

## ***Klebsiella pneumoniae*: CAPACIDADE FORMADORA DE BIOFILME IN VITRO EM ISOLADOS MULTIRRESISTENTES**

**STELLA BUCHHORN DE FREITAS<sup>1</sup>; LETÍCIA ROLOFF STALLBAUM<sup>2</sup>; BEATRIZ BOHNS PRUSKI<sup>2</sup>, SUÉLEN CAVALHEIRO AMARAL<sup>3</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS – stellafreitas@gmail.com

<sup>2</sup> Graduação em Farmácia, CCQFA, UFPel, Pelotas/RS - leticia-sls@hotmail.com;  
biapruski@gmail.com

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, CDTec, UFPel, Pelotas/RS -  
suelen\_ca@hotmail.com

<sup>4</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas/RS -  
daianehartwig@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

Bactérias oportunistas da espécie *Klebsiella pneumoniae* compreendem um grupo de patógenos associados a quadros de infecções em unidades de terapia intensiva (UTIs) que afetam, principalmente, indivíduos imunocomprometidos, resultando em casos graves de infecções urinárias, respiratórias, em ferimentos e sangue (MICROBIOLOGY & ADVANCE, 2016). Nas últimas décadas, o aumento na incidência de cepas de *K. pneumoniae* multidroga-resistentes é considerado um problema de espectro global, tornando-se responsável pelo aumento das taxas de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados (DE CAMPOS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2011).

Esses perfis de resistência foram, inicialmente, atribuídos à síntese de enzimas  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (ESBL), as quais conseguem hidrolisar uma série de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como uma ampla variedade de penicilinas e cefalosporinas de terceira geração (OLIVEIRA et al., 2011). Como alternativa terapêutica, os antibióticos da classe dos carbapenêmicos tem sido amplamente utilizados no tratamento de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, uma vez que estes agentes são altamente estáveis para a hidrólise por  $\beta$ -lactamases. Contudo, o crescente aumento de cepas resistentes a esta classe de antibióticos vem contribuindo para geração de problemas clínicos e complicações no tratamento dessas infecções (MICROBIOLOGY & ADVANCE, 2016). A resistência aos carbapenêmicos tem sido atribuída, principalmente, a produção de enzimas carbapenemases, mutação de genes responsáveis pela síntese de porinas e a regulação positiva para mecanismos de bombas de efluxo (VUOTTO et al., 2017).

A capacidade formadora de biofilme em *K. pneumoniae* é outro fator de relevância clínica, interferindo de forma significativa no sucesso da terapêutica. Biofilmes bacterianos auxiliam na proteção do patógeno contra as defesas imunológicas do hospedeiro e da ação de moléculas com atividade antibiótica, bem como, atuam facilitando a aderência à superfícies de dispositivos médicos e permanência nos tecidos epiteliais (VUOTTO et al., 2017).

Diante disso, o presente trabalho objetivou a identificação dos perfis de resistência de 12 isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Além disso, objetivou-se avaliar os isolados quanto a sua capacidade formadora de biofilme através do ensaio em microplaca e Ágar vermelho-congo.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Isolados clínicos e de referência

Foram utilizados neste estudo 12 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, fornecidos pelo Laboratório Escola da Universidade Federal de Pelotas (HE-UFPEL, Pelotas, RS, Brasil) e previamente identificados pelo sistema automatizado VITEK 2 (BioMerieux). Os isolados foram conservados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI-DIFCO) acrescido de 20% (v/v) de glicerol e armazenados sob temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC25922, proveniente da autoridade depositante norte-americana *American Type Culture Collection* (ATCC), foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### 2.2. Perfil de sensibilidade aos antibacterianos

Treze antibacterianos, incluindo os carbapenêmicos Imipenem e Meropenem, foram utilizados para análise dos perfis de sensibilidade dos isolados através do método de disco difusão em Ágar Mueller-Hinton (Sigma-Aldrich), segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para tal, discos de papel-filtro, impregnados com antimicrobianos, foram dispensados sobre as placas contendo semeadura de inóculo bacteriano correspondente a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Cada isolado foi testado separadamente com cada um dos antibacterianos mencionados em diferentes concentrações pré-estabelecidas e as placas foram incubadas por 18h à  $37^{\circ}\text{C}$ . Os testes foram realizados em triplicata e os isolados foram caracterizados como sensíveis, intermediários ou resistentes conforme os diâmetros dos halos de inibição.

