



## ASSOCIAÇÃO ENTRE FORMAÇÃO DE BIOFILME E ADESÃO EM CÉLULAS HeLa EM DIFERENTES TIPOS CAPSULARES DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE MICROBIOTA HUMANA

Morguette, A. E. B.<sup>1</sup>; Otaguiri, E. S.<sup>2</sup>; Sarmiento, J. J. P.<sup>3</sup>; Perugini, M.R.E.<sup>4</sup>; Yamauchi, L. M.<sup>5</sup>; Yamada-Ogatta, S.F.<sup>6</sup>

**RESUMO:** *Streptococcus agalactiae*, ou grupo B de Lancefield (EGB - estreptococo do grupo B), pode ser encontrado como comensal na microbiota humana, colonizando principalmente o trato gastrointestinal e geniturinário. Porém, é um patógeno importante que pode causar meningite, septicemia e infecções invasivas, principalmente em recém-nascidos, além de morte fetal. A infecção em recém-nascidos classificada como doença neonatal de início precoce (EOD - *early-onset disease*). Em gestantes a colonização vaginal está fortemente associada com a infecção em recém-nascidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de adesão em células HeLa e formação de biofilme em poliestirenos de diferentes tipos capsulares de EGB. A maioria dos isolados foram capazes de aderir em células HeLa e formar biofilme em placa de poliestireno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Adesão; Biofilme; *Streptococcus agalactiae*.

### 1 INTRODUÇÃO

*Streptococcus agalactiae*, pode ser encontrado na microbiota humana, colonizando principalmente o trato gastrointestinal e geniturinário (MCCORD et al., 2001). A colonização da mucosa vaginal de gestantes por EGB em presença de outros fatores de risco aumenta significativamente a incidência de infecção neonatal por essa bactéria. EGB é eficientemente capaz de se adaptar a ambientes diferentes durante o curso da infecção, garantindo sua sobrevivência nesses sítios (RAJAGOPAL, 2009). Esta adaptação pode estar associada a presença de fatores de virulência que promovem adesão e colonização tecidual, degradação de moléculas e resistência a fagocitose contribuindo nos processos de invasão, sobrevivência intracelular e persistência bacteriana no hospedeiro (NIZET; RUBENS, 2000).

A aderência de EGB em células epiteliais da mucosa vaginal e retal das gestantes é um evento importante na patogênese da sepse neonatal. Uma vez aderidas as bactérias podem formar biofilme, que constitui uma forma de proteção para o microrganismo,

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica da Fundação Araucária ae.belotto@gmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica de Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia eliane\_saori@hotmail.com

<sup>3</sup>Acadêmico de Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia joshua193@hotmail.com

<sup>4</sup> Professora Dra. do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina - PR marciaperugini@hotmail.com

<sup>5</sup> Professora Dra. da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. lionilmy@uel.br

<sup>6</sup> Orientadora. Professora Dra. da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. ogatta@uel.br

permite a sobrevivência em ambientes hostis, além de fomentar relações simbióticas (KYAW, 2008). Poucos trabalhos, envolvendo os tipos capsulares, formação de biofilme e adesão em células de isolados de EGB no Brasil, são encontrados na literatura. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre os tipos capsulares de isolados de EGB, capacidade de adesão em células HeLa e formação de biofilme.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MICRORGANISMOS

Noventa e dois EGBs isolados de pacientes atendidos entre Março a Setembro de 2012, no Hospital Universitário de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, foram selecionados da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Clínica da UEL. Os isolados foram classificados de acordo com as definições preconizadas pelo CDC para infecções relacionadas à assistência em saúde (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

A identificação foi realizada pelos métodos fenotípicos padrões baseados na morfologia da colônia, coloração de Gram, catalase, CAMP e foram classificados em tipos capsulares utilizando-se a reação de multiplex-PCR descrita por Imperi et al. (2010).

