

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii*

BEATRIZ BOHNS PRUSKI^{1a}; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA^{2a}; KAMILA FURTADO CUNHA^{2a}; DANIELLE DA SILVA TRENTIN^{2b}; CLÓVIS MOREIRA^{2a}; DAIANE DRAWANZ HARTWIG^{3a}

^{1a}Universidade Federal de Pelotas – biapruski@gmail.com

^{2a}Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com

^{2a}Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

^{2b}Universidade Federal do Rio Grande do Sul – danistrentin@gmail.com

^{2a}Universidade Federal de Pelotas – clovismoreirajr@live.com

^{3a}Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana, embora considerada um fenômeno biológico natural e intrínseco dos microrganismos, tem sido apontada como um dos mais graves problemas de Saúde Pública. Esta capacidade desenvolve-se devido à aquisição e transferência de mecanismos sofisticados entre os patógenos (JONES KE, NIKKITA GP, LEVY MA, et al., 2008). Nas últimas duas décadas, espécies de *Acinetobacter* estão sendo consideradas patógenos emergentes envolvidos na ocorrência de infecções nosocomiais, e dentre elas merece destaque a espécie *A. baumannii* (BROCK PJ, VAN DEN AJ, BERNARDS AT, et al., 2006).

A. baumannii é responsável por surtos de infecções hospitalares repentinos e de difícil controle. As circunstâncias locais das unidades de saúde e seu ambiente determinam o tipo de infecção e, conseqüentemente, o risco de contaminação, costumando afetar principalmente pacientes internados nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). Nestes, causam infecções associadas a dispositivos médicos como, por exemplo, catéteres vasculares, derivações líquóricas e respiradores (RODRIGUEZ-BANO et al., 2008). Sua habilidade de persistir no ambiente hospitalar está relacionada à resistência aos antibióticos, à dessecação, e também à sua capacidade de formar biofilmes (ROBERTS et al., 2001; PELEG et al., 2008; BREIJ et al., 2010).

Os biofilmes bacterianos foram observados associados a dispositivos médicos pela primeira vez em 1980, quando foram visualizadas bactérias depositadas sobre a superfície de dispositivos de longa permanência, como catéteres intravenosos e marca-passos (TOMARAS et al., 2003; HALL-STOODLEY et al., 2004). A formação da camada de biofilme é um processo complexo que envolve a fixação e imobilização dos microrganismos sobre uma superfície, a interação célula-a-célula, a formação de microcolônias e a formação de um biofilme confluyente, com desenvolvimento de uma estrutura tridimensional. A aderência inicial dessa camada geralmente é reversível, de modo que as células podem se afastar da superfície se as condições forem alteradas (NADELL et al. 2009). A importância na formação de biofilme para bactérias envolvidas em infecções, se dá pelo fato delas tornarem-se mais resistentes às defesas imunológicas do organismo e também à ação de antibacterianos (SHANNON et al., 2010).

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno de 9 isolados clínicos de *A. baumannii*,

provenientes de pacientes internados em dois hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, em meio de cultivo com diferentes concentrações de glicose.

2. METODOLOGIA

O protocolo utilizado para os testes de formação de biofilme *in vitro* foi descrito por Schmidt (2009), com adaptações. Foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (8x16) estéreis, permitindo 4 repetições para cada condição testada. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Nove isolados de *A. baumannii* obtidos de dois diferentes hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, foram repicados em ágar Luria Bertani (LB) e incubados à 37°C, por 16-18 h. A partir desse cultivo foi preparado um inóculo de solução estéril de NaCl 0,9% de acordo com a Escala 0,5 de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL), determinando, desta forma, a suspensão bacteriana inicial para cada isolado teste. Após a preparação das suspensões bacterianas, 20 µL de cada suspensão foram transferidos para microplacas, junto com alíquotas de 180 µL de caldo LB suplementado com as seguintes concentrações de glicose: 0,25%; 0,50%; 0,75% e 1%. Foi utilizado também o caldo LB sem suplemento de glicose. Cada tratamento foi testado em 4 repetições para cada amostra. Foi utilizado como controle positivo a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25904 que apresenta capacidade formadora de biofilme, nas mesmas condições descritas acima. Já como controle negativo utilizou-se o mesmo volume de meio de cultivo, acrescido de solução de NaCl 0,9% estéril sem inóculo bacteriano. As microplacas foram incubadas por 24 h à 37°C e, após este período, os conteúdos dos poços foram descartados e estes lavados 3 vezes com solução de NaCl 0,9% estéril. Em seguida foi retirado o excesso de solução das microplacas e adicionados 150 µL de metanol, durante 20 minutos para a fixação do biofilme. As microplacas foram secas por 16-18 h em temperatura ambiente, e então adicionados 200 µL de solução Cristal Violeta 0,5% durante 15 minutos à temperatura ambiente, para corar os poços. Os poços foram lavados posteriormente com água Milli-Q e levemente secos à temperatura ambiente com auxílio de papel absorvente, para a adição de 150 µL de Etanol 95% por 30 minutos.

