

Avaliação da capacidade de formação de biofilme de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* provenientes de amostras clínicas de cães

LOPES, B.C.¹; DRIEMEIER, D.¹

¹UFRGS Faculdade de Veterinária

Introdução

Staphylococcus pseudintermedius é um patógeno importante na clínica de pequenos animais estando associado com piodermatite e otite externa em cães. É considerado um patógeno oportunista, constituindo a microbiota cutânea normal de cães e gatos. Semelhante a outras espécies do gênero, é provável que a produção de biofilme seja um fator de virulência crítico para o estabelecimento e manutenção das infecções. Infecções associadas a biofilmes se caracterizam por massas de células bacterianas envoltas por matriz extracelular e aderidas as superfícies do hospedeiro, dificultando o acesso de antimicrobianos e desinfetantes, assim como, a ação do sistema imune. O objetivo do estudo é caracterizar potencial de produção de biofilme de isolados clínicos e de animais hígidos, comparando os resultados dos grupos e comparar métodos de avaliação de produção de biofilme.

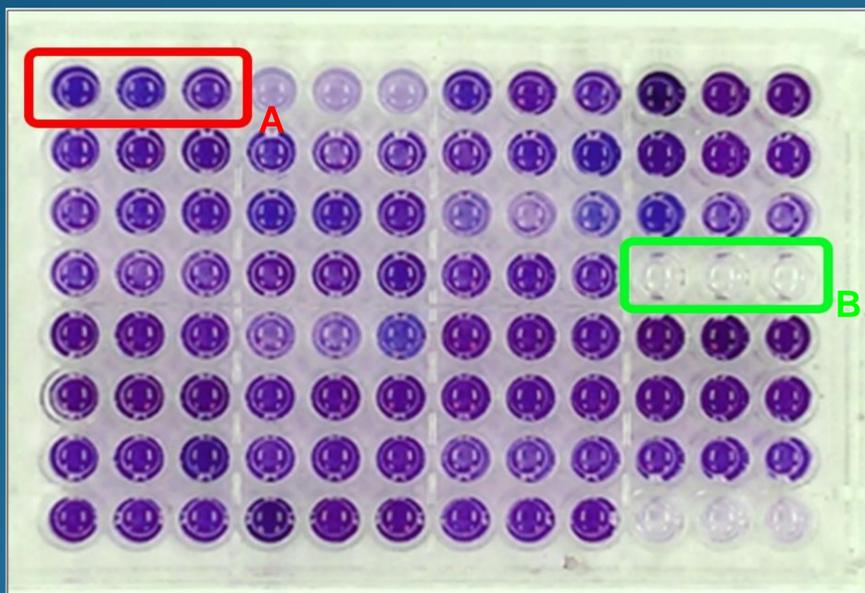


Figura 1. Método da placa de microtitulação; A. Controle positivo; B. Controle negativo.

Materiais e Métodos

Isolados bacterianos

As amostras (n=66) são provenientes de casos clínicos de dermatite (n=41) e otite (n=25) em cães. Os isolados foram classificados como *S. pseudintermedius* a partir de identificação morfológica e bioquímica.

Ágar e caldo vermelho congo

As amostras eram inoculadas em ágar (CRA) e caldo vermelho congo (CRB) e as características do crescimento eram observadas após 24h a 37°C e adicionais 24h em temperatura ambiente

Produção de biofilme em placa de microtitulação (MTP)

A partir de inóculo padronizado as amostras eram diluídas em TSB com 1% de glicose e inoculadas em triplicata em placas de microtitulação com poços de fundo plano. As placas eram então incubadas a 37°C por 18 horas. Após a incubação, os poços eram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) e secos a 42°C. Após a secagem, os poços eram corados com solução 2% de Cristal Violeta e lavados novamente. No momento da leitura o corante era ressolubilizado com solução álcól-ácida de Ziehl-Neelsen. Para a determinação da absorvância foi utilizado espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda de 620 nanômetros.

Resultados (parciais)

MTP

De acordo com o esquema de classificação proposto por Stepanovic (2007), 63 (95,45%) isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme, 2 (3,03%) como intermediários e 1 (1,52%) como fraco produtor. Utilizando o método da placa de microtitulação, todos os isolados foram classificados como produtores de biofilme

CRA

Através do método do CRA, 52 (78,79%) isolados foram classificados como produtores de biofilme e 14 (21,2%) como não produtores.

CRB

Usando o método do CRB, 62 (93,94%) isolados foram classificados como produtores e 4 (6,06%) como não produtores. A análise de concordância demonstrou baixa concordância entre os métodos MTP e CRA (Kappa=0,100) enquanto entre MTP e CRB apresentou concordância moderada (Kappa=0,317).

