo envolvimento de microrganismos formadores de biofilmes (MENGI et al., 2013). Entre as doenças associadas a biofilme em seres humanos, os patógenos predominantes são: *Pseudomonas aeruginosa* em pulmões de pacientes com fibrose cística; *Staphylococcus* spp. colonizando dispositivos médicos; e *Streptococcus* spp. na formação de placa oral bacteriana.

Em Medicina Veterinária, a questão dos biofilmes é igualmente preocupante. A mastite é um dos prejuízos mais comuns atribuídos a animais leiteiros em todo o mundo, e entre os agentes etiológicos responsáveis, *Staphylococcus aureus* é um dos principais causadores da doença, podendo levar à mastite crônica (RAZA et al., 2013). Na indústria alimentícia, os biofilmes bacterianos também constituem um problema devido a sua potencialidade em resistir a tratamentos antimicrobianos, contaminando e degradando diversos alimentos, principalmente derivados de leite (FLACH et al., 2005).

O objetivo do presente estudo foi a constatação da produção de *slime layer* e biofilmes em amostras de *Staphylococcus* isoladas no Laboratório Regional de Diagnósticos - UFPEL, traçando uma relação entre estes fatores, além de possíveis perspectivas futuras de pesquisa.

2. METODOLOGIA

Amostras: As análises foram feitas em um grupo de 21 amostras de *Staphylococcus spp.*, sendo estas isoladas de: mastite bovina (11), otite canina (3), lesões/nódulos/crostras em pele e narinas caninas (4), dermatite canina (1), osteomielite canina (1) e lavado traqueal equino (1).

Isolamento e cultivo: O isolamento das bactérias se deu em ágar sangue ovino 5%, observando a atividade hemolítica de cada cepa. A partir de uma colônia de cada amostra em TSA foram feitos inóculos em 50 mL de meio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*), os quais permaneceram *overnight* no *shaker* de cultivo a 37 °C, 150 rpm.

Provas bioquímicas: Os estafilococos foram classificados quanto à hemólise de acordo com sua aparência na placa de ágar sangue ovino (a 5%) após incubação a 37 °C por 24 h, podendo apresentar: hemólise total (alfa), parcial (beta), dupla ou nenhuma. Para o teste da coagulase gotejou-se 1 gotas de água destilada em uma lâmina, seguidas de uma suspensão de colônias e uma gota de plasma de coelho. Ao misturar e aguardar 1-2 min observou-se a presença de aglutinação (colônias coagulase-positivas) ou não (colônias coagulase-negativas). Sendo identificada como coagulase-positiva, fez-se, para cada cepa, uma série de outros testes bioquímicos tabelados (GOMES et al., 2013), geralmente se conseguindo chegar a uma identificação final e completa (gênero e espécie). Por outro lado, existem muitas espécies coagulase-negativas, sendo nesses casos difícil uma definição assertiva.

Ensaio de biofilme: Os cultivos em TSB foram padronizados a uma DO (densidade óptica) igual a 7. Os mesmos foram diluídos 1:40 em TSB + 0,25% glicose e inoculados (200 µL / poço) em microplacas de 96 poços de fundo chato durante 24 h, 48 h e 72 h a 37 °C para a formação de biofilme. Após a incubação, cada placa foi lavada três vezes com PBS (tampão salina fosfatado) e deixada secar. Adicionou-se cristal violeta (200 µL / poço), deixando por 15 min em temperatura ambiente, seguido de três lavagens com água destilada, e novamente secagem, para depois realizar-se a leitura em espectrofotômetro a 492 nm. As amostras que apresentaram absorvância maior ou igual a 1 na espectrofotometria foram consideradas formadoras de biofilme.

Ensaio de *slime layer*: Para a detecção de SL fez-se o teste de semeadura em placas de ágar vermelho do congo (CRA; FREEMAN et al., 1989), (3,7% de BHI - *Brain Heart Infusion*; 1,5% de ágar base, 5% de sacarose e 0,08% de vermelho do congo). Colônias pretas/escuras são consideradas produtoras (Figura 1).



Figura 1. Amostras em CRA. N = colônia não produtora de SL; P = produtora.

Extração de DNA: Foi realizada a extração de DNA total (genômico) de cada amostra, através do método fenol clorofórmio (SANBROOK et al, 2001), para posterior análise genotípica da presença de genes relacionados com a formação de SL e biofilme.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos na identificação das amostras e nos testes de coagulase, SL e biofilme. Todas as amostras foram identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, dentre as quais: *S. aureus* (3), *S. pseudointermedius* (3), *S. intermedius* (3), e *S. sheleiferi* (1).

