

RELAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CÁPSULA COM A FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Staphylococcus* COAGULASE-POSITIVOS

CUNHA, R.C.¹; PAUL, K.²; SANTOS JÚNIOR, A.G.¹; ROOS, T. B.²; CONCEIÇÃO, R. C.²; MORAES, C.M.¹; LEITE, F.P.L.²

INTRODUÇÃO

Estafilococos é um dos gêneros de bactérias de maior importância patogênica em animais e humanos. O *Staphylococcus aureus* é um dos microrganismos que se encontram estreitamente ligados à prejuízos a produção e beneficiamento leiteiro (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades da indústria de laticínios, sobretudo no Brasil. Em muitos casos, esse produto é fabricado com práticas inadequadas de higiene e ou com matéria prima de má qualidade, podendo ocorrer contaminação comprometendo o produto final e a saúde do consumidor (SILVA JR., 2001).

Os estafilococos, estão presentes na microbiota dos animais e são responsáveis por diversas patologias em animais (JUNCO; BARRASA, 2002). A estrutura da pele de cães e suas camadas permitem à instalação de estafilococos, sendo o *S. intermedius* a espécie bacteriana mais prevalente nos casos de infecções na pele (PIANTA *et al.*, 2006). Também está diretamente associado a casos de otite canina. Segundo Oliveira *et al.* (2005) otites representam de 8 a 15% de casos atendidos na prática de clínica veterinária no Brasil. O *S. aureus* é predominantemente responsável pela mastite bovina (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Sua patogênese é atribuída a combinação de efeitos de diversos fatores celulares e extracelulares, assim como as propriedades de invasão tais como aderência, formação de biofilme e resistência à fagocitose, sendo a formação de biofilme um dos principais fatores para infecção bacteriana persistente ou crônica (COSTERTON *et al.*, 1999).

A compreensão dos mecanismos que implicam na formação de biofilme tem aumentando (PRATT & KOLTER, 1999). Acredita-se que são fundamentais para a formação de biofilme a capacidade de aderência, responsável pela fixação celular em uma superfície, e a adesão intercelular, responsável pela acumulação de bactérias em multi-camadas que contribuem para o crescimento e proteção celular (HEILMANN *et al.*, 1996).

A produção de cápsula por cepas de Estafilococos vêm sendo bastante referenciadas como sendo fator indicador de importância clínica (ISHAK *et al.*,

¹Laboratório de Bacteriologia do Centro de Biotecnologia – UFPel

²Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia – UFPel

1985, YOUNGER *et al.*, 1987). Alguns estudos têm sugerido que a produção de cápsula facilita a aderência bacteriana através de seus componentes biopolímeros, contribuindo para a formação de biofilme (PETERS & PULVERER, 1984).

O principal objetivo deste trabalho foi correlacionar a produção de cápsula com a formação de biofilme em diferentes cepas de estafilococos coagulase-positivos, isolados de diferentes locais.

METODOLOGIA

Foram utilizadas 35 amostras de *Staphylococcus* spp. provenientes das coleções do Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, Faculdade de Medicina Veterinária e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia, todos da Universidade Federal de Pelotas.

Primeiramente procedeu-se o repique de cada amostra em placas de petri com meio "Tryptic soy Agar" (TSA, Difco). Selecionaram-se então colônias isoladas típicas de *Staphylococcus* spp., que foram submetidas aos testes de coloração de Gram, para confirmar sua pureza, e Peroxido de hidrogenio para detectar a produção de catalase. Também foi realizado o teste da coagulase em tubos, feito com plasma de coelho diluído à 1:10 em salina (NaCl 0,9%). Foram considerados coagulase-positivos os inóculos que apresentaram formação de coágulo, independente do grau. As mesmas foram utilizadas como inóculos para cultivos em meio líquido "Tryptic soy broth" (TSB, Difco) e, a partir desses cultivos, realizaram-se as provas para identificação das cepas e produção de cápsula e biofilme.

Para a detecção da formação de cápsula utilizou-se o método sementeira em Agar Vermelho Congo (CRA), como descrito por Freeman *et al.* (1989), com pequenas modificações. O Vermelho do Congo foi utilizada como indicador de mudança de pH, apresentando coloração enegrecida em intervalos de pH entre 3,0 e 5,2. Preparou-se CRA a partir dos seguintes compostos: Brain Heart Infusion Broth (Oxoid) 37 g/l, sacarose (Difco) 50g/L, agar base (Difco) 15g/L e Vermelho do Congo (Difco) 0,8g/L. O Vermelho do Congo foi autoclavado separadamente em solução aquosa hiperconcentrada e adicionado aos demais constituintes do meio após serem esfriados até aproximadamente 55°C. Após ser preparado, o CRA foi dividido em placas de petri. Estas, foram semeadas com colônias obtidas a partir das amostras repicadas em TSA e, na sequência, foram incubadas aerobicamente por 24h à 37°C em estufa microbiológica e armazenadas por 48h a temperatura ambiente. Entendeu-se, como resultado positivo, a formação de colônias escuras e rugosas e, o resultado negativo, pela sua não formação (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 2007).