### 2.2 DETECÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE POLIESTIRENO

O ensaio para formação de biofilme foi avaliado conforme a metodologia descrita por Borges et al. (2012) em Trypticase Soy Broth (TSB) pH 6,5 e incubação a 37 °C por 24 horas. Os testes foram feitos em quintuplicata com duas repetições.

### 2.3 DETERMINAÇÃO DA ADESÃO EM CÉLULAS HELA

A adesão em células HeLa ATCC CCL-2 (adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) foi avaliada pela metodologia descrita por Craviotto et al. (1979), com modificações. Cada isolado bacteriano foi inoculado em placa de ágar sangue e incubado por 24 horas a 37 °C. As células HeLa foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicillina, 100 mg/mL estreptomicina e 0,25 mg/mL de anfotericina B, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. O meio foi removido e as células foram submetidas a três lavagens com PBS e posterior adição de 1 mL de DMEM contendo 2 mM glutamina e 0,25 mg/mL anfotericina B. A densidade celular de todos os isolados de EGB foi ajustada de acordo com a escala de 1,0 McFarland (3,0 x 10<sup>8</sup>) em PBS. Em seguida, 100 µL de cada suspensão celular foram adicionados nos poços contendo as células HeLa. A placa foi incubada por 3 horas e trinta minutos para adesão e 4 horas para o período de multiplicação. Todos os testes foram feitos em duplicata.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 FORMAÇÃO DE BIOFILME E ADESÃO DE EGB EM CÉLULAS HELA ENTRE OS DIFERENTES TIPOS CAPSULARES.

Foi estudado um total de 92 isolados de colonização, sendo a maioria de tipo Ia (n=37), seguido do V (n=28), III (n=14), II (n=12) e IX (n=1).

Não houve diferença significativa entre a capacidade de adesão em células Hela e formação de biofilme entre os diferentes tipos capsulares. Todos os isolados foram

capazes de aderir em células HeLa e formar biofilme em placa de poliestireno, com exceção de um isolado não formador de biofilme tipo II, independente do tipo capsular. Ainda não existe um consenso quanto aos diferentes tipos capsulares de EGB e a capacidade de formação de biofilme. Enquanto em nosso estudo todos os isolados foram formadores de biofilme, independente do tipo capsular, Ho et al (2012) verificaram que os tipos III e V combinados, eram significativamente mais formadores de biofilme quando comparados com os tipos Ia e Ib. No entanto, Kaur et al. (2009) verificaram que a maioria dos isolados produtores de biofilme foram classificados como tipo Ia (47%), seguido de Ib (29%), não tipável (15%), III (6%) e V (6%).

#### 4 CONCLUSÃO

A maioria dos isolados de EGBs foram capazes de se aderir em células HeLa e formar biofilme em placa de poliestireno, fatores que podem influenciar na colonização da mucosa vaginal de gestantes, aumentando o risco de infecção neonatal por este microrganismo.

#### REFERÊNCIAS

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677-682, 2012.

CRAVIOTTO, A. et al. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v. 3, p. 95–99, 1979.

HO, Y. R. et al. The enhancement of biofilm formation in Group B streptococcal isolates at vaginal pH. **Med Microbiol Immunol**, 2012.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **Am J Infect Control**, v. 36, n. 5, p. 309-332, 2008.

IMPERI, M. et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **J Microbiol Methods**, v. 80, n. 2, p. 212-214, 2010.

KAUR, H. et al. Biofilm formation in clinical isolates of group B streptococci from north India. **Microb Pathog**, v. 46, n. 6, p. 321-327, 2009.

KYAW, C.M. Biofilmes Microbianos. Disponível em <[www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm](http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.htm)>. Acesso em 9 de agosto de 2013

MCCORD, N. et al. A complete audit cycle of intrapartum group B *streptococcus* prophylaxis. **Health Bull (Edinb)**, v. 59, n. 4, p. 263-267, 2001.

NIZET, V.; RUBENS, C. E. Pathogenic mechanisms and virulence factors of group B streptococci. In: *The Gram-Positive Pathogens*. **Washington, D.C: ASM Press**, 2000.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors.  
**Future Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 201-221, 2009.