

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Staphylococcus COAGULASE* POSITIVA ISOLADAS DE ANIMAIS COM MASTITE

YURI MARQUES LEIVAS¹; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA²; NATACHA DEBONI CERESER³; HELENICE DE LIMA GONZALEZ⁴, CLÁUDIO DIAS TIMM⁵; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA CONCEIÇÃO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – yurimarquesleivas@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas - maria.fernanda.fs97@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – natachacereser@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Biofilme corresponde a uma comunidade de células sésseis aderidas a um substrato, imbebidas em uma matriz de polímeros extracelulares, no qual exibem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética. Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003). A adesão microbiana ocorre devido à deposição de micro-organismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, estabelece-se o biofilme (MARQUES, 2003).

Micro-organismos saprófitas e patogênicos são capazes de participar com maior ou menor intensidade no processo de adesão e na formação de biofilme. *Staphylococcus* spp. são reconhecidamente a causa mais frequente de infecções associadas a biofilmes, especialmente devido ao fato de serem agentes comensais, presentes na pele e superfícies de mucosas (OTTO, 2008). Embora possa ser ocasionada por inúmeros patógenos, bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são reconhecidas como os agentes etiológicos mais isolados dos casos de mastite (De VLIEGHER et al. 2012). A preocupação com o aparecimento de cepas formadoras de biofilme é que estas quando em biofilme são mais difíceis de serem eliminadas, visto que a susceptibilidade altera-se de acordo com a concentração e o antimicrobiano testado, ressaltando a importância da não utilização indiscriminada dos antimicrobianos (CHAGAS et al., 2015). A capacidade dos *S. aureus* em formarem biofilmes “in vivo” é considerada o maior fator de virulência na patogenia da mastite.

A mastite bovina é um processo inflamatório da glândula mamária e sua incidência é preponderante em rebanhos leiteiros de todo o mundo, causando prejuízo econômico e sanitário para produtores e laticínios. Além disso, a mastite pode representar um risco potencial à saúde de homens e bezerros, pois o leite pode servir como um veículo de micro-organismos patogênicos e enterotoxinas (ZAFALON et al., 2009). Baseado no exposto, este trabalho teve por objetivo investigar a capacidade de cepas de *Staphylococcus coagulase* positiva de formar biofilme.

2. METODOLOGIA

2.1. Isolamento Bacteriano

Foram analisadas 21 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de animais com mastite subclínica. Após a realização do CMT (*California Mastitis Test*), as amostras de leite foram coletadas dos tetos que se mostraram reagentes e enviadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), da Faculdade de Veterinária, da UFPel para análise. Após o isolamento, as cepas de *Staphylococcus* foram estocadas em glicerol a -18°C.

2.2. Preparo do Inóculo

Inicialmente, as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva foram semeadas em caldo TSB e incubadas a 37°C/24 horas. A densidade ótica de cada cultivo foi padronizada ($A_{600\text{nm}}$).

2.3. Ensaio de Formação de Biofilme

O procedimento adotado para realizar este ensaio segue o recomendado por STEENACKERS et al. (2011), com algumas modificações. Inicialmente, foram colocados 200 μL de caldo Trypticase de Soja (TSB, Acumedia) em cada poço da placa de 96 cavidades (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) adicionados de 8 μL de culturas *overnight* em TSB de cada cepa padronizada em espectrofotômetro a 600 nm para valor 0,9-1,0 de densidade ótica (DO). Poços com 200 μL de caldo TSB, sem cultura bacteriana, foram utilizados como controle. Então, a tampa foi colocada sobre a placa e incubada durante 48 h a 37°C sem agitação. Após, as tampas das placas (Nunc-TSP, Thermo Scientific, Denmark) foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline – PBS) e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, estas foram lavadas com água destilada estéril, secas a temperatura ambiente por 30 minutos e colocadas em ácido acético a 30%. Esta última etapa é realizada para que o biofilme formado na tampa se solte e fique no meio. Após a remoção da tampa, a leitura por densidade ótica utilizando um espectrofotômetro foi realizada, utilizando comprimento de onda de 600nm e de 570nm. O caldo TSB estéril foi utilizado como controle negativo e o controle positivo foi uma cepa de *Staphylococcus* coagulase positiva fortemente formadora de biofilme. Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras. A partir, as cepas foram classificadas segundo a aderência na tampa da placa e foram divididas em quatro categorias. Como o experimento foi realizado em triplicata, os resultados foram expressos pela média dos valores obtidos e cada cepa foi agrupada nas quatro categorias selecionada segundo o estipulado por STEPANOVIC et al. (2000). O ponto de corte (DOc) foi definido como três desvios padrões acima da média das densidades óticas (Dos) dos controles e a classificação foi determinada conforme segue.