A detecção de biofilme foi realizada através dos cultivos em TSB, 24 horas após a inoculação. Os mesmos foram padronizados por espectrofotometria,

deixando-se todos com densidade óptica (Do) igual a 0.7. Logo após, uma porção de cada cultivo foi diluída à 1:40 em meio TSB adicionado de 0,25% de glicose. Cada amostra, já padronizada, foi adicionada em placas de hemaglutinação com 96 cavidades com fundo em “U”, em triplicata, junto com controles, no volume de 200 µL/cavidade. Após preenchidas, as placas foram incubadas à 37°C por 24h em estufa microbiologia. Passado o tempo de incubação, as placas foram lavadas por três vezes com PBS (Tampão fosfato), e deixadas secar à temperatura ambiente. As placas secas, eram adicionadas de Cristal Violeta 200 µL /cavidade, e incubadas por 15 min à temperatura ambiente. Após, cada cavidade era lavada com água destilada por três vezes, e deixadas secar à temperatura ambiente. As placas coradas com cristal violeta foram submetidas a espectrofotometria com filtro de 540nm para aferir as respequitivas absorbâncias (Ab) de cada cavidade. Considerou-se como formadora de biofilme, aquelas amostras que apresentaram Ab = 1. Foram utilizados, em cada placa, como controles positivos, as amostras positivas e, como controle negativo, apenas o meio sem inoculo (CUCARELLA, 2001). Todos os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 35 amostras de *Staphylococcus* testadas, 4 eram *S. aureus* isoladas de queijos, todas essas apresentaram-se positivas tanto para a produção de cápsula quanto para a formação de biofilme. Estes dados sugerem que as amostras provineinte de queijos apresentam fatores de patogenicidade que as favorecem a resistirem os tratamentos durante o fabrico dos mesmos. Este fato é de extrema importancia pois estes microrganismos presentes no alimento são importantes fontes de contaminação humana (GANDRA, 2006).

Duas amostras de *S. aureus* isolados de otite canina, apresentaram-se positivas somente para a produção de cápsula, sem a formação de biofilme. Esta observação é relevante, pois mesmo em amostras patogênicas para cães a formação de biofilme não parece estar envolvida. Os *S. aureos* isolados de pele de cães sadios (7 amostras) não sintetizaram capsula nem biofilme. O mesmo foi observado para os *S. intermedius* e *S. epidermidis* isolados de cães que não apresentaram capsula nem biofilme. Isto corrobora com a observação que para a amostra ser patogênica a mesma deve expressar capsula uma vez que as mesmas fazem parte da microbiota.

Com relação a hemólise não pode se observar relação entre a presença de hemólise e formação de biofilme. As amostras beta hemolíticas estudadas não expressaram capsula nem formaram biofilme, sugerindo uma baixa patogenicidade. Entretanto, as alfa hemolíticas (75%) apresentaram capsula, sugerindo que pelo tipo hemólise pode-se inferir que há grande possibilidade da amostra ser patogênica.

Os *S. hyicus* estudado eram amostras proveniente de suínos, sendo que dessas, todas foram negativas para a produção de cápsula, porém 75% eram positivas para a formação de biofilme, sendo a única espécie estudada a formar biofilme sem ter presente a produção de cápsula. Este dado é interessante pois a formação de biofilme e a não expressão de capsula que não era relevante a *S. aureus* patogênicos de origem canina os são para *S. hyicus* em suínos.

CONCLUSÕES

Com os resultados deste experimento, devido ao número restrito de amostras, pode-se sugerir que a capsula e o biofilme são fatores importantes de patogenicidade. Entretanto, os mesmos são necessários em situações e espécies animais distintas. Estes fatores de patogenicidade são utilizados distintamente por *S. aureus* (capsula) e *S. hyicus* (biofilme).

BIBLIOGRAFIA

- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v.284, p.1318–1322, 1999.
- CUCARELLA, c.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE´S, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**. v.183, p. 2888–2896, 2001
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**. v.34, n.4, p.51-62, 2004.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Pathol.** v.42; p.872-874, 1989.
- GANDRA, E.A. Multiplex PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. 2006. 81f. **Tese (Doutorado em ciências)**-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- HEILMANN, C.; GERKE, C.; PERDREAU-REMYNTO, F.; GO´TZ, F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infect. Immun.** v.64, p.277–282, 1996.
- ISHAK M. A.; GROSCHEL D. H.; MANDELL G. L.; WENZEL R. P., Association of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia. **J Clin Microbiol**. v.22, p.1025-9, 1985.

JUNCO, M. T. T.; BARRASA, J. T. M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive Staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. **Journal Medicine Veterinary**. v.49, p.419-423, 2002.

OLIVEIRA, L.C. *et al.* Suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e zootecnia**. v. 57, n.3, p.31-38, 2005.

PETERS, G.; PULVERER, G. Pathogenesis and management of Staphylococcus epidermidis 'plastic' foreign body infections. **J Antimicrob Chemother**. v.14, p.67-71, 1984.

PIANTA, C. *et al.* Pioderma estafilocócico canino: identificação das espécies e sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.5, n.1, p.60-63, 2006.

PRATT, L. A.; KOLTER, R. Genetic analyses of bacterial biofilm formation. **Curr. Opin. Microbiol**. v.2, p.598–603, 1999.

RIBEIRO, M.E.R. *et al.* Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, n.3, p.287-290, 2003

SILVA JÚNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2001. 477p.

YOUNGER, J. J.; CHRISTENSEN, G. D.; BARTLEY, D. L.; SIMMONS, J. C.; BARRETT, F. F. Coagulase negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification and shunt removal to clinical outcome. **J Infect Dis**. v.156, p.548-53, 1987.