

PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Klebsiella pneumoniae* EM CATETER DE USO HOSPITALAR

DANIELA RODRIGUERO WOZEAK¹; DAIANE DRAWANZ HARTWIG³

¹Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – daiane.hartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto por 17 espécies, com algumas de importância etiológica em infecções hospitalares (LPSN, 2019). Nestes ambientes, o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, produz pressão seletiva que favorece a proliferação de cepas multirresistentes (CANDAN; AKSOZ, 2015). *Klebsiella* spp. apresentam cápsula polissacarídica e fímbrias, estruturas que auxiliam na aderência às mucosas do trato respiratório e geniturinário do hospedeiro, locais comuns de infecção em humanos (RYAN et al., 2010). Além disso, são caracterizadas por serem tanto aeróbias quanto anaeróbias, não produzirem esporos, fermentarem lactose, positivas para catalase e pouco exigentes nutricionalmente (MURAY, 2014). As principais espécies representantes deste gênero são *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* e *K. ozaenae*.

Podemos destacar os mecanismos de resistência encontrados no grupo, como a expressão de β-lactamases, resistência a carbapenêmicos, que fazem com que os fármacos percam sua eficiência terapêutica (YANG et al., 2008). *K. pneumoniae* produtora de carbapemase (KPC) é uma bactéria resistente a múltiplas drogas, com elevado custo de tratamento e alta taxa de mortalidade. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos têm alta prioridade e requerem novos antibióticos, com urgência (OMS, 2017). Nos casos de resistência aos carbapenêmicos o antimicrobiano de escolha é a polimixina B. As polimixinas foram amplamente utilizadas até a década de 80, quando foram abandonadas devido a sua alta toxicidade. Nos últimos anos, estão sendo reintroduzidas na terapêutica como droga de último recurso, para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, como *K. pneumoniae* KPC (KASSAMALI, et al., 2015).

Grande parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não com as células individualizadas, livres, em suspensão, mas sim com as células bacterianas organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a superfícies diversas, geralmente compondo um biofilme. A associação dos organismos em biofilme é uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (IST, 2008). Biofilmes são arranjos multicelulares complexos capazes de formar um bloqueio, funcionando como barreira protetora, podendo ser composto por diversas espécies bacterianas ligadas entre si por uma matriz extracelular.

Esses conjuntos são capazes de expulsar antimicrobianos e ainda, capturar nutrientes para as células dentro desta proteção (RYAN et al., 2010).

Em ambientes hospitalares, o biofilme está frequentemente associado às infecções crônicas pois resistem ao sistema imune do hospedeiro, tornando-as de difícil tratamento e ainda elevam taxas de resistência a antimicrobianos e desinfetantes (CANTON & MOROSINI, 2011). Ainda, biofilmes propiciam a adesão de micro-organismos à superfície dos cateteres, de uma forma que dificulta sua remoção (TERNAVASIO et al., 2016), ainda, os biofilmes constituem o principal fator de risco para IRAS (Infecção Relacionada à Assistência à Saúde), estimando-se que cerca de 65% a 80% das infecções relacionadas a dispositivos invasivos estejam associadas à sua presença (TENKE et al., 2012). Segundo Dohnt et al. (2011) quando em cateteres, biofilmes são considerados importantes fatores que conduzem a tratamentos prolongados, de custos elevados e altas taxas de mortalidade.

Diante disto, torna-se importante o estudo de um método de detecção da formação de biofilmes em dispositivos hospitalares utilizados nos pacientes internados, uma vez que o gênero *Klebsiella* tem diversos fatores de virulência que auxiliam na formação, fixação e permanência do biofilme nestes indivíduos.

2. METODOLOGIA

Os isolados de *K. pneumoniae* KPC utilizados neste estudo foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia, do Centro de Especialidades do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas, e compõem a bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos. Foram utilizados 2 isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC para a realização dos experimentos, além de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

A padronização deste método, foi baseada em Peralta et al. (2015). Assim, os micro-organismos foram cultivados em Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados por 24h à 37°C. Logo, uma diluição na escala 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL⁻¹) foi feita para preparo do inóculo. Corpos de prova foram confeccionados com cateteres esterilizados, com 1cm de comprimento e encaixados nos poços de placas de 24 cavidades, de modo que ficasse suspensos no meio de cultivo. Com os corpos de prova suspensos, foram adicionados 1,8 mL de Caldo BHI, seguidos de 180 µL de inóculo bacteriano e um poço sem inóculo, para fins de verificação da esterilidade do meio. O material foi incubado a 37°C e amostras formam retiradas com diferentes tempos de incubação (24h, 48h e 72h). Para investigar o melhor método de desprendimento do biofilme dos cateteres, foram analisados 4 métodos: agitação com vortex por 30 segundos, sonicação por 1 minuto a 120 Watts, sonicação por 1 minuto a 120 Watts seguida de agitação por vortex e uma amostra sem nenhum método de desprendimento. Após, foram feitas diluições seriadas 1:10 em solução salina estéril 0,9%, até a ordem 10^{-7} e logo 10 µL de cada diluição foram inoculados, por método de espalhamento, em Ágar MacConkey e as placas levadas para a estufa por 16-18h a 37°C. Ao final do período de incubação foram verificadas as diluições

