

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Capacidade de produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus epidermidis*
recuperadas de neonatos críticos**

Autor Correspondente:

Rosineide Marques Ribas

Endereço atual: Av. Pará, 1720, 38400-902

Uberlândia, MG, Brasil

Contato: +55 34 3225 8574

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Capacidade de produção de biofilme em cepas de *Staphylococcus epidermidis*
recuperadas de neonatos críticos**

Gabriel Nogueira Melo^a, Paola Amaral de Campos^a, Deivid William da Fonseca
Batistão^b, Paulo Pinto Gontijo-Filho^a, *Rosineide Marques Ribas^a.

^aUniversidade Federal de Uberlândia, Laboratório de Microbiologia Molecular,
Uberlândia, MG

^bUniversidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina, Uberlândia, MG

E-mail: rosi_ribas@yahoo.com.br (R.M. Ribas)*

Uberlândia-MG

Novembro / 2018

FAPEMIG¹

¹ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

SUMÁRIO

A formação de biofilme é uma característica importante em cepas hospitalares de *Staphylococcus epidermidis*. Nosso objetivo foi verificar a capacidade de produção de biofilme entre amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue, narina, intestino e sítio de inserção de neonatos críticos em uso de Cateter Venoso Central. Nove cepas de *S. epidermidis* foram avaliadas por ensaio de adesão inicial, concentração de biofilme e biomassa, por ensaios quantitativos em três repetições e em três experimentos independentes. A amostra de sítio de inserção obteve capacidade de adesão significativamente maior quando comparada com o controle e demais amostras. As de narina exibiram também significativamente ($p < 0.001$) maior capacidade de adesão que as amostras de sangue e intestino. Todas as amostras de *S. epidermidis* apresentaram contagem de células viáveis após 24 horas de incubação, no entanto, quando realizado a comparação entre as cepas, duas amostras recuperadas do mesmo paciente em sítios diferentes (52 sangue e 52 narina) apresentaram contagens de células viáveis significativamente maiores ($p < 0.001$). Coincidentemente, essas amostras (22,2%) foram caracterizadas como fortes produtoras de biofilme. Em relação às demais amostras, quatro (44,5%) foram não produtoras de biofilme e três (33,3%) fracas produtoras. A microscopia eletrônica de varredura corroborou os achados, utilizando testes fenotípicos. Nossos achados sugerem que, sob as condições experimentais testadas e considerando a importância do *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (gene *mecA* positivo) na patogênese de ICS relacionados ao cateter, a maioria das cepas foi caracterizada como produtoras de biofilme independentemente do clone e da sua capacidade de adesão a biomateriais.

Palavras-chave: Biofilme, *Staphylococcus epidermidis*, Neonatos críticos.

INTRODUÇÃO

Neonatos prematuros são especialmente vulneráveis a infecções hospitalares, estando associadas à mortalidade significativa, além do aumento do tempo de internação e dos custos. As infecções de corrente sanguíneas estão entre as mais comuns nessa população, com frequências variando de 20%-40% [1,2]. Em países industrializados, as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCoN) destacam-se como os principais agentes dessas infecções, principalmente aquelas associadas ao Cateter venoso central, sendo *Staphylococcus epidermidis* o patógeno mais frequentemente isolado. Infecção neonatal por SCoN raramente é fatal, entretanto, causa morbidade significativa, e pode ser ainda mais graves se uma cepa com alta capacidade de formação de biofilme colonizar um dispositivo médico invasivo [3,4].

Tradicionalmente, para a formação de biofilme, durante a fase de fixação primária, as bactérias aderem à superfície a ser colonizada, enquanto que durante a fase acumulativa, as bactérias iniciam o estabelecimento de uma arquitetura tridimensional, multicelular e multicamada, na qual, intrigantemente, a maioria das bactérias não tem contato com a superfície [5,6]. *S. epidermidis*, então, é capaz de desmontar novamente a estrutura do biofilme, e acredita-se que as células liberadas permitam que a cepa colonize locais adicionais do corpo.

