

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES *IN VITRO* EM BACTÉRIAS ISOLADAS DE UNIDADE DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO HOSPITALAR

ITIANE BARCELLOS JASKULSKI¹; SIMONE PIENIZ²; CARLOS CASTILHO DE BARROS³

¹Bolsista PBIC - Graduanda- Faculdade de Nutrição - itianebarcellosj@hotmail.com

²Professora da Faculdade de Nutrição –nutrisimone@yahoo.com.br

³Professor da Faculdade de Nutrição –barros_cc@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) uma das maiores preocupações na área de saúde é a alta incidência de infecção hospitalar, ou seja, infecções adquiridas em ambientes hospitalares durante a internação ou após a alta do paciente, quando este esteve hospitalizado ou passou por procedimentos médicos. Segundo SREY, JAHID e HA (2013) em ambientes inóspitos e em condições adversas, como estratégia de sobrevivência, para algumas bactérias é fundamental ter capacidade para formar um biofilme. Biofilmes são sistemas biológicos formados por comunidades de células agregadas, organizadas e funcionais embebidas em matriz extracelular composta por substâncias poliméricas, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além de estarem relacionados com infecções alimentares, a presença de micro-organismos capazes de produzir biofilmes em locais de processamento de alimentos tornam esses ambientes potenciais fontes de contaminação, reduzindo a ação dos produtos de limpeza e sanitizantes (DEWANTI; WONG 1995).

O desenvolvimento de técnicas moleculares contribui para a identificação bacteriana, através do sequenciamento do *ácido desoxirribonucléico (DNA)* especificamente do gene 16S do *ácido ribonucléico ribossômico (rRNA)*, o qual é altamente conservado e presente a todas as bactérias (CLARRIDGE, 2004). A atribuição de uma sequência do gene 16S pode determinar a espécie de uma bactéria e sua patogenicidade ou benefício ao hospedeiro. Dentre alguns métodos para identificação do gene 16S, destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) com subsequente sequenciamento. É possível ainda que seja feita a identificação de genes responsáveis pela produção de biofilme e resistência antimicrobiana presentes nas bactérias.

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil de DNA genômico e produção de biofilme referente às espécies bacterianas isoladas em uma Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) hospitalar e ainda analisar possíveis genes formadores de biofilme presente nos isolados

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi desenvolvido em uma UAN hospitalar na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Os micro-organismos foram isolados de equipamentos como bancada de vegetais, bancada de carne, micro-ondas, tábua de corte de carne e tábua de corte de vegetais. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Pelotas (UCPel).

Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Foi analisado a capacidade de formação de biofilme do isolado de acordo com STEPANOVIC et al. (2000). Como controle positivo foi utilizado *Staphylococcus epidermidis*. As cepas foram classificadas com base na densidade ótica, nas seguintes categorias: não há produção de biofilme, fraco, moderado ou forte produtor de biofilme, como descrito anteriormente por Stepanovic.

Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de células de nove isolados, incubados em 100 µL de EAR Buffer e 5 µL de Proteinase K (20 mg/mL *Invitrogen*®) a 55 °C durante 4 h. Após resfriamento foram adicionados 750 µL de TE Buffer. Após centrifugação, foi utilizado 1 µL do sobrenadante contendo o DNA extraído para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Amplificação do DNA pela PCR

Os genes 16S dos isolados foram amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais 27Fe 1492R (LANE, 1991). Foram preparadas reações contendo 17 µL de mistura para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciadores, 1 µL de amostra e 1 µL de água ultra pura (*milli-q*), totalizando 20 µL de volume final. A reação foi realizada em um termociclador da marca Amplitherm. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese em fotodocumentador com transiluminação ultravioleta após coloração com Syber Safe (*Invitrogen*®). Os produtos da PCR foram enviados ao Laboratório Helixxa (São Paulo - SP) para purificação e sequenciamento.

O sequenciamento de DNA

Para o ciclo de sequenciamento de DNA utilizou-se o kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing de acordo com instruções do fabricante, juntamente com o oligonucleotídeo iniciador 519r em reações independentes (Helixxa, São Paulo, SP).