### 2.3. Ensaio de formação de biofilme em microplaca

A capacidade de formação de biofilme dos isolados foi analisada conforme protocolo descrito por MOSKOWITZ et al (2004) com adaptações. Suspensões bacterianas, correspondentes a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) a partir de cultivos prévios. Placas de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades foram preenchidas com a suspensão em diluição de 1:10 em caldo BHI suplementado com glicose em diferentes concentrações (0%, 0,25%; 0,50%; 0,75% e 1%). As microplacas foram incubadas por 24h à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  e, após esse período, as cavidades foram lavadas com solução salina estéril. Após 20 minutos de fixação do biofilme com metanol, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 16-18h e o cristal violeta 0,5% foi adicionado. Após 15 minutos, as cavidades foram lavadas com água MiliQ e mantidas sob temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, etanol 95% foi adicionado às cavidades e mantidos por 30 min. Como controle negativo, utilizou-se uma solução salina 0,9% diluída na proporção 1:10 em meio BHI suplementado. Para análise dos resultados, verificou-se a densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos formados e aderidos às cavidades. A leitura da DO foi realizada com o auxílio do Espectrofotômetro POLARIS EE (Celer Biotecnologia S.A.), com comprimento de onda de 540 nm. Quanto a capacidade de formação de biofilme, os isolados foram classificados como não produtor de biofilme ( $\text{DO} \leq \text{DOc}$ ), fraco ( $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2\text{DOc}$ ), moderado ( $2\text{DOc} < \text{DO} \leq 4\text{DOc}$ ) e forte ( $\text{DO} \geq 4\text{DOc}$ ).

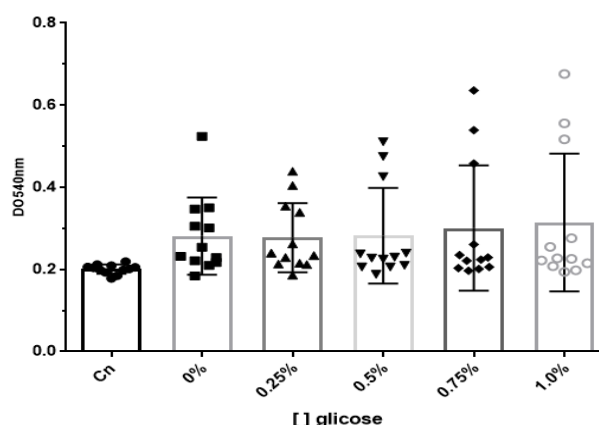
## 2.4. Ágar vermelho-congo

A análise fenotípica de formação de biofilme foi realizada a partir do teste do Ágar vermelho-congo, desenvolvido por FREEMAN et al (1989) que constitui em um meio de cultivo composto de Ágar BHI 37g/L, solução de sacarose 50g/L, ágar 10g/L e corante vermelho congo 0,8g/L. Os isolados foram semeados sobre o meio pelo método de esgotamento com alça de platina e as placas foram incubadas por 24h à 37°C e, posteriormente, sob temperatura ambiente por mais 18h. A análise dos resultados foi realizada com base na coloração das colônias, onde os isolados que apresentaram colônias cinzas a negras foram considerados positivos para formação de biofilme, enquanto os isolados cujas colônias mostraram-se vermelhas foram considerados negativos. Uma cepa *E. coli* ATCC25922 foi utilizada como controle negativo.

