

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

INFLUENCIA DE ATIVOS DE PRODUTOS ANTI-SEPTICOS NA PRODUCAO DE BIOFILME EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

¹Luisa Carreiro Ferreira (bolsista IC-UNIRIO); ¹Agostinho Alves de Lima e Silva; ¹Cleonice de Alves Bento; ²Maria José de Souza; ¹Renato Geraldo da Silva Filho; Isabel dos Santos Souza (bolsista IC-UNIRIO); ¹Carmen Soares de Meirelles Saramago (orientadora).

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Instituto Biomédico; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

2 - Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro

Palavras-chave: Staphylococcus epidermidis; biofilme.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus epidermidis é uma espécie do gênero *Estafilococos*, pertencente ao grupo coagulase negativo. Faz parte da microbiota da pele humana, exercendo papel protetor importante devido a sua competição com microrganismos potencialmente patogênicos. No entanto, atualmente, *S. epidermidis* é reconhecido como um importante patógeno oportunista especialmente em infecções hospitalares (OTTO, 2012). Na maioria das vezes a instalação do quadro de infecção causada por *S. epidermidis* envolve o uso de dispositivos médicos como cateteres venosos centrais, próteses articulares, marca-passos e outros implantes. (MACK 2013). O principal fator de virulência envolvido nestes casos refere-se a sua capacidade de aderir e formar biofilme na superfície de biomateriais. Biofilme é uma aglomeração de bactérias que se inserem em uma matriz extracelular e se organizam em multicamadas, sendo que esta estrutura oferece proteção contra os mecanismos imunológicos de defesa e antibióticos (FEY e OLSON, 2010). A matriz extracelular que envolve as células bacterianas tem como função promover a aderência intercelular e se depositar formando uma camada amorfa. A primeira substância identificada como constituinte da matriz extracelular em *S. epidermidis* foi denominada Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA - polysaccharide intercellular adhesin) (MACK et al., 1996). Este polissacarídeo de superfície, poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), é sintetizado por enzimas codificadas pelos genes do operon *icaADBC*. (ROHDE et al., 2010). Apesar da maioria das amostras clínicas de *S. epidermidis* produzirem biofilme PIA-dependente, recentemente foi reconhecido que a presença de PIA/PNAG não é uma condição exclusiva para esta formação. Isto porque foi identificada a produção de biofilme em amostras onde não foi detectada a presença de PIA. Nestas amostras, outros mecanismos de formação de biofilme PIA-independentes tem sido descritos e envolvem a produção de proteínas de superfície, tais como Bap (Biofilm associated protein), Bhp (Bap homologue protein), Aap (Accumulation-associated protein) e Embp (Extracellular matrix-binding protein) (OTTO, 2009). Vários métodos laboratoriais podem ser empregados para caracterizar a composição química do biofilme. Um dos mais utilizados é o teste em Agar Vermelho Congo (AVC) por ser rápido, de baixo custo e de alta eficiência na detecção de biofilme polissacarídico. Neste teste a amostra é caracterizada como produtora de biofilme polissacarídico quando as suas colônias apresentam coloração enegrecida (ARCIOLA et al., 2002). A presença de biofilme prejudica a penetração de antibióticos e diminui a acessibilidade da resposta imune do hospedeiro. Dessa maneira, há dificuldade na erradicação de infecções causadas por *S. epidermidis* em dispositivos médicos (MILISAVLJEVIC, 2008). Alguns agentes estressantes têm sido avaliados quanto a sua ação estimuladora ou inibitória sobre a formação de biofilme, bem como em que concentração eles apresentam tal função. Estudos demonstram que a expressão do operon *icaADBC* pode ser induzida pelo stress de etanol, resultando em formação de biofilme (CHAIEB et al., 2011), enquanto que a presença de clorexidina pode inibir a formação do mesmo (HOUARI; DI MARTINO, 2007).

OBJETIVO

- Avaliar o comportamento de amostras clínicas de *S. epidermidis* em Agar Vermelho Congo (AVC);
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de ativos de antissépticos (etanol e clorexidina);
- Verificar a influência de concentrações sub-inibitórias de ativos de antissépticos (etanol e clorexidina) na produção de biofilme por amostras clínicas de *S. epidermidis*.

