

FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTE INTERNADOS EM HOSPITAL DA CIDADE DE PELOTAS/RS.

BEATRIZ BOHNS PRUSKI¹; DAIANE DRAWANZ HARTWIG²

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas/RS
daianehartwig@gmail.com – biapruski@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento de infecções hospitalares associadas a microorganismos multirresistentes gera intensa necessidade de estudos na área de resistência bacteriana. Sabe-se que esse tipo de infecção é um problema em saúde pública, e na vigência de tratamento mal sucedido são geradas recidivas, podendo ocorrer até a morte do paciente. Um dos gêneros bacterianos comumente isolado em casos de doenças nosocomiais, como pneumonia, infecção urinária e septicemia, é *Klebsiella pneumoniae*, relacionada com as altas taxas de morbimortalidade. Relatos cada vez mais frequentes de surtos hospitalares causados por esse agente justificam sua monitoração no ambiente hospitalar, devido à sua alta resistência e possível formação de biofilme (MEYER, G. et al., 2011).

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 cateteres intravenosos e marca-passos (TOMARAS et al., 2003). A formação da camada de biofilme é um processo complexo que envolve a fixação e imobilização dos microorganismos 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 em 19 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, provenientes de pacientes internados em um hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

2. METODOLOGIA

O protocolo utilizado para os testes de formação de biofilme *in vitro* foi descrito por STEPANOVIC (1999), com adaptações. Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços, sendo realizadas 4 repetições para cada condição testada. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Dezenove isolados de *K. pneumoniae* obtidos de um hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil, foram repicados em *Tryptone Soy Agar* (TSA) e incubados à 37 °C, por 16-18 h. A partir desse cultivo foi preparado um inóculo em 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 *Tryptone Soy Broth*

(TSB) suplementado com as seguintes concentrações de glicose: 0,25%; 0,50%; 0,75% e 1%. Foi utilizado também o meio TSB sem suplemento de glicose. Cada tratamento foi testado em 4 repetições para cada amostra, sendo os ensaios feitos em duplicata. Foi utilizado como controle a cepa *K. pneumoniae* ATCC 00532 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 min 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 min à temperatura ambiente, para corar os biofilmes aderidos aos poços. Os poços foram lavados posteriormente com água e levemente secos à temperatura ambiente com auxílio de papel absorvente, para a adição de 150 µL de etanol 95% por 30 min.

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 (DO_c). Os biofilmes receberam a classificação de: não produtor de biofilme (DO ≤ DO_c), fraco (DO_c < DO ≤ 2xDO_c), moderado (2xDO_c < DO ≤ 4xDO_c) e forte (DO ≥ 4xDO_c) (STEPANOVIC et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a influência da glicose na formação de biofilme em 19 isolados de *K. pneumoniae*. Para a maioria dos isolados a presença de glicose no meio de cultivo influenciou positivamente o crescimento bacteriano (dados não mostrados) e formação de biofilme, sendo a concentração de 1% a que apresentou resultados significativamente diferentes ($P < 0,005$) em relação ao controle sem glicose (Figura 1).

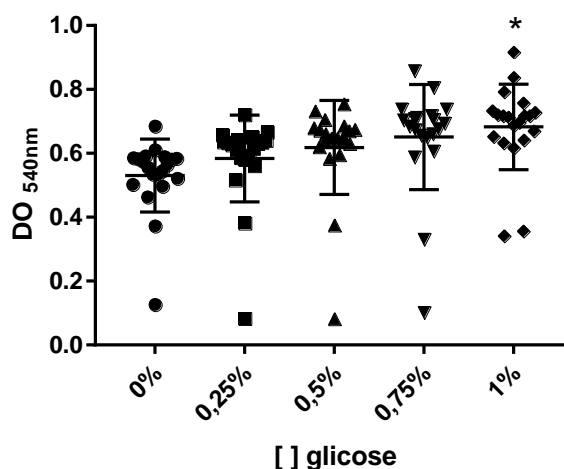


Figura 1: Influência de diferentes concentrações de glicose (0,25; 0,5; 0,75 e 1%) na formação de biofilme em isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Resultados representam a média dos 19 isolados avaliados em dois experimentos independentes. * $P < 0,005$ em relação ao cultivo sem adição de glicose ao meio.

O desenvolvimento de biofilme foi determinado nos isolados clínicos de *K. pneumoniae* através da medida da absorbância (540 nm) da biomassa bacteriana. Três isolados (KB6, KB9 e KB11) produziram mais biomassa no biofilme que o controle (*K. pneumoniae* ATCC 00532) ($P < 0,001$), em comparação, 13 isolados apresentaram menor quantidade de biomassa (Figura 2).