com crescimento entre 30 e 300 colônias e feita a contagem das colônias, expressando-as em UFC/mL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visto que o presente trabalho está em seu início, encontra-se na etapa de contagem bacteriana. Em tal etapa, verificou-se que o melhor tempo de incubação é 24h, após esse período a contagem começa a diminuir. As diluições 10^{-1} à 10^{-4} ultrapassaram o limite de 300 colônias, apresentando um número ≥ 300.000 UFC/mL, em todos os métodos de despreendimento do biofilme. As diluições 10^{-5} e 10^{-6} apresentaram contagens dentro dos limites, entre 30 e 300 colônias com resultados descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Média das contagens de colônias de *K. pneumoniae* nas diluições 10^{-5} e 10^{-6} após 24h de incubação, expressas em UFC/mL.

	10^{-5}	10^{-6}
Não	0,051	0,0033
Vor	0,143	0,0086
Son	0,122	0,0071
V + S	0,109	0,0069

Não: sem método de despreendimento; Vor: utilização de Vortex; Son: utilização de sonicador; V + S: utilização de vortex seguido de sonicação.

A diluição mais baixa, 10^{-7} não apresentou crescimento bacteriano. Dentro deste estudo, ainda espera-se avaliar a formação de biofilme em isolados clínicos de *K. pneumoniae* KPC em placas de poliestireno e estabelecer uma metodologia satisfatória de avaliação desta formação em cateter. Além disso, a avaliação da influência deste biofilme na eficiência da terapêutica alternativa com polimixina B.

4. CONCLUSÕES

Observando os resultados de contagens, pode-se concluir que as melhores diluições a serem utilizadas neste estudo são 10^{-5} e 10^{-6} , pois estão dentro dos limites estabelecidos pelo método. Também, este estudo tem relevância científica pois permitirá um melhor entendimento da influência da formação de biofilme em isolados clínicos e a implicação disso na terapêutica, além disso, permitirá o desenvolvimento de ensaios futuros na busca de um meio de evitar a formação de biofilme em cateteres, e por consequência a implantação de comunidades bacterianas em pacientes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANDAN, Esra Deniz; AKSÖZ, Nilüfer. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochimica Polonica**. v. 62, n. 4, p. 867-874, 2015.

CANTÓN, R. et al. IRT and CMT- lactamases and inhibitor resistance. **Clinical Microbiology and Infection.** n. 14, p. 53–62, 2008.

DOHNT K., et al. An in vitro urinary tract catheter system to investigate biofilm development in catheter-associated urinary tract infections. **Journal of Microbiology Methods.** n. 87, p. 302-308. 2011.

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. Crescimento microbiano em biofilmes. Publicado em 18/11/2005, Revisto em 03/04/2008. Disponível em: < <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=354> >. Acesso em: 1º maio 2019.

KASSAMALI, Z.; JAIN, R.; DANZIGER, L. H. An Update on the arsenal for multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: Polymyxin antibiotics. **International Journal of Infectious Diseases**, v.30, p. 125-132, 2015.

LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2019. Disponível em <<http://www.bacterio.net/klebsiella.html>>. Acesso em: 04 jun. 2019.

MURRAY, P., ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil. 2015.

Organização Mundial de Saúde. Priorização de patógenos para orientar a descoberta, pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para infecções bacterianas resistentes as drogas. Genebra. 2017.

PERALTA, S.L.; COCCO, A.R.; LUND, R.G. Comparison of growth of viable oral bacteria and *Streptococcus mutans* in biofilm models using three different culture media. **African Journal of Microbiology**, v. 9, n.6, p. 388-393, 2015.

TERNAVASIO-DE LA VEGA H.G. et al. Assessment of a multi-modal intervention for the prevention of catheter-associated urinary tract infections. **Journal of Hospital Infection**. n. 94, p. 175-181. 2016.

TENKE P., et al. Update on biofilm infections in the urinary tract. **World Journal of Urology**. n. 30, p 51-57. 2012.

WATNICK P, KOLTER R. Minireview: Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 182, n. 10, p. 2675 – 2679. 2000.

YANG, H, CHEN, H, YANG, Q, CHEN, M, WANG, H. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes *qnr* and *aac(6')-lb-cr* in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Nine Teaching Hospitals in China. **Antimicrobial Agents chemotherapy**. n. 52, p. 4268-73. 2008.