METODOLOGIA

Foram estudadas cinquenta e duas amostras clínicas de *S. epidermidis* provenientes de pacientes do Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro (HSE). Do total de amostras, 25 foram previamente classificadas como produtoras de biofilme no teste em placa de microtitulação, sendo 17 ica positivas e 8 ica negativas (LORENCINI et al., 2013). Para o teste em AVC, as amostras foram ativadas em Caldo Soja Tripticaséina (TSB) e incubadas a 35°C, overnight. Foi preparada a base para o teste contendo Agar Soja Tripticaséina (TSA), Brain Heart Infusion (BHI), Sacarose e Congo Red (CR). As amostras foram semeadas em spot na superfície do meio e incubadas por 48h a 35°C, seguido da manutenção em temperatura ambiente por 48h (FREEMAN et al., 1989). A análise do spot foi realizada a cada 24h, sendo caracterizadas como amostras positivas, ou seja, produtoras de biofilme polissacarídico, as que apresentaram ao fim da análise spot preto ou ligeiramente preto, como negativas as que apresentaram spot vermelho e como indeterminadas as com spot vermelho escuro ("bordeaux") (ARCIOLA et al., 2002). A CIM dos ativos de produtos antissépticos foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo, como descrito por Houari e Di Martino (2007). Nesta, 50 μ L de uma suspensão da amostra bacteriana contendo $2,0 \times 10^6$ ufc/mL em TSB foram transferidos para poços de uma placa de microtitulação de 96 poços contendo 50 μ L de diluições seriadas na razão 1/2 de cada substância a ser testada. A placa de microtitulação foi incubada a 35°C por 24 h, e os poços examinados macroscopicamente quanto à presença de turvação do meio de cultura.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

A concentração inibitória mínima foi fixada como a menor concentração da substância que determina inibição visível do crescimento. O valor final da CIM para a amostra foi determinado a partir dos resultados concordantes de 3 experimentos independentes. Para o teste de produção de biofilme em placas de microtitulação as amostras estocadas foram repicadas para tubos contendo 2 mL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB), seguido de um repique para placas de Petri descartáveis contendo Ágar Soja Trypticaseína (TSA). Após isso, as placas de Petri ficaram em incubação por 24h a 35°C e delas foram utilizadas colônias isoladas das amostras para a preparação da cultura teste. As colônias isoladas foram repicadas para tubo contendo 2 mL de Caldo TSB e em seguida foram postas em incubação por 18 horas. A seguir foram preparadas as soluções de Clorexidina e Etanol para utilização no teste. As soluções foram preparadas utilizando Caldo TSB e as concentrações desejadas de Clorexidina e Etanol. Foram preparadas soluções de clorexidina 0,5 µg/mL e 1 µg/mL e soluções de etanol a 2% e 4%. As soluções de antissépticos foram adicionadas da suspensão bacteriana na proporção de 1:100 e 200µL transferidos para placa de microtitulação de 96 poços. Na placa, foram reservados quatro poços para a realização dos Testes Branco e Controle, enquanto outros quatro foram utilizados para a primeira concentração testada e os últimos quatro para a segunda concentração testada de cada solução. Após incubação das placas por 24h a 35°C, procedeu-se à leitura da placa de microtitulação, utilizando o equipamento leitor de Elisa. Dando início à leitura da placa, foi realizada a quantificação do crescimento bacteriano (DOg), por meio da determinação da densidade óptica, utilizando como comprimento de onda incidente 620nm. Para a determinação quantitativa da produção de biofilme procedeu-se a remoção das culturas dos poços por meio de inversão das placas em solução de hipoclorito, seguido de lavagem do interior dos poços por 3 vezes com água destilada com o auxílio de um micropipetador multicanal de 200 µL de capacidade. Para promover a fixação do biofilme, foram adicionados 200 µL de metanol a cada poço e deixado em contato durante 20 minutos a temperatura ambiente. O metanol foi retirado, novamente por inversão, e a placa colocada para secagem durante alguns segundos para evaporação de algum possível resíduo. A seguir, foram adicionados 200 µL de solução aquosa de Cristal Violeta de Hucker a 2% em cada poço, com período de contato de 10min a temperatura ambiente. Os poços foram então submetidos à lavagem com água destilada, aproximadamente 2,5 litros, para retirada do excesso de corante e logo após a placa foi colocada para secar a 35°C. Após a secagem da placa, foi realizada a leitura de quantificação inicial de biofilme (DOsa), tendo como parte lida o fundo do poço e comprimento de onda incidente 570nm. Para a diluição do corante aderido ao biofilme, foram adicionados 200 µL de etanol em cada poço, seguido de agitação em agitador orbital por 15 min. A absorbância do extrato alcoólico (DOeb) foi então determinada no leitor de ELISA também submetido a incidência de luz com comprimento de onda de 570 nm, para quantificação total do biofilme nos poços.

