

## **CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*: ESTUDO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE PACIENTES HOSPITALIZADOS EM PELOTAS - RS**

JOÃO LUCAS XAVIER TEIXEIRA<sup>1</sup>; DANIELA RODRIGUERO WOZEAK<sup>2</sup>; ISABEL LADEIRA PEREIRA<sup>3</sup>; THAYNÁ LANER CARDOSO<sup>4</sup>; DAIANE DRAWANZ HARTWIG<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – joalteixeiraxavier@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – danielarwozeak@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – isabelladeirapereira@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - nanalaner@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

*Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria gram-negativa, encapsulada e imóvel. Importante agente causador de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), frequentemente associado a quadros graves e à resistência a múltiplos antimicrobianos (LIU et al., 2018). Ainda, é amplamente reconhecida como um microrganismo oportunista, estando entre os patógenos mais comuns no mundo (HOLT et al., 2023). Comumente associada a infecções em ambientes hospitalares, é frequentemente responsável por quadros de pneumonia e infecções em feridas, tecidos moles e do trato urinário (HOLT et al., 2023). Além disso, infecções por *K. pneumoniae* são altamente preocupantes entre neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, podendo também provocar infecções adquiridas na comunidade, como abscessos hepáticos piogênicos, meningite e pneumonia (HOLT et al., 2015).

Reconhecida por sua capacidade de formar biofilmes — estruturas complexas formadas por comunidades microbianas aderidas a superfícies e envoltas por uma matriz polimérica extracelular — essa bactéria organiza-se em comunidades bacterianas envoltas por uma matriz composta por proteínas, exopolissacarídeos, lipopeptídeos e DNA. Os biofilmes garantem maior adesão a superfícies, proteção física e química para as bactérias presentes em seu interior, dificultando a ação do sistema imunológico e de antimicrobianos (BESSA et al., 2023). Diante disso, essa condição favorece a sobrevivência das bactérias no interior da matriz, mesmo em ambientes hostis. Como consequência, há um aumento significativo da resistência antimicrobiana, o que contribui para infecções persistentes e torna o tratamento clínico mais complexo e menos eficaz (VUOTTO et al., 2017).

Tendo em vista o contexto destacado, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilmes por isolados clínicos de *K. pneumoniae* obtidos de pacientes hospitalizados em Pelotas, RS, Brasil.

### **2. METODOLOGIA**

Vinte e oito isolados clínicos de *K. pneumoniae*, coletados entre 2015 e 2017, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital Escola (UFPeI) e analisados no Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios (LaBBio - UFPeI) foram utilizados nesta pesquisa. Para avaliar a capacidade de formação de biofilmes foram feitas análises *in vitro* e fenotípicas. A análise *in vitro* foi realizada com base no método descrito por STEPANOVIC et al. (2000). Utilizou-se placas de poliestireno de 96 poços e fundo chato, com ensaios realizados em triplicata. Os isolados foram

padronizados pela escala 0,5 MacFarland ( $\sim 10^8$  UFC/mL). Logo, foram adicionados 20 $\mu$ l da suspensão bacteriana e 180 $\mu$ l de caldo triptona de soja (TSB) nos poços, e as placas foram incubadas a 37°C/24 horas. A cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC® 25904™ foi usada como controle positivo e solução salina estéril como controle negativo. Após a incubação, os poços foram lavados, fixados com metanol (20 minutos), secos, corados com cristal violeta 0,15% (15 min), lavados novamente e solubilizados com etanol 95% (30 min). Os resultados foram observados em espectrofotômetro a partir da análise de densidade óptica (DO) em um comprimento de onda de 540nm. O perfil de formação dos biofilmes foi determinado de acordo com CHRISTENSEN et al. 1985. Para a análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8 por meio dos testes *one-way* ANOVA e Dunnett, com nível de significância de  $p < 0,0001$  e  $p < 0,05$ .

As análises fenotípicas foram feitas pelo método do ágar vermelho congo (FREEMAN, 1989). Foi utilizado meio de cultura composto por caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (37 g/L), sacarose (50 g/L), ágar (10 g/L) e corante Vermelho-Congo (0,8 g/L). As placas foram inoculadas e incubadas a 37°C/24h. A interpretação foi feita com base na coloração das colônias, onde: colônias pretas indicaram a produção de *slime* e, colônias esbranquiçadas ou rosadas indicaram resultado negativo, como controle negativo foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC® 25922™.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme indicado pelas medidas espectrofotométricas do ensaio de cristal violeta, todos os vinte e oito isolados clínicos formaram biofilmes (Figura 1). A leitura da densidade óptica a 540 nm evidenciou variabilidade na densidade de biomassa aderida, refletindo diferenças no desempenho adesivo e na produção de matriz extracelular entre as cepas. Com base nos critérios estabelecidos por CHRISTENSEN et al. (1985), uma fração expressiva dos isolados foi categorizada como forte formadora de biofilme (27 isolados), enquanto apenas um isolado apresentou classificação moderada de formação de biofilmes. Por meio da aplicação de *one-way* ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett, foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