A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um aparelho de Espectrofotômetro POLARIS EE (Celer Biotecnologia S.A.), com comprimento de onda de 540 nm. A DO₆₃₀ das amostras foi determinada na hora zero (DO₆₃₀ 0h) e nas 24 horas (DO₆₃₀ 24h) de incubação para acompanhar o crescimento bacteriano.

A classificação das amostras quanto à capacidade de formar biofilme foi feita com relação à densidade óptica do controle negativo (DOc). Os biofilmes receberam a classificação de: não produtor de biofilme ($DO \leq DOc$), fraco ($DOc < DO \leq 2 \times DOc$), moderado ($2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$) e forte ($DO \geq 4 \times DOc$) (STEPANOVI et al., 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios de avaliação do crescimento bacteriano, determinado 24 h após a incubação (DO₆₃₀ 24h), observou-se crescimento considerável em relação ao controle negativo (Figura 1) e também em relação à DO₆₃₀ 0h (dados não mostrados). A glicose pareceu interferir de forma positiva no crescimento de alguns isolados.

No estudo para a determinação da formação de biofilme pelos isolados de *A. baumannii*, o ponto de corte da DO₅₄₀ para o teste foi definido como a DO do controle negativo (DOc-) que foi de 0,141. A formação de biofilme dos isolados foi agrupada em não produtor (DO < 0,141), fraco (DO 0,142 à 0,282), moderado (DO 0,283 à 0,564) e forte (DO > 0,565). Todos os 9 isolados de *A. baumannii* avaliados apresentaram-se como fracos produtores de biofilme em todas as concentrações de glicose testadas. A glicose não demonstrou interferência na capacidade formadora de biofilme pelos isolados de *A. baumannii* avaliados, quando comparado ao meio LB sem suplementação de glicose. A influência da glicose no crescimento bacteriano e na formação de biofilme são preocupantes, visto que fluidos corporais como sangue e urina são ricos neste composto, podendo favorecer a progressão da infecção. *S. aureus* ATCC 25904, apresentou perfil moderado de formação de biofilme nas condições testadas neste estudo.