Sete (7) amostras continham colônias pretas em CRA, apontando a produção de SL. Destas sete, apenas duas cepas foram também produtoras de biofilme, como constatado no teste das microplacas; e uma cepa mostrou ser formadora apenas de biofilme. Uma cepa obteve DO de 0,889 em 72 h, indicando o encaminhamento para a formação de biofilme ou uma fraca produção.

As extrações de DNAs resultaram em padrões de bandas esperados no gel de agarose 0,8% após a eletroforese (bandas a mostra, sem sinais de contaminação ou degradação).

Tabela 1. Resultados dos testes realizados, sendo: - = amostra coagulase negativa; + = coagulase positiva; N = amostra não produtora; P = produtora

Amostra	Gênero/Espécie	Origem	Coagulase	SL	Biofilme
01	<i>S. aureus</i>	Mastite bovina	+	N	N
02	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	N	N
03	<i>S. pseudointermedius</i>	Otite canina	+	N	N
04	<i>S. intermedius</i>	Lesão de pele canina	+	P	N
05	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	N	N
06	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	N	P
07	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	P	N
08	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	N	N
09	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	P	N
10	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	P	P
11	<i>Staphylococcus</i> sp.	Mastite bovina	-	P	P
12	<i>Staphylococcus</i> sp.	Lesão de narina canina	+	P	N
13	<i>S. intermedius</i>	Crostas de pele canina	+	N	N
14	<i>S. sheleiferi</i>	Otite canina	+	P	N
15	<i>Staphylococcus</i> sp.	Dermatite canina	+	N	N
16	<i>S. aureus</i>	Lavado traqueal equino	+	N	N
17	<i>S. intermedius</i>	Osteomielite canina	+	N	N
18	<i>S. pseudointermedius</i>	Nódulos de pele canina	+	N	N
19	<i>Staphylococcus</i> sp.	Otite canina	-	N	N
20	<i>S. aureus</i>	Mastite bovina	+	N	N
21	<i>S. pseudointermedius</i>	Mastite bovina	+	N	N

4. CONCLUSÕES

Frente aos resultados, infere-se que a produção de *slime layer* foi mais generalizada entre as amostras que a de biofilme, e que a produção de SL não necessariamente é concomitante com a de biofilme. A identificação de bactérias que sejam positivas para estes dois fatores de virulência é importante para o estabelecimento de sua patogenicidade e principalmente na adoção de melhores medidas de controle e detecção destes microrganismos.

Para uma completa caracterização, é possível avaliar também o genótipo dos isolados de *Staphylococcus* spp. a fim de associar genes relacionados a produção de SL e biofilme com os fenótipos já obtidos neste estudo, através do uso de técnicas de biologia molecular, a exemplo da PCR, em etapa futura desta pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RAZA, A.; MUHAMMAD, G.; SHARIF, S.; ATTA, A. Biofilm Producing Staphylococcus aureus and Bovine Mastitis: A Review. **Molecular Microbiology Research (Online)**, v.3, n.1, p.1-8, 2013.
- MENGI, S.; VOHRA, P.; SAWHNEY, N.; SINGH, V. A. Biofilms: a diagnostic challenge in persistent infections. **International Journal of Research In Medical and Health Sciences**, v.2, n.3, 2013.
- SEO, Y. S.; LEE, D. Y.; RAYAMAHJI, N.; KANG, M. L.; et al. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of Staphylococcus spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, v.85, p.433-438, 2008.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.291-296, 2005.
- BEKIR, K.; NOUMI, E.; ABID, N. B. S.; BAKHROUF, A. Adhesive properties to materials used in unit care by Staphylococcus aureus strains incubated in seawater microcosms. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.2447–2451, 2014.
- NAYAK, N.; SATPATHY, G.; NAG, H. L.; VENKATESH, P.; RAMAKRISHNAN, S.; et al. Slime production is essential for the adherence of Staphylococcus epidermidis in implant-related infections. **Journal of Hospital Infection**, v.77, p.153-156, 2011.
- LESHEM, R.; MAHARSHAK, I.; BEN, E.; et al. The Effect of Nondialyzable Material (NDM) Cranberry Extract on Formation of Contact Lens Biofilm by Staphylococcus epidermidis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.52, n.7, 2011.
- ELKHATIB, W. F.; KHAIRALLA, A. S.; ASHOUR, H. M. Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of Staphylococcus aureus biofilms. **Future Microbiology**, v.9, n.6, p.725–735, 2014.
- ARSLAN, S.; ZKARDES, F. Slime production and antibiotic susceptibility in staphylococci isolated from clinical samples. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 102, n.1, p.29-33, 2007.
- VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; YAO, Y., et al. Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of Staphylococcus epidermidis In Vivo. **The Journal of Infectious Diseases**, v.190, p.1498–505, 2004.
- CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of Staphylococcus aureus in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.254-261, 2009.