A UTI neonatal avaliada nesse estudo apresenta também o *S. epidermidis* como principal agente associado à patogênese de infecções de corrente sanguínea (ICS), assim, o objetivo da pesquisa foi verificar a capacidade da produção de biofilme entre amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue, narina, intestino e sítio de inserção de neonatos críticos em uso de cateter venoso central (CVC).

METODOLOGIA

Cepas bacterianas, meios e condições de crescimento

A origem e as características epidemiológicas de nove cepas clínicas de *S. epidermidis* utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 1. Essas cepas foram recuperadas de neonatos internados na UTI neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), um hospital público de atendimento terciário com 533 leitos no sudeste do Brasil, durante o período de janeiro de 2011 a dezembro de 2012. Foram avaliadas quatro amostras recuperadas de narina, três de sangue, uma de intestino e uma de sítio de inserção. Todas as amostras foram positivas para o gene *mecA*, portanto, resistentes a oxacilina. Em relação a clonalidade todas pertenceram a clones diferentes, exceto a amostra 52 (Clone G).

A identificação microbiana e o perfil de resistência das amostras obtidas do sangue foram realizadas pelo sistema automatizado VITEK II (bioMérieux), enquanto que as amostras recuperadas do intestino, narina e sítio de inserção foram submetidas aos testes de catalase e coagulase [7], e a caracterização em *Staphylococcus epidermidis* foi também determinadas posteriormente usando o sistema VITEK II (bioMérieux).

As cepas foram armazenadas a -20°C e subcultivadas em caldo tripton de soja (TSB) e placas de ágar tripton de soja (TSA) (Becton, Dickinson and Company) por 24 horas a 37°C. *S. aureus* SCC*mec* SIII156, produtor de biofilme, foi utilizado como controle para adesão inicial e formação de biofilme [8].

A aprovação ética para a coleta das cepas foi fornecida pelo Comitê de Ética da UFU (Protocolo 464/10).

Ensaio de adesão inicial

A suspensão celular foi obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) e lavada duas vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos), posteriormente diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em TSB. 200 μ L dessa suspensão de células foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, três poços para cada amostra testada. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 r.p.m. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*) pelo tempo de 1 minuto e 30 segundos. Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, em três experimentos independentes.

Número de células no biofilme

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL. Para cada amostra, 200 μ L dessa suspensão de células foi inoculada consecutivamente em três poços de cada microplaca de poliestireno estéril com 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA para enumeração das células. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas, em três experimentos independentes.

Ensaio de formação de biofilme

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria testada foi inoculada em oito poços da microplaca de poliestireno estéril com 96 poços. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 r.p.m. Os biofilmes foram lavados três vezes com solução salina estéril e, seguidamente, a cada poço, foi adicionado 200 µL de metanol por 15 minutos, para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e a placa enxuta em posição invertida a temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados vigorosamente com água destilada estéril e enxutos a temperatura ambiente. Posteriormente 200 µL de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço por 10 minutos para solubilizar o corante. Para 100 µL da solução de cristal violeta solubilizado foram transferidos para nova placa e a absorbância avaliada em leitor de placas a 570 nm com ácido acético 33% como branco.

Microscopia eletrônica

Duas amostras (52N, 52S) fortemente produtoras de biofilme e duas (26N e 22N) caracterizadas como não produtoras de biofilme foram selecionadas para avaliação pela microscopia eletrônica de varredura. O ensaio para produção de biofilme foi realizado novamente como descrito anteriormente, acrescido de uma esfera de vidro padronizada em 0,5 cm de diâmetro para cada amostra. Após formação de biofilme, as esferas foram fixadas em glutaraldeído/paraformaldeído 2,5%/8% a 4°C por 18 horas; lavadas em solução PBS (pH 7,4) por três vezes e posteriormente desidratadas em

álcool 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (três vezes), por 20 minutos cada a temperatura ambiente e em seguida levadas ao procedimento de secagem (ponto crítico). As esferas foram metalizadas com ouro na espessura de 20 nm, visualizadas e fotografadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura (Zeiss).