RESULTADOS

No teste de AVC, entre as 52 amostras estudadas, 14 apresentaram reação positiva, 35 reação negativa e 3 reação indeterminada (coloração “bordeaux”). Os valores da CIM do etanol ficaram entre 6 e 8% e da clorexidina entre 1,5 e 2,0 µg/mL para as amostras estudadas. Entre as 17 amostras produtoras de biofilme e ica positivas, 16 mostraram aumento na produção de biofilme quando expostas a concentrações sub-inibitórias de etanol (2 e 4%) e apenas 1 amostra apresentou redução. O aumento na produção de biofilme foi dose-dependente em 15 das 16 amostras, isto é o aumento determinado pela concentração de 4 % de etanol foi superior ao obtido com 2%. Além disso, os percentuais de aumento de DOsa mostraram-se maiores do que os de DOeb na maioria das amostras. Entre as 8 amostras produtoras de biofilme e ica negativas, todas apresentaram aumento na produção de biofilme quando em contato com a concentração de 2% de etanol. Entre estas amostras, 5 expressaram biofilme fraco e as outras 3 biofilme moderado. A produção de biofilme nas ica negativas não apresentou diferença entre os resultados de DOsa e DOeb, como foi observado nas ica positivas. Nas 27 amostras previamente identificadas como não produtoras de biofilme não houve produção de biofilme quando em contato com as concentrações de etanol utilizadas. Nos testes com clorexidina, entre as 17 amostras produtoras de biofilme e ica positivas, 13 apresentaram redução na produção de biofilme quando em contato com as concentrações sub-inibitórias testadas (0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL). Nestas amostras a redução foi mais acentuada na DOsa do que na DOeb, e, da mesma forma que nos testes com etanol, também foi dose-dependente, uma vez que a redução determinada pela concentração de 1,0 µg/mL foi maior do que a observada na concentração de 0,5 µg/mL. Uma amostra apresentou aumento na produção de biofilme quando em contato com clorexidina, outra se mostrou não regulada pela clorexidina e 2 ainda estão indeterminadas.

CONCLUSÃO

No teste do AVC, 27% do total de amostras testadas (52) apresentaram reação positiva indicando produção de biofilme polissacarídico, enquanto 67% apresentaram reação negativa e 6% apresentaram reação indeterminada (coloração “bordeaux”). Entre as 25 amostras classificadas como produtoras de biofilme no teste em placa de microtitulação, 14 apresentaram reação positiva no teste em AVC, 8 apresentaram reação negativa e 3 foram determinadas. Os resultados dos testes de produção de biofilme em placa de microtitulação na presença de antissépticos mostraram que, na maioria das amostras, o etanol, em concentrações abaixo da CIM, pode atuar como um forte indutor da produção de biofilme. Em contra partida, na maioria das amostras testadas, a clorexidina teve um efeito redutor na formação de biofilme. Estes dados destacam a clorexidina como um antisséptico com potencial para reduzir o número de casos de infecções associadas ao uso de implantes, causadas por *S. epidermidis*. A formação de biofilme por *S. epidermidis* na superfície de polímeros, com a consequente persistência do patógeno, constitui fato de grande relevância, visto que diversos dispositivos utilizados em procedimentos invasivos são fabricados com estes materiais. Com isso, o estudo apresentado possui grande importância no cenário do controle de infecções associadas ao uso de implantes médicos.

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

REFERÊNCIAS

- ARCIOLA, C.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINIA, S.; CERVELLATIA, M.; DONATIA, E.; MONTANARO, L.; 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
- CHAIEB, K.; ZMANTAR, T.; SOUIDEN, Y.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*. v. 50, p. 1-5, 2011.
- FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* v. 5, p. 917-933, 2010.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.
- HOUARI, A.; DI MARTINO, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Journal compilation- Letters in Applied Microbiology*. v. 45, p. 652-656, 2007.
- LORENCINI, N. A.; LIMA-SILVA, A. A.; BENTO, C. A. M.; SOUZA, M. J.; SILVA FILHO, R. G.; SOUZA, I. S.; SARAMAGO, C. S. M. Biofilme em amostras clínicas de *staphylococcus epidermidis* - correlação da produção e composição com aspectos genotípicos In: 12a. Jornada de Iniciação Científica da UNIRIO, 2013, Rio de Janeiro. Resumos da 12a. Jornada de Iniciação Científica da UNIRIO, 2013.
- MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE H.; LAUFS R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.*, v. 178, p. 175-183, 1996.
- MACK, D.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G.; JEEVES, R.; PASCOE, B.; KNOBLOCH, J. K.-M.; ROHDE, H.; WILKINSON, T. S. *Staphylococcus epidermidis* in Biomaterial-Associated Infections. In: MORIARTY, F.; FINTAN; ZAAT, S. A. J.; SEBASTIAN A. J.; BUSSCHER, H. J. *Biomaterials Associated Infection - Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies*. New York. Springer, 2013. Chapter 2. p. 25-55.
- MILISAVLJEVIC, V.; TRAN, L.; BATMALLE, C.; BOOTSMA, H. Benzyl alcohol and ethanol can enhance the pathogenic potential of clinical *Staphylococcus epidermidis* strains. *AJIC: American Journal of Infection Control*. v. 36, p. 552-558, 2008
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 7, p. 555-567, 2009.
- OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.*, v. 34, p. 201-214, 2012
- ROHDE, H.; BURDELSKI, C.; BARTSCH, K.; HUSSAIN, M.; BUCK, F.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K.; HEILMANN, C.; HERRMANN, M.; MACK, D. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.*, v. 55, p. 1883-1895, 2005.
- ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*, v. 89, p. 103-111, 2010.