

Formación de Biofilms de *Staphylococcus aureus* en Placas de Plástico de 96 Pocillos y Cuantificación de la Viabilidad Bacteriana mediante ATP-Bioluminiscencia

BEATRIZ AMORENA¹, ELENA GRACIA¹ JOSE LUIS ALABART² y PILAR CONCHELLO^{1,3}

¹CSIC. Unidad de Sanidad Animal. SIA DGA. 50080 Zaragoza; ²Unidad de Tecnología en la Producción Animal. SIA DGA. 50080 Zaragoza; ¹dirección actual: ³dirección actual: Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. 50013 Zaragoza

INTRODUCCION. En especies como *Staphylococcus aureus*, se ha observado que la producción de una matriz exopolisacáridica, comúnmente conocida como slime, conduce a la formación de microcolonias y aumenta la adherencia a diferentes superficies, como polímeros o plásticos (1) formando capas o biofilms. La producción de exopolisacáridos puede diferir entre variantes de una misma cepa. Así, a partir de una cepa no productora de exopolisacárido (NPE), puede obtenerse su variante productora (PE) y viceversa (2). Las bacterias de cepas PE tienen una mayor capacidad colonizadora (3), escapan a la fagocitosis (4) y pueden encontrarse en la naturaleza habitualmente asociadas a infecciones crónicas, siendo estas difíciles de diagnosticar y erradicar mediante tratamiento antibiótico. Ello supone una gran pérdida del potencial productivo en especies como la bovina, en las que los animales con infección crónica por *S. aureus* (mastitis) han de ser sacrificados. Para el estudio del tratamiento de infecciones crónicas, se han propuesto modelos animales, generalmente lentos y costosos (5,6,7). También se ha diseñado un modelo in vitro laborioso que no resulta aconsejable como método de rutina, según sus autores (8). En el presente estudio, se ha desarrollado un modelo in vitro sencillo, basado en la formación de biofilms (utilizando cepas PE y placas de plástico de 96 pocillos) y uso de ATP-bioluminiscencia, evaluándose en ~1h/placa la viabilidad bacteriana del biofilm.

MATERIAL Y METODOS. Se emplearon dos cepas de *S. aureus* NPE (80 y 510), aisladas de mastitis clínica bovina, obteniéndose de ellas in vitro su variante PE (2). Las cepas se conservaron a -20° C en medio TSB con 15% de glicerol. Previo a cada ensayo, las bacterias se sembraron en Agar Sangre. Para el test de adherencia, se emplearon placas de fondo plano de 96 pocillos de poliestireno (Nunc-Immuno Plate) o comerciales, con recubrimiento específico para cultivo celular (Cell Well Tissue Culture Treated Polystyrene Plate, Corning, New York). Las primeras se recubrieron con gelatina (con calidad para cultivo celular) o con hidrobomuro de poly-L-lisina (ambas de Sigma, St. Louis, USA). Tras incubación con 0,2 ml de la correspondiente solución (0,5 mg/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente) a 37° C (durante 18h y 10 min, respectivamente), lavado con agua destilada y secado, en cada pocillo se inocularon 25 µl de crecimiento bacteriano en TSB en fase estacionaria. Se añadieron 175 µl de TSB. Tras

una incubación a 37° C (durante 1, 2, 6, 24 y 48 h), tres lavados, extracción del ATP con 200 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO; de Panreac, Barcelona) y ultrasonicación (15 min) en baño (P-Selecta), se determinó (usando 40 μ l) la viabilidad bacteriana con un Luminómetro (Luminoskan R S 1.1-0 (Labsystem, Finlandia, Helsinki) Se produjeron curvas estándar y se correlacionó la luz emitida (ATP-bioluminiscencia) por bacterias viables con las UFC, según el método de Wheat (9). Los ensayos se realizaron por duplicado en 4 fechas, aplicándose un análisis Anova 2 factorial (programa estadístico Superanova para Machintosh). Para cada variante, se obtuvo una tabla de medias referidas al efecto tiempo y material.

RESULTADOS Y DISCUSION. El grado de adherencia de las cepas testadas varió con el tipo de placas, figurando en orden de mayor a menor la adherencia a: placas comerciales de cultivo celular, poliestireno recubierto de gelatina, poliestireno recubierto de lisina y poliestireno no tratado. Se observaron diferencias ($P < 0,05$) entre el primer tipo de placas y los restantes en todas las cepas (excepto en la variante NPE de la cepa 80, a partir de las 6 h de incubación. A la vista de los resultados obtenidos, dicho tipo de placas (de cultivo celular) sería el de elección para tests sistematizados de formación de biofilms de *S. aureus*. Se evidenciaron diferencias entre cepas y entre variantes (PE y NPE) de *S. aureus* respecto de la capacidad formadora de biocapas (las variantes PE se adherían más que las NPE). Por otro lado, al analizar el periodo de incubación mínimo necesario para formación de biofilm, se comprobó que 2 h era un periodo insuficiente para que, en las condiciones de esta experiencia, las variantes PE formaran una biocapa fuertemente adherida al soporte (las bacterias se eliminaban con los lavados durante dicho período). Sin embargo, partir de las 6 h de cultivo, la adherencia aumentaba hasta el final del periodo de estudio (48 h). Únicamente para la placa para cultivo celular, el incremento resultó significativo y continuo con todas las cepas. En relación a otros (5, 6, 7, 8), el test diseñado de formación de biofilms, basado en la utilización de variantes PE, de placas especiales de cultivo celular, biofilms de 6 a 48 h y evaluación de viabilidad por luminometría, resulta rápido, sistematizable y objetivo.