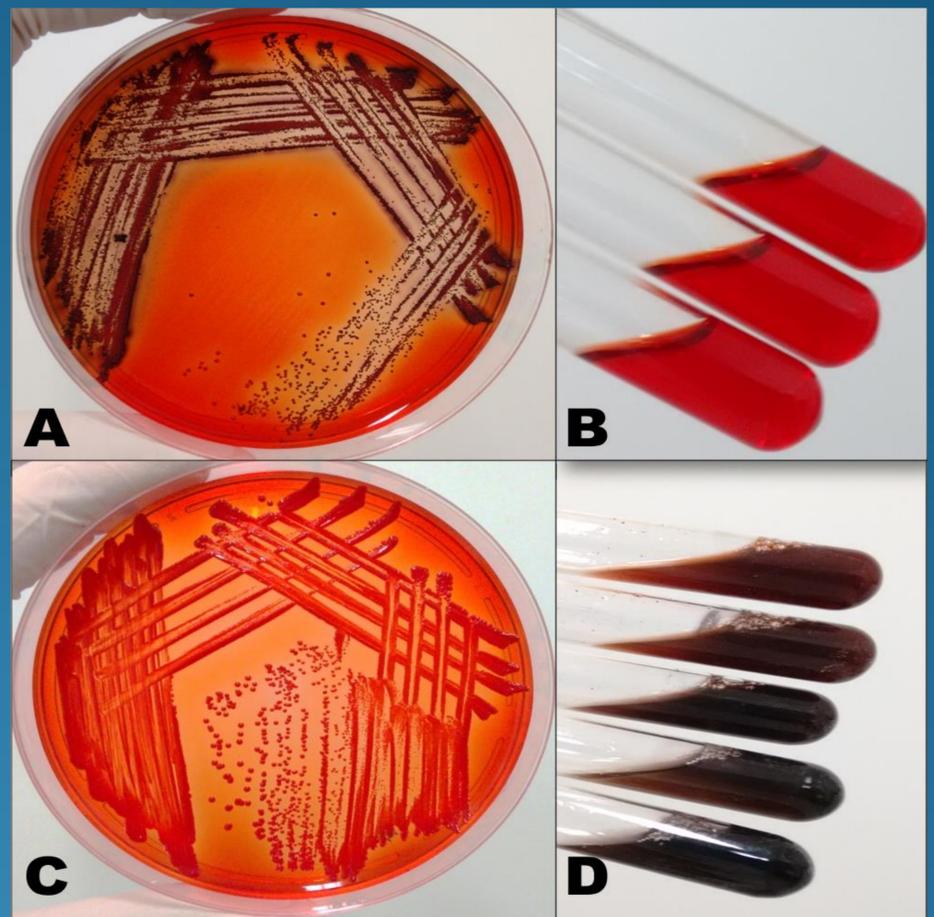


Figura.2. A: *S. aureus* ATCC 25923 inoculado em CRA; B: CRB não inoculado; C: *S. pseudintermedius* em CRA; D: CRB inoculado com amostras produtoras de biofilme.

Comparação entre os grupos dermatite e otite

Não foi observada diferença entre a capacidade de formação de biofilme entre as amostras de otite e dermatite ($p = 0,197$, Teste U de Mann-Whitney).

Discussão

A falta de diferença significativa na comparação dos grupos otite e dermatite indica que a capacidade de formação de biofilme é independente da origem do isolado. Aparentemente, todos isolados de *S. pseudintermedius* demonstram elevada capacidade na produção de biofilme, não sendo observados isolados não produtores até o momento. Esse resultado está de acordo com o que foi observado por Singh e colaboradores (2013), que não verificaram diferença na produção de biofilme entre amostras clínicas metilicina-resistente (MRSP), metilicina-sensíveis e comensais de pele. Essa característica faz com que o *S. pseudintermedius* se diferencie substancialmente de outras espécies do gênero (notavelmente *S. aureus* e *S. epidermidis*) que apresentam maior variabilidade sob esse aspecto. Os testes CRB e CRA não demonstraram boa performance quando comparados com o método MTP, destacando suas limitações na utilização para classificação de *S. pseudintermedius* como produtor de biofilme. Os resultados apresentados até o presente momento são parciais, a coleta de amostras clínicas continuará até atingir o número de amostras previsto em cada grupo.

Agradecimentos

Agradecimento ao Laboratório Pathos por ceder gentilmente os isolados e ao pós-doutorando Gustavo Snel pelo apoio técnico.

Referências

- Stepanovic et al.: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 2000 175-179.
Singh et al.: Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Veterinary Research* 2013 9:93.