Análise estatística

Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) e pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando o teste de comparação múltipla de Dunn's como pós-testes. Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%, sendo os resultados obtidos através do software GraphPad Prism®, versão 5.01, considerando significativo $p < 0,01$.

RESULTADOS

Todas as amostras analisadas foram capazes de aderir a uma superfície de poliestireno no período de 2 horas. Observou-se que a amostra recuperada de sítio de inserção obteve capacidade de adesão significativamente maior quando comparada com o controle e demais amostras. As amostras de narina exibiram significativamente ($p < 0.001$) maior capacidade de aderir à superfície de poliestireno que as amostras de sangue e intestino (Figura 1A).

Em comparação com o controle, todas as amostras de *S. epidermidis* apresentaram contagem de células viáveis após 24 horas de incubação, no entanto, quando realizado a comparação entre as cepas, duas amostras recuperadas do mesmo paciente em sítios diferentes (52 sangue e 52 narina) apresentaram contagens de células viáveis significativamente maiores ($p < 0.001$). Coincidentemente, essas amostras

(22,2%) foram caracterizadas como fortes produtoras de biofilme de acordo com os critérios pré-estabelecidos [9] (Figura 1B e 1C).

Em relação às demais amostras, quatro (44,5%) foram caracterizadas como não produtoras de biofilme (sendo duas de narina, uma de intestino e uma de sítio de inserção) e três (33,3%) fracas produtoras (duas de narina e uma de sangue). Esses dados estão na Tabela 1.

De acordo com os resultados obtidos da produção de biofilme, foram selecionadas as amostras 52S e 52 N, fortes produtoras de biofilme, e 22N e 26N, não produtoras de biofilme para análise por microscopia eletrônica de varredura. As imagens obtidas pelo MEV ratificaram a capacidade das bactérias de aderir e produzir biofilme na superfície de placas de poliestireno e o contrário também foi confirmado para as amostras não produtoras de biofilme (Figura 2B, 2C, 2D e 2E).

DISCUSSÃO

A capacidade de aderir e, conseqüentemente, formar biofilme é um dos fatores mais importantes para que micro-organismos epidemiologicamente importantes, entre eles o *S. epidermidis* multirresistente, possam induzir infecções principalmente aquelas associadas a procedimentos invasivos como cateteres [6,10]. A detecção de cepas de *S. epidermidis* formadoras de biofilme por um método apropriado pode ajudar no entendimento de sua capacidade endêmica no ambiente hospitalar [11].

No nosso estudo apesar do pequeno número de amostras (n=9) a capacidade estatística foi corrigida pelo número de réplicas realizadas para cada cepa, sendo assim, para análise de adesão, quantificação das células viáveis bem como a formação do biofilme, os testes foram realizados em triplicatas em três experimentos independentes,

totalizando 243 valores de unidades formadoras de colônia (UFC). Portanto, a análise estatística foi baseada nas repetições dos experimentos, o que caracteriza o uso de uma metodologia laboriosa para o estudo de biofilmes com eficácia estatística. Vale ressaltar que poucos estudos descritos na literatura utilizam essa metodologia e a maioria dos trabalhos avalia a produção de biofilme apenas por meio de experimentos utilizando ágar vermelho Congo ou cristal violeta sem avaliar a concentração de células do biofilme e/ou sua adesão[12,13].

Em relação a neonatos críticos a infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter (ICC) continua sendo o evento adverso mais frequente nesses pacientes em todo o mundo e esse problema está associado ao aumento do tempo de internação, dos custos e ao pior prognóstico. Vale ressaltar que estudos sobre a patogênese dessas infecções tem sido limitada em neonatos criticamente doentes, o que não acontece no adulto em que a patogênese dessas infecções é bem definida [14,15]. Em ambos os pacientes a colonização ou adesão inicial do cateter pelo micro-organismo, assim como a capacidade dessas cepas em produzir biofilmes tem papel chave nessa patogênese.