AGRADECIMIENTOS. Financiado por INIA, CONAI y FIS

1. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J... 1985 *J. Clin. Microbiol.* 22: 996-1006
2. Baselga, R., Albizu, I., Penadés, J.R...1992 *Current Microbiol.* 25: 173-179
3. Baselga, R., Albizu, I., de la Cruz, M... 1993 *Infect. Immun.* 61: 4857-4862
4. Baselga, R., Albizu, I., Amorena, B. 1994 *Vet. Microbiol.* 39: 195-204.
5. Power, M.E., Olson, M.E., Domingue, P.A.G... 1990 *J. Med. Microbiol.* 33: 189-198
6. McDermid, K.P., Morck, D.W., Olson, M.E... 1993 *J. Infect. Dis.* 168: 897-903
7. Ward, K.H., Olson, M.E., Lam, K... 1992 *J. Med. Microbiol.* 36: 406-413
8. Domingue, G., Ellis, B., Dasgupta, M... 1994 *J. Clin. Microbiol.* 32: 2564-2568
9. Wheat P.F., Hastings J.G.M., Spencer R., 1988 *J. Med. Microbiol.* 25: 95-99

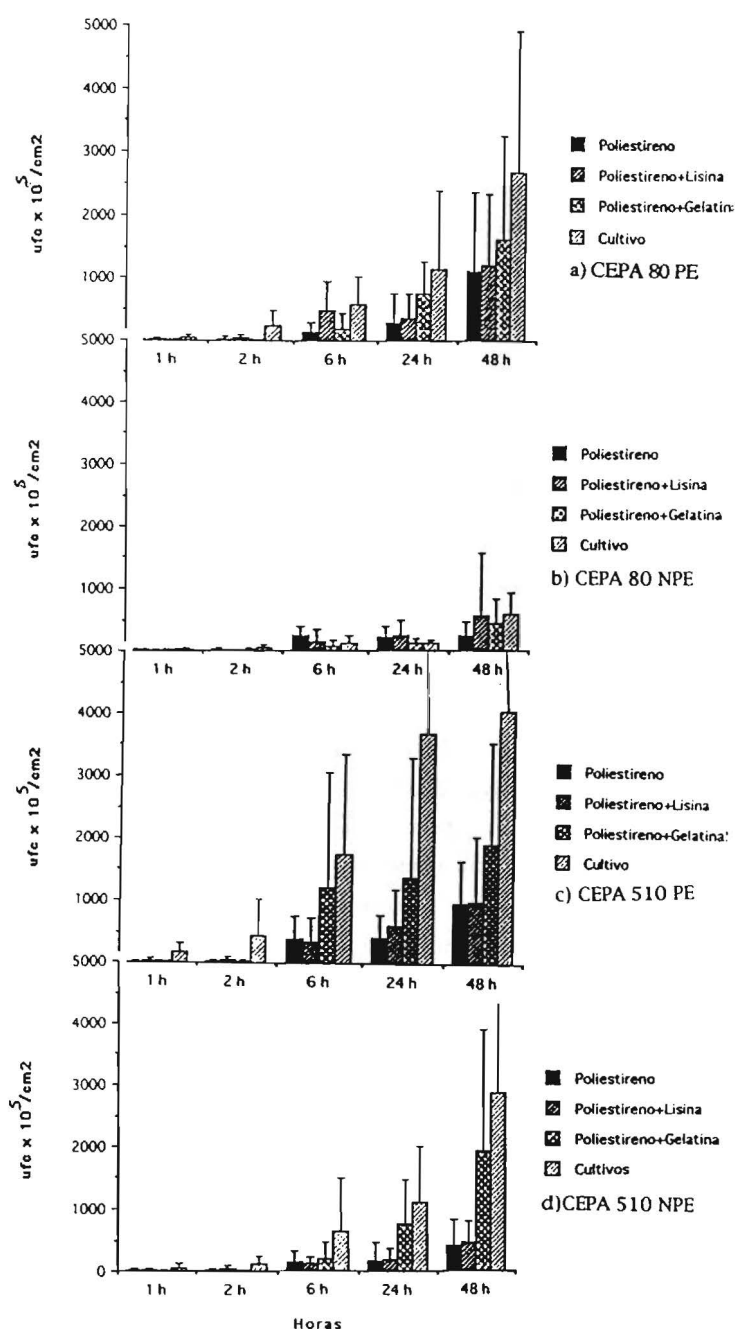


Figura 1: Determinación por ATP-Bioluminiscencia de la viabilidad bacteriana (ufo/cm^2), en biofilms, desarrollado sobre placas de plástico a lo largo de 48 horas de incubación a 37°C .