$\text{DO} \leq \text{DOc}$ = não formadora

$\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$ = fraca formadora

$2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$ = moderada formadora

$4 \times \text{DOc} < \text{DO}$ = forte formadora

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 21 cepas testadas, todas (100%) formaram biofilme, sendo 14 (66,7%) fortemente formadoras e sete (33,3%) fracamente formadoras, conforme a classificação utilizada neste experimento. MELO et al. (2012), analisaram a formação de biofilme em 94 cepas de *Staphylococcus aureus* e verificaram que

93 (98,9%) se aderiram fortemente a placa de poliestireno utilizada. Resultados inferiores foram obtidos neste experimento.

Em um trabalho realizado por GUIMARÃES et al. (2012), verificaram que oito cepas (26,7%) de *Staphylococcus* foram classificadas como fortemente aderentes a placa, ou seja, fortemente formadoras de biofilme. No entanto, 13 das cepas (43,3%) analisadas não formaram biofilme. OLIVEIRA et al. (2006), estudaram a produção de biofilmes por cepas de *Staphylococcus aureus* e *epidermidis* isolados de casos de mastite e encontraram pelo teste de aderência em placas 18,7% das cepas de *S. aureus* produtoras de biofilme.

A diferença encontrada pode estar associada à subjetividade dos ensaios fenotípicos, tendo em vista que a produção *in vitro* de biofilme pode ser influenciada por diferentes condições de crescimento e mecanismos de aderência (OLIVEIRA et al., 2006). STEPANOVIC et al. (2000) notaram que o teste de aderência em placas é um dos métodos usados com maior freqüência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos pelos *Staphylococcus*, além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos micro-organismos. Neste experimento, o biofilme é formado na tampa da placa e não no fundo da mesma, como pode ser observado na Figura 1.

A capacidade de produzir biofilme ajuda a bactéria a sobreviver em ambientes hostis dentro do hospedeiro, e esse é um fator responsável por infecções crônicas e ou persistentes (COSTERTON et al., 1999). Como já mencionado anteriormente, os isolados utilizados neste experimento foram de animais positivos para mastite subclínica e a partir dos resultados pode-se afirmar que a capacidade das cepas testadas serem formadoras de biofilme é preocupante, visto que o biofilme aumenta a resistência do micro-organismo aos antimicrobianos testados, já que essa resistência dificulta o tratamento das mastites e pode aumentar os casos de infecções subclínicas (GUIMARÃES et al., 2012).

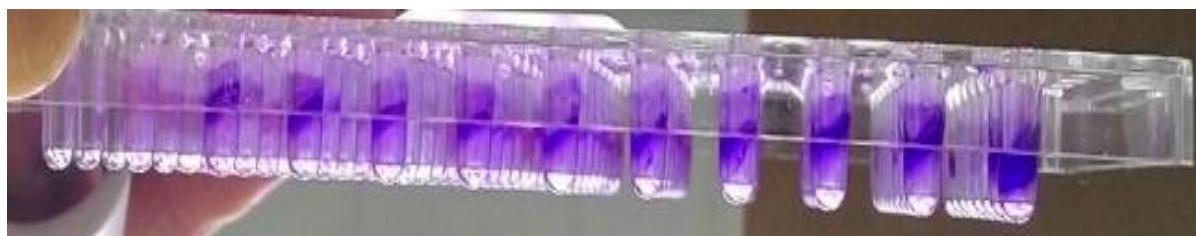


Figura 1: Biofilme de cepas de *Staphylococcus coagulase* positiva formado na tampa da placa utilizada.

4. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que todas as cepas de *Staphylococcus* analisadas neste experimento foram capazes de formar biofilme, sendo a maioria fortemente formadoras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAGAS, L.G.S.; MELO, P.C.; LIMA, A.M.C.; RAMOS, G.B.; RÖDER, D.D.B; NADER-FILHO, A. Susceptibilidade e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em condições de biofilme. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 52, n. 3, p. 228-233, 2015.

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

De VLIEGHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S.; McDougall, S.; BARKEMA, H.W. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal Dairy Science**, v.95, n.3, p.1025-1040, 2012.

GILBERT, P.; MC BAIN, A. J.; RICKARD, A H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.51, n.4, 245-248, 2003.

GUIMARÃES, G.; FRANCA, C.A.; KRUG, F.S.; PEIXOTO, R.M.; KREWER, C.C.; LAZZARI, A.M.; COSTA, M.M. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.12, p.1219-1224, 2012.

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

MELO, P.C.; FERREIRA, L.M.; NADER-FILHO, A. ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise Fenotípica e Molecular da Produção de Biofilmes por Estirpes de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Casos de Mastite Subclínica Bovina. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 94-99, Jan./Feb. 2012.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.

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

STEENACKERS, H.P.L.; ERMOLATEV, D.S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; De COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E.V.; DE VOS, D.E.; VANDERLEYDEN, J.; De KEERSMAECKER, S.C.J. Structure-activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bioorganic Medical Chemistry**, v.19, 3462-3473, 2011.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; S'VABIC'-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, 175-179, 2000.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; VESCHI, J. L. A. *Staphylococcus aureus* portadores de genes de toxinas isolados em amostras de diferentes fontes de transmissão durante a ordenha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 2, p. 269-277, 2009.