Alguns autores têm proposto que a habilidade do *S. epidermidis* para produzir biofilme em combinação com a presença de alguns genes como o operon *icaABCD* (operon associado com a formação de biofilme) poderia ser usado como marcador de patogênese para distinguir cepas invasivas das comensais[16]. Embora não tenhamos até o momento avaliado a presença desse operon no nosso estudo, em relação a produção de biofilme a maior parte das amostras, independentemente do sítio de isolamento, apresentaram essa característica. Foi observado ainda que, as amostras de narina e sangue do mesmo paciente que tiveram o mesmo perfil clonal foram caracterizadas como fortes produtoras de biofilme, demonstrando a importância de se

determinar as características fenotípicas de clones epidemiologicamente importantes associados com a patogênese dessas infecções em neonatos.

Ainda em relação à metodologia empregada vale destacar que, diversos estudos mostram que a produção de biofilme pode ser estimulada ou inibida pela adição de alguns componentes ao meio de cultura como, por exemplo, a glicose. Um estudo que testou a capacidade de *Staphylococcus* sp. em produzir biofilme em meio TSB e TSB suplementado com 1% de glicose demonstrou resultados com aumento de mais de 48% de positividade nas cepas[17].

No nosso estudo utilizando TSB sem suplementação, cerca de 44% das cepas não produziram biofilme, o que pode ter sido influenciado pelas condições experimentais utilizadas. Embora as condições *in vivo* dependam das condições do crescimento bacteriano, da capacidade de adesão e de desenvolvimento do biofilme, entre outros fatores, os resultados do nosso estudo permitem expandir o conhecimento de um fenótipo hospitalar difícil de tratar.

De acordo com a literatura, a adesão bacteriana é essencial para o estabelecimento de uma infecção e o primeiro passo para a formação do biofilme [18]. No nosso estudo, o potencial de adesão do *S. epidermidis* de diferentes origens foi testado. Embora múltiplos fatores bacterianos externos influenciem a adesão desses micro-organismos, todas as amostras testadas apresentaram essa capacidade, entretanto, as amostras recuperadas de sítio de inserção e narina tiveram essa característica mais acentuada. Quando as cepas foram avaliadas individualmente e avaliadas quanto a produção de biofilme não observou-se relação entre a maior capacidade de adesão e a forte produção de biofilme. Esse aspecto foi visivelmente detectado na amostra 49SI de sítio de inserção em que sua adesão foi significativamente maior que as demais,

entretanto, não produziu biofilme. Isso, claramente demonstra que a habilidade em produzir biofilme não necessariamente influencia a capacidade de adesão de superfície.

Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a habilidade de produzir biofilme e a capacidade de adesão de *S. epidermidis* recuperadas de diferentes sítios relacionados à patogênese de ICS em neonatos críticos. A maioria das pesquisas com esses objetivos envolvendo esse patógeno não são realizadas utilizando amostras de diferentes origens em um mesmo paciente.

CONCLUSÃO

Nossos achados sugerem que, sob as condições experimentais testadas e considerando a importância do *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (gene *mecA* positivo) na patogênese de ICS relacionados ao cateter, a maioria das cepas foi caracterizada como produtoras de biofilme independentemente do clone e da sua capacidade de adesão a biomateriais. Acreditamos que esses resultados são importantes uma vez que essas características juntas favorecem um fenótipo difícil de tratar.

REFERÊNCIAS

1. BRITO DVD, BRITO CS, RESENDE DS, Ó JM, ABDALLAH VOS, GONTIJO-FILHO PP. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:633-637.
2. WORTH LJ, DALEY AJ, SPELMAN T, BULL AL, BRETT JA, RICHARDS MJ. Central and peripheral line-associated bloodstream infections in Australian neonatal and paediatric intensive care units: findings from a comprehensive Victorian surveillance network, 2008–2016. *J Hosp Infect* 2018; 99:55-61.
3. ARAUJO GL, COELHO LR, CARVALHO CB, MACIEL M, CORONADO AZ, ROZENBAUM R, FERREIRA-CARVALHO B, FIGUEIREDO AMS, TEIXEIRA LA. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:855-864.
4. QU Y, MCGIFFIN DC, KURE CE, OZCELIK B, THISSEN H, FRASER JF, PELEG AY. Microbial Biofilm Formation and Migration on Ventricular Assist Device Drivelines: Implications for Infection. *J Heart Lung Transplant* 2018; 37:S134.