Análise genotípica

Quatro genes relacionados à formação de biofilme foram analisados através de PCR para detectar a presença do gene de adesão intercelular A (icaA), gene de adesão intercelular B (icaB), gene de adesão intercelular C (icaC) e gene de adesão intercelular D (icaD) em todos os isolados e um controle positivo de amostra formadora de biofilme, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923. Foi feito a amplificação através do protocolo de PCR com oligonucleotídeos específicos de cada gene.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da avaliação do perfil de DNA genômico a maioria dos isolados foram identificados como patogênicos, conforme Tabela 1. A família Enterobacteriaceae tem como habitat natural o trato gastrointestinal, porém pode vir a ser patogênica dentro ou fora do mesmo. A família Pseudomonadaceae são um grupo de patógenos oportunistas que se encontram principalmente em ambiente hospitalar, são caracteristicamente resistentes a sanitizantes e possuem possível resistência a antimicrobianos. As espécies de *Klebsiella* têm sido responsável por diversos casos de surtos em unidades de internação, causando um tipo grave de pneumonia em humanos. O primeiro surto ocorreu em 2011 nos Estados Unidos, colonizando pelo menos 19 pacientes e causou sete mortes entre pacientes com patologias subjacentes graves, sendo considerada uma super bactéria. Em 2015 duas UTIs Neonatais foram fechadas no Rio Grande do Sul por tempo indeterminado por ter sido constatado a presença de *Klebsiella* no

local (NORDMANN et. al. 2011; SNITKIN et. al. 2012; PAIVA et. al. 2013). Outra espécie encontrada neste estudo, que segundo Pires et al.(2009) vem se destacando ao longo dos anos entre os agentes infecciosos mais frequentemente isolados em ambientes hospitalares é a *Pseudomonas aeruginosa*. Ela dissemina-se facilmente no local, tendo capacidade de melhor adaptação em ambientes úmidos. As infecções causadas por essa espécie, após processos cirúrgicos ou queimaduras podem resultar em bacteremias, podendo ainda infectar qualquer região do corpo em um paciente susceptível.

A capacidade de formação de biofilme dos isolados, analisada *in vitro*, detectou que dos nove isolados analisados, oito foram considerados fracos formadores de biofilme, e um isolado como moderado formador de biofilme, conforme demonstrado na tabela 2. Mesmo que a maioria tenha sido classificado como fraco formador, tendo em vista que foram coletados de utensílios em uma UAN hospitalar, gera um risco eminente ao local. PUFFAL (2013) relata sobre a capacidade de formação de biofilme ser levada em consideração no momento de escolha do tipo de material mais apropriado para ser utilizado no ambiente de uma UAN, bem como quais produtos químicos seriam mais adequados para a correta higienização.

Na análise genotípica em que foram submetidos, os isolados não demonstraram conter a presença de genes marcadores de formação de biofilme. Wojtyczka et al. (2014) confirmaram em seu estudo, dados anteriores apresentados por outros autores, que a presença molecular de genes de *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* no genoma bacteriano está associada com a capacidade de formar biofilmes, porém a ausência desses genes não exclui este fenômeno fenotipicamente.

Tabela 1. Identificação dos isolados pelo sequenciamento do 16S rRNA.

Espécie	Família	Similaridade	Pb*
<i>Enterobacter sp.</i>	Enterobacteriaceae	99%	502
<i>Klebsiella sp.</i>	Enterobacteriaceae	98%	502
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Enterobacteriaceae	99%	500
<i>Enterobacter sp.</i>	Enterobacteriaceae	97%	504
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	99%	499
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	99%	497
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	99%	493
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	100%	176
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	99%	94

* pares de bases

Tabela 2. Classificação de capacidade de formação de biofilme

Espécie	Classificação
<i>Enterobacter sp.</i>	Fraco
<i>Klebsiella sp.</i>	Moderado
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Fraco
<i>Enterobacter sp.</i>	Fraco
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fraco
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fraco
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fraco
<i>Escherichia coli</i>	Fraco
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fraco

4. CONCLUSÕES

A identificação de bactérias potencialmente patogênicas, e a detecção das mesmas em equipamentos da UAN hospitalar, alerta para o alto risco de disseminação destas no ambiente hospitalar. Os resultados deste estudo sugerem que medidas adicionais devem ser tomadas para a higienização das UANs hospitalares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cassettari VC, Silveira IR, Balsamo AC, Franco F. Surto em berçário por *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido atribuído à colonização de profissional de saúde portador de oncomomicose. **Jornal of Pediatrics**, São Paulo, v.82, n.4, p.313-316, 2006.

Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Seattle, v.17, n.4, p.840-862.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard**. Third Edition 28, No. 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA; 2008.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n. 2, p.167-193, 2002.

Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MN (eds) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Wiley: Chichester; 1991.

Ministério da Saúde (BR), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

Pires EJVC, Júnior VVS, Lopes ACS, Veras DL, Leite LE, Maciel MAV. Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. São Paulo, v. 21, n.4, p.: 384-390, 2009.

Puffal J. **Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella enteritidis***. 2013 Mestrado. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Srey S, Jahid IK, Ha SD. "Biofilm formation in food industries: A food safety concern" **Food Control**. v. 31, n.2, p.: 572-585, 2013.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**. v.40, n.2, p. 175-179, 2000.

SENTRY antimicrobial surveillance program, 1998 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47: 3989-3993.

Tortora GJ, Funke BR, **Case CL. Microbiologia**. 8º ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.