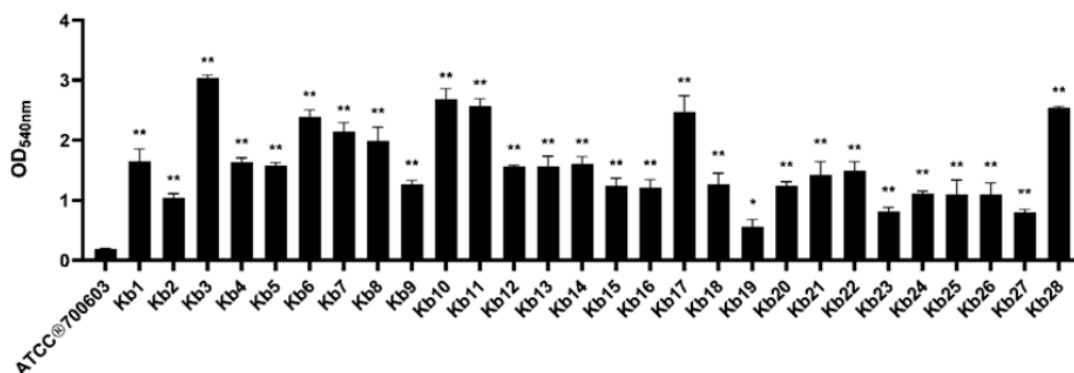


Figura 1 - Quantificação de biofilme para isolados de *K. pneumoniae* e cepa padrão ATCC® 700603. O biofilme formado em placas de poliestireno foi corado com cristal violeta e quantificado pela leitura de DO<sub>540 nm</sub>. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

O ensaio em ágar vermelho Congo possibilitou a identificação qualitativa da produção de componentes extracelulares associados à matriz biofilme. Observou-se que a todos os isolados apresentaram colônias de coloração preta, indicativa da produção de *slime*, enquanto o controle negativo apresentou crescimento de tonalidades rosada, indicando a não produção de *slime* (Figura 2) (WOZEAK et al., 2024). A expressiva ocorrência de colorações escuras entre os isolados avaliados reforça os resultados quantitativos, evidenciando a capacidade dessas cepas em produzir matriz extracelular associada à adesão bacteriana.

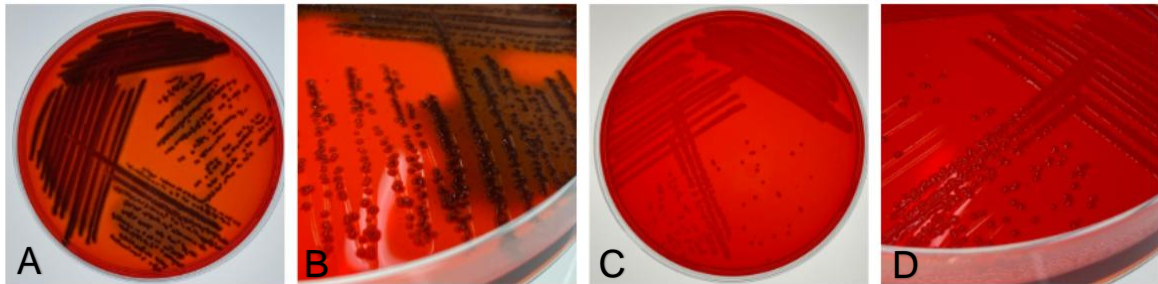


Figura 2 - Teste de Ágar Vermelho Congo. A e B: colônias escuras, indicando produção de *slime*. C e D: colônias rosadas de cepa não produtora de *slime*

A ampla prevalência da formação de biofilme entre os isolados analisados destaca a relevância clínica desse mecanismo de virulência. Essa estrutura bacteriana tridimensional proporciona proteção contra agentes antimicrobianos e as defesas do hospedeiro, dificultando a eliminação da infecção, especialmente em ambientes hospitalares (VUOTTO et al., 2017; STEWART & COSTERTON, 2001). Este comportamento reforça o papel da *K. pneumoniae* como patógeno oportunista de significativa importância clínica, evidenciando a necessidade de estudos detalhados sobre seu perfil de virulência em distintos contextos epidemiológicos (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir das vinte e oito amostras clínicas de *K. pneumoniae* apontaram forte capacidade de formação de biofilmes, evidenciada por abordagens quantitativas e fenotípicas. A adesão celular e a produção de matriz extracelular observadas confirmam esse mecanismo como um relevante fator de virulência. Esses dados reforçam a necessidade de investigações contínuas sobre os determinantes patogênicos dessas cepas, especialmente diante de sua implicação em infecções persistentes no ambiente hospitalar.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 996–1006, 1985.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 872–874, 1989.

HOLT, K. E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **PNAS**, p. 3574 - 3581, 2015

HOLT K. E.; WERTHEIM H.; ZADOKS R. N. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 112 n. 27, 2015.

LIU, P. et al. Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection: A Meta-Analysis. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 2, p. 190–198, 2018.

PODSCHUN R.; ULLMANN U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603, 1998.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

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**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, p. 135–138, 2001.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; BALICE, M. P.; DONELLI, G.; VARALLO, F. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003–1018, 2017.

WOZEAK, D. R. et al. Genetic diversity, drug resistance, and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* associated with nosocomial infection in Pelotas, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–15, 2024.