5. BÜTTNER H, MACK D, ROHDE H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5:14.

6. Mack D, Horstkotte MA, Rohde H, Knobloch JKM. Coagulase-negative *Staphylococci*. In: *Biofilms, infection and antimicrobial therapy.* T&F 2006; 109-154.

7. Blaiotta G, Fusco V, Ercolini D, Pepe O, Coppola S. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial *kat* (Catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). *J Clin Microbiol* 2010; 48:192-201.

8. BATISTÃO DWF, CAMPOS PA, CAMILO NC, ROYER S, ARAÚJO BF, NAVES KSC, HENRIQUES M, GONTIJO-FILHO PP, BOTELHO C, OLIVEIRA R, RIBAS RM. Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *J Med Microbiol* 2016; 65:286-297.

9. SAXENA S, BANERJEE G, GARG R, SINGH M. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Diagn Res* 2014; 8:9-11.
10. FRANCOLINI I, DONELLI G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. *Immunol Med Microbiol* 2010; 59:227-238.
11. WOJTYCZKA RD, ORLEWSKA K, KEPKA M, IDZIK D, DZIEDZIC A, MULARZ T, KRAWCZYK M, MIKLASINSKA M, WASIK JT. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014 11:4619-4633.
12. KAISER TDL, PEREIRA EM, SANTOS KRN, MACIEL ELN, SCHUENCK RP, NUNES APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75:235-239.
13. XU Z, LIANG Y, LIN S, CHEN D, LI B, LI L, DENG Y. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr Microbiol* 2016; 73:474–482.
14. CRNICH CJ, MAKI DG. The Promise of Novel Technology for the Prevention of Intravascular Device—Related Bloodstream Infection. I. Pathogenesis and Short-Term Devices. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1232–1242.
15. O'GRADY NP, ALEXANDER M, DELLINGER EP, GERBERDING JL, HEARD SO, MAKI DG, MASUR H, MCCORMICK RD, MERMEL LA, PEARSON ML, RAAD II, RANDOLPH A, WEINSTEIN RA. Guidelines for the

Prevention of Intravascular Catheter–Related Infections. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1281–1307.

16. LINDSAY JA, MOORE CE, DAY NP, PEACOCK SJ, WITNEY AA, STABLER RA, HUSAIN SE, BUTCHER PD, HINDS J. Microarrays Reveal that Each of the Ten Dominant Lineages of *Staphylococcus aureus* Has a Unique Combination of Surface-Associated and Regulatory Genes†. *J Bacteriol* 2006; 188:669.

17. MATHUR T, SINGHAL S, KHAN S, UPADHYAY DJ, FATMA T, RATTAN A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:25-29.

18. MOLINARI G, CHHATWAL GS. Streptococcal invasion. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2:56–61.

Tabela 1. Características das amostras de *S. epidermidis* utilizadas no estudo da produção de biofilmes.

Amostras	Espécimes Clínicos	Clone	Gene <i>mecA</i>	D.O. **	Produção de Biofilme
SAIII156*	Ferida operatória	C2	+	0,45	Forte
22N	Narina	-	+	0,11	Não-produtor
26N	Narina	NR	+	0,12	Não-produtor
49N	Narina	R	+	0,55	Fraco
52N	Narina	G	+	2,17	Forte
22S	Sangue	B1	+	0,87	Fraco
26S	Sangue	NR	+	0,20	Não-produtor
52S	Sangue	G1	+	1,99	Forte
37I	Intestino	M	+	0,77	Fraco
49SI	Sítio de inserção	-	+	0,12	Não-produtor

*Amostra controle; **Média da densidade óptica; NR Não realizado; - Sem perfil de bandas PFGE.

Figura 1. Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em nove amostras de *S. epidermidis*. a) Número de células aderidas a uma superfície de poliestireno após 2 horas de adesão, expressas como Log UFC/ml; b) Concentração celular do biofilme expresso como Log UFC/ml; c) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO570nm). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, usando Kruskal-Wallis, Teste de comparação múltipla de Dunn. *S. aureus* SCCmec III foi utilizada como controle.