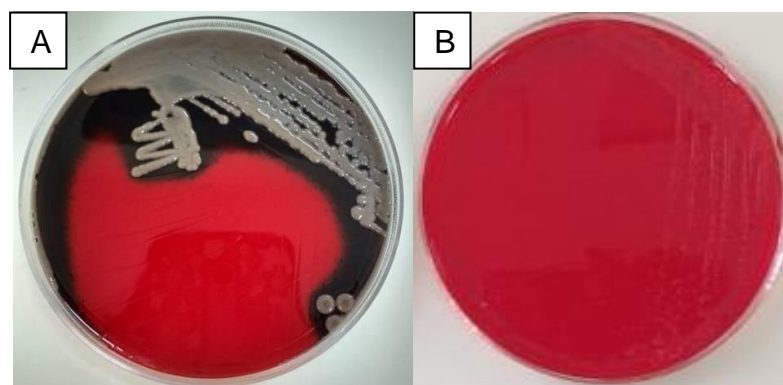
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao perfil de sensibilidade aos antibacterianos, 79% dos isolados apresentaram-se resistentes ao Imipenem, enquanto 83% apresentaram-se resistentes ao meropenem. Na classe dos betalactâmicos, observou-se 100% dos isolados como resistentes à ampicilina e às cefalosporinas (Cefalotina e Cefoxetina). A resistência aos antibacterianos Amoxicilina/Clavulanato, Ampicilina/Sulbactam e Ceftriaxona foi observada em 96% dos isolados. Para Cefepime, Ciprofloxacino, Levofloxacino e Amicacina os perfis de resistência foram de 88%, 92%, 88% e 54%, respectivamente.

Conforme resultados da análise estatística para a formação de biofilme, não houve diferença significativa quanto às diferentes concentrações de glicose utilizadas no ensaio (Figura 1). Segundo os critérios qualitativos descritos por STEPANOVIC` et al., 2007, nenhum dos isolados foi classificado como forte formador de biofilme, 33,3% foram classificados como moderados, 58,4% foram definidos como fracos formadores e 8,3% foram considerados como não formadores. No ensaio do Ágar vermelho-congo, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram colônias de coloração característica com formação de pigmento negro, evidenciando a formação de biofilme pelos isolados (Figura 2).



**Figura 1:** Capacidade dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* formarem biofilme em superfície de poliestireno. DO<sub>540nm</sub> expressa a biomassa de biofilme corada pelo cristal violeta para cada isolado clínico. Cada ponto na figura corresponde à média das triplicatas de três experimentos independentes. Cada coluna representa a média ± desvio padrão. Cn – controle negativo; 0-1,0% de glicose.



**Figura 2:** (A) Isolado clínico de *K. pneumoniae* em Ágar Vermelho-Congo. A formação de colônias com fundo negro indicam a formação de biofilme. (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada como controle negativo para o teste. A formação de colônias vermelhas indica a ausência de formação de biofilme.

#### 4. CONCLUSÕES

Todos os 12 isolados analisados apresentaram-se como multidroga-resistentes (MDR), demonstrando resistência às 5 classes de antimicrobianos analisadas: aminoglicosídeos, carbapenêmicos,  $\beta$ -lactâmicos, cefalosporinas e fluoroquinolonas. Os isolados apresentaram-se, em sua grande maioria, como fracos ou moderados formadores de biofilme nos ensaios em microplacas, sendo as concentrações de glicose do meio um fator não interferente na formação do biofilme pelos isolados. No ensaio em placas de Petri (Ágar vermelho-Congo) todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentaram-se perfil positivo para a formação de biofilme. A associação de mecanismos de resistência e formação de biofilme são fatores de extrema importância para o favorecimento da persistência desses patógenos no ambiente hospitalar e nos hospedeiros, dificultando a terapêutica. Diante disso, torna-se necessária a aplicação de medidas preventivas para evitar a contaminação dos ambientes e disseminação dessas cepas, bem como a pesquisa por novos fármacos capazes de ultrapassar os mecanismos de resistência desenvolvidos por esses patógenos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- DE CAMPOS, P. A., et al. (2016). Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Current Microbiology**, 72(5), 617–627.
- MICROBIOLOGY, F., & ADVANCE, L. (2016). **FEMS Microbiology Letters Advance** Access published January 10, 2016, 1–38.
- OLIVEIRA, C. B. S. De, DANTAS, V. C. R., NETO, R. M., AZEVEDO, P. R. M. De, & MELO, M. C. N. De. (2011). Frequência e perfil de resistência de *Klebsiella* spp. em um hospital universitário de Natal / RN durante 10 anos. **J Bras Patol Med Lab**, 47(6), 589–594.
- VUOTTO, C., LONGO, F., PASCOLINI, C., DONELLI, G., BALICE, M. P., LIBORI, M. F., & TIRACCHIA, V. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **J Appl Microbiol**, 1003–1018.