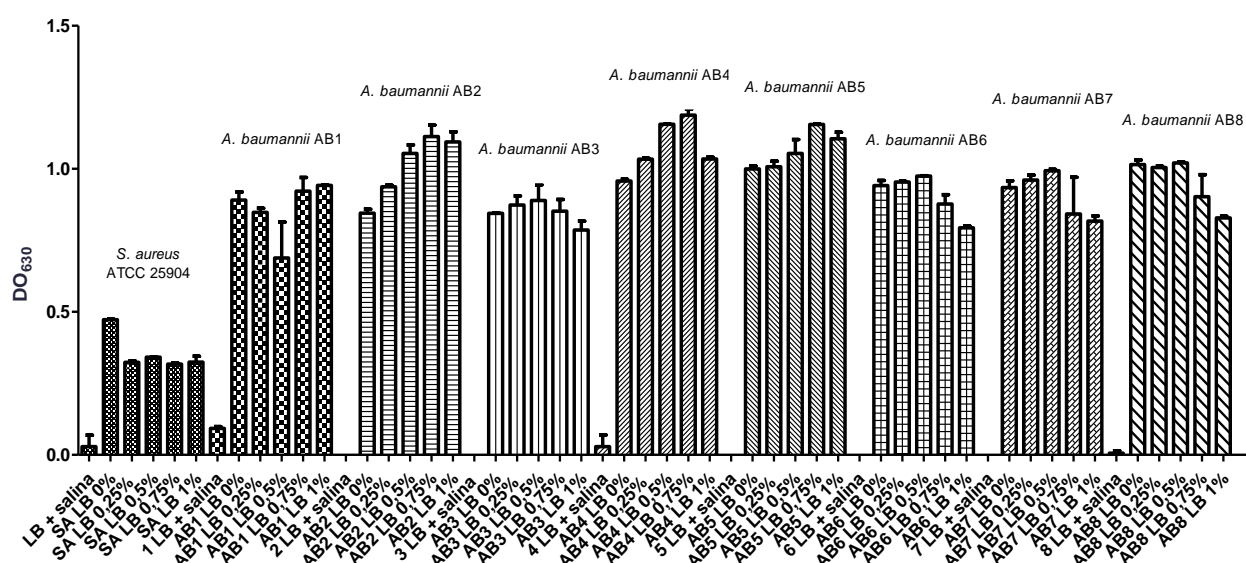


Figura 1: Crescimento bacteriano de 9 isolados clínicos de *A. baumannii* em meio LB suplementado com diferentes concentrações de glicose (0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1%).

A capacidade de formação de biofilme por *A. baumannii* em superfícies plásticas é preocupante, pois o poliestireno é um polímero utilizado na fabricação de vários insumos e equipamentos de uso médico e hospitalar. Os isolados avaliados em nosso trabalho apresentaram fraca capacidade formadora de biofilme. Tomaras et al., 2003 caracterizaram a formação inicial de biofilme por *A. baumannii* em diferentes condições de cultivo e concluíram que esta bactéria forma biofilme em superfícies hidrofóbicas (plásticos) e hidrofílicas (vidros) e cresce em diferentes condições de temperatura, sendo que a capacidade formadora de biofilme é maior em temperaturas de 25-30°C que em 37°C. Nós acreditamos que a temperatura possa ter interferido na capacidade formadora de biofilme dos isolados avaliados em nosso estudo, portanto, novos ensaios serão realizados para melhor determinar quais características de cultivo são determinantes nesta capacidade, além disso, associar o padrão de formação de biofilme de diferentes isolados com genes envolvidos neste processo, como *bla*PER e *bfi*RS.

4. CONCLUSÕES

Dos 9 isolados de *A. baumannii* obtidos de pacientes internados em dois diferentes hospitais da cidade de Pelotas, RS, Brasil, avaliados em nosso estudo, todos apresentaram-se como fracos formadores de biofilme nas condições testadas, além disso, a glicose não pareceu interferir em tal capacidade. Novos ensaios estão sendo realizados com o intuito de caracterizar fatores do cultivo *in vitro*, determinantes na formação de biofilme por isolados clínicos de *A. baumannii*, além disso, a caracterização dos isolados quanto à presença de genes importantes neste processo também é pretendida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIERHALS, C. G. **Análise de formação de biofilme por isolados clínicos e caracterização genotípica do gene *wspR* de *Acinetobacter* spp.** Dezembro de 2010. Trabalho de conclusão de curso – Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BROCK PJ, VAN DEN AJ, BERNARDS AT, et al. **Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001.** Clin Microbiol Infect. 2006;12(9): 837-43.
- DIKSHOORN L, NEMEC A, SEIFERT H. **An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*.** Nature Reviews. 2007;5(12): 939-51.
- HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P 2004. **Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases.** Nature reviews. Microbiology, 2, 95-108.
- JONES KE, NIKKITA GP, LEVY MA, et al. **Global trends in emerging infectious diseases.** Nature. 2008;451(21): 990-4.
- NADELL CD, XAVIER JB, FOSTER KR 2009. **The sociobiology of biofilms.** FEMS microbiology reviews, 33, 206-224.
- RAO RS, KARTHIKA RU, SINGH SP, SHASHIKALA P, KANUNGO R, JAYACHANDRAN S, PRASHANTH K 2008. **Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.** Indian journal of medical microbiology, 26, 333-337.
- ROBERTS, S. A. FINDLAY R, LANG SD. **Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit.** Journal of Hospital Infection, v. 48, n. 3, p. 228-232, 2001.
- RODRIGUEZ-BANO, J., MARTÍ S, SOTO S, FERNÁNDEZ-CUENCA F, CISNEROS JM, PACHÓN J., PASCUAL A., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, MCQUEARY C, ACTIS LA, VILA J. **Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications.** Clinical Microbiology and Infection, v. 14, n. 3, p. 276-278, 2008.
- SHANNON O, MORGELIN M, RASMUSSEN M 2010. **Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis-causing pathogen.** Infection and immunity, 78, 4268-4275.
- STEPANOVI, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J microbiol Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.
- TOMARAS AP, DORSEY CW, EDELMANN RE, ACTIS LA 2003. **Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system.** Microbiology, 149, 3473-3484.