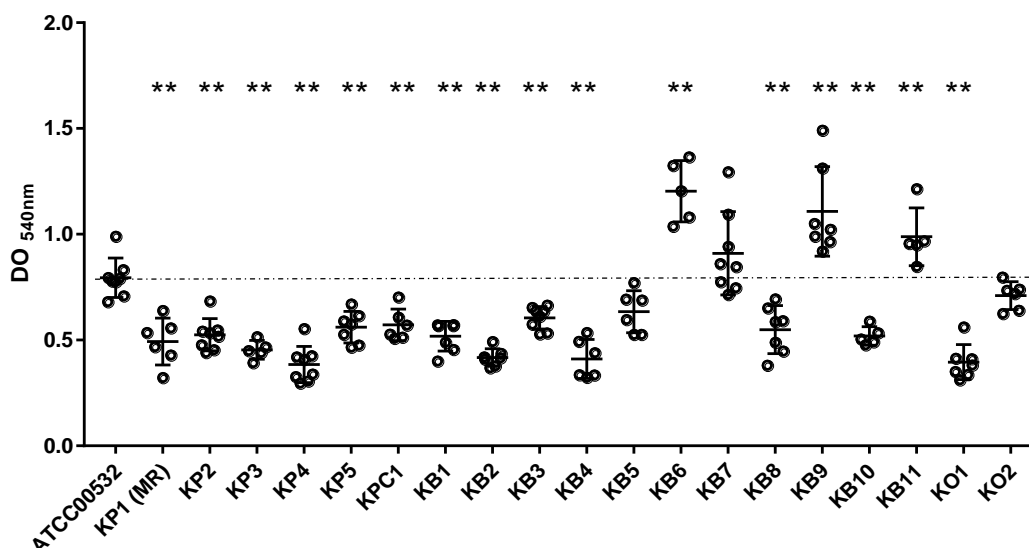


Figura 2: Avaliação da formação de biofilme em diferentes isolados clínicos de *K. pneumoniae* em meio de cultivo acrescido de 1% de glicose. Resultados representam a média de dois experimentos independentes. ** $P < 0,001$ comparado a absorbância apresentada por *K. pneumoniae* ATCC 00532.

Tabela 1: Classificação da formação de biofilme bacteriano através do método de microplacas de poliestireno utilizando cristal violeta.

Isolado	Formação de biofilme	Isolado	Formação de biofilme
ATCC 00532	Moderado	KB4	Fraco
KP1 (MR)	Fraco	KB5	Moderado
KP2	Fraco	KB6	Moderado
KP3	Fraco	KB7	Moderado
KP4	Fraco	KB8	Fraco
KP5	Fraco	KB9	Moderado
KPC1	Fraco	KB10	Fraco
KB1	Fraco	KB11	Moderado
KB2	Fraco	KO1	Fraco
KB3	Moderado	KO2	Moderado

De acordo com o método avaliado, a produção de biofilme revelou 40% dos isolado como moderados formadores e 60% como fracos formadores de biofilme

(Tabela 1). Neste estudo, nenhum dos isolados apresentou-se como forte formador de biofilme, assim como, não houveram não-formadores.

Resultados semelhantes foram obtidos por CAMPOS et al., 2016, avaliando 30 isolados de *K. pneumoniae* que mostraram-se na maioria fracos formadores e na minoria moderados formadores. No mesmo estudo, foi observado que a relação genética entre os isolados demonstrou possível associação com a formação de biofilme. A utilização da glicose revelou uma das possíveis condições nutricionais e ambientais envolvidas na formação do biofilme. A alta disponibilidade de nutrientes com fonte de carbono, como a glicose, permite maior crescimento e multiplicação das cepas e, consequente estabelecimento do biofilme microbiano. Além disso, pesquisas recentes mostraram que as cepas de *K. pneumoniae*, particularmente de origem nosocomial, possuem vários elementos genéticos, que conferem resistência a classes de antimicrobianos, e aliado a estes elementos, a presença de fatores de virulência e a capacidade de formar biofilme podem contribuir para o surgimento e propagação desses microorganismos no ambiente hospitalar, sendo a formação do biofilme essencial não apenas para a sobrevivência no meio ambiente, mas também para a infecção bem sucedida (LIVERMORE, D.M. 2012; NAPARSTEK, L. et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Os 19 isolados de *K. pneumoniae* obtidos de pacientes internados em hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil, avaliados em nosso estudo, apresentaram-se como moderados a fracos formadores de biofilme nas condições testadas, e a glicose 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 *Klebsiella*, além disso, a caracterização dos isolados quanto à presença de genes importantes neste processo também é pretendida.

5. REFERÊNCIAS

- CAMPOS, P.A.; ROYER, S. et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Springer Science + Business Media New York**, v.10, n.1007, 2016.
- LIVERMORE, D.M. Fourteen years in resistance. **Int. Journal Antimicrob Agents**, v.39, p. 283-294, 2012.
- MEYER, G.; PICOLI, S.U. Fenótipos de betalactamases em *K. pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Bras Patol Med Lab**, Brasil, v.47, n.1, p.25-31, 2011.
- NADELL, C.D.; XAVIER, J.B.; FOSTER, K.R. The sociobiology of biofilms. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, n.1, p.206-224, 2009.
- NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; NAVON-VEENZIA, S. et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *K. pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.10, n.69, p.1027-1034, 2014.
- SHANNON, O.; MORGELIN, M.; RASMUSSEN, M. Platelet activation and biofilm formation by *Aerococcus urinae*, an endocarditis-causing pathogen. **Infection and Immunity**, v.78, n.10, p.4268-4275, 2010.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, n.2, p.175-179, 2001.
- TOMARAS, A.P.; DORSEY, C.W.; EDELMANN, R.E.; ACTIS, L.A. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v.149, n.12, p.3473-3484, 2003.