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilmes da amostras clínicas de *S. epidermidis*, desenvolvidos na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação. A) Controle negativo. B, C, D e E) Formação de biofilme e crescimento bacteriano das amostras 52S, 52N, 22N e 26N.

Figura 1

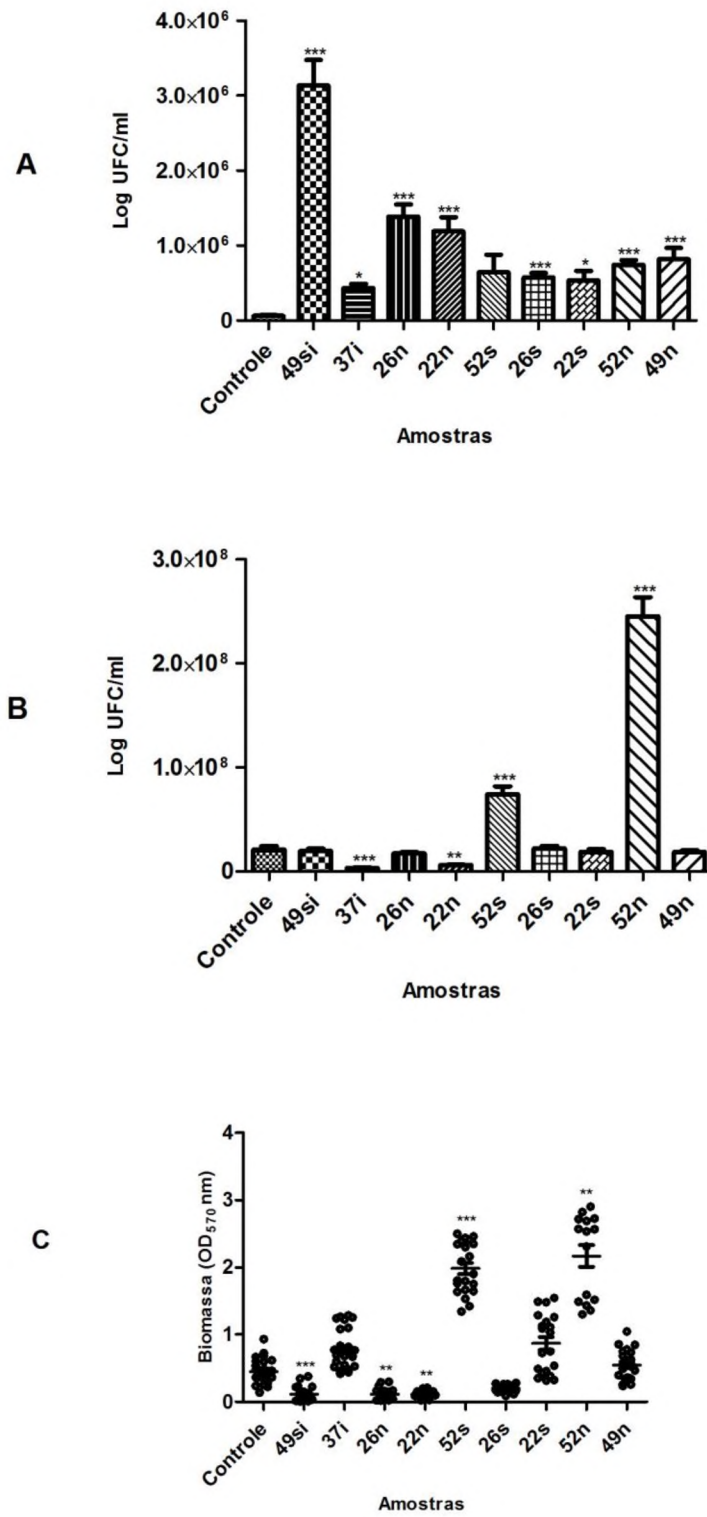


Figura 2

