

AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*

MIRIAN ELERT DA SILVA¹; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA²; DÉBORAH TROTA FARIAS DE ALBERNAZ³; RODRIGO YUDI ISHIKAME⁴; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – mirian.elert@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – marcelle_garcia@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – debstrota@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rodrigo_y_i@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas representam um grande desafio para a saúde pública, causando significativa morbimortalidade em hospitais no mundo todo. Um fato que agrava a situação é o surgimento de cepas que apresentam resistência a uma ampla gama de antimicrobianos (VÁZQUEZ-LÓPEZ, et al 2020).

Um dos fatores que contribuem para essa resistência é a capacidade de formar biofilme, que pode ser apresentada por diversos micro-organismos, incluindo as bactérias das espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (THUMEEP R. et al., 2018; MAURICE et al., 2018). Biofilmes são comunidades bacterianas ligadas a uma superfície e incorporadas à uma matriz extracelular, que torna as bactérias menos suscetíveis aos antimicrobianos, e à morte por mecanismos imunológicos do hospedeiro (DEL POZO, 2017; JING YAN & BASSLER B. L., 2019). Bactérias com capacidade de formar biofilme são responsáveis por diversas infecções, como endocardite, infecções no trato urinário e infecções pulmonares, sendo desta forma uma questão crescente de preocupação (DEL POZO, 2017).

Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade de formação de biofilme em isolados clínicos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes internados em um hospital da cidade de Pelotas, RS, Brasil.

2. METODOLOGIA

Para as análises microbiológicas foram utilizadas as cepas padrão de *A. baumannii* ATCC 19606 e *P. aeruginosa* ATCC 27853, bem como, 6 isolados de *A. baumannii* (Ab02, Ab03, Ab10, Ab13, Ab15 e Ab47) e 3 isolados de *P. aeruginosa* (Pa02, Pa03 e Pa04) de origem hospitalar, identificados bioquímica e molecularmente.

Os micro-organismos foram classificados quanto a sua capacidade de formar biofilme de acordo com STEPANOVIC et al. (2007). Para o ensaio foram utilizadas microplacas com 96 cavidades, nas quais foram adicionados aos poços, 20µL do inóculo bacteriano na concentração de 1×10^6 UFC/mL, exceto nos poços controle, nos quais foram colocados apenas 200 µL de *Trypticase Soy Broth* (TSB). Posteriormente a placa foi incubada em estufa à 37°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, foi descartado o conteúdo contendo as células planctônicas e os poços foram lavados com solução de cloreto de sódio (NaCl) à 0,9% (solução salina). Para a fixação do biofilme, foram adicionados posteriormente a lavagem, 200µL de cristal violeta à 0,5% por 15 min, e logo os poços foram lavados cuidadosamente com solução salina até ser retirado

totalmente o excesso do corante. A placa foi levemente seca com papel toalha absorvente e foram adicionados 200µL de álcool etílico 95%, durante 30 minutos. Após isso, foi realizada a leitura da densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 540nm (DO₅₄₀) dos biofilmes bacterianos formados, com o auxílio de um espectrofotômetro. Em seguida, as cepas foram classificadas como: não formadora de biofilme ($DO_{\text{biofilme}} \leq DO_{\text{controle}}$), fraca formadora de biofilme ($DO_{\text{controle}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 2 \times DO_{\text{controle}}$), moderada formadora de biofilme ($2 \times DO_{\text{controle}} < DO_{\text{biofilme}} \leq 4 \times DO_{\text{controle}}$) e forte formadora de biofilme ($4 \times DO_{\text{controle}} < DO_{\text{biofilme}}$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, referentes a capacidade de formação de biofilme estão apresentados na Tabela 1. O método proposto por STEPANOVIC et al. (2007), foi utilizado para classificar os isolados e cepas padrão como não formadores, fracos, moderados ou fortes formadores de biofilme. Para essa classificação foi usada a medida da DO_{540nm} do controle negativo (DO_{controle}). Nos experimentos com *A. baumannii* foi obtida uma DO_{controle} de 0,06, e foi feita a seguinte classificação: não formador, $DO_{\text{biofilme}} \leq 0,06$; fraco formador, $0,06 < DO_{\text{biofilme}} \leq 0,12$; moderado formador, $0,12 < DO_{\text{biofilme}} \leq 0,24$ e forte formador, $DO_{\text{biofilme}} > 0,24$. Já no experimento para *P. aeruginosa* foi obtida uma DO_{controle} de 0,09, e feita a seguinte classificação: não formador, $DO_{\text{biofilme}} \leq 0,09$; fraco formador, $0,09 < DO_{\text{biofilme}} \leq 0,18$; moderado formador, $0,18 < DO_{\text{biofilme}} \leq 0,36$ e forte formador, $DO_{\text{biofilme}} > 0,36$.

Tabela 1. Capacidade de formação de biofilme por cepas padrão e isolados clínicos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

Cepas	DO _{540nm}	Classificação*
C-	0,06	
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	1,63	Forte formador
Ab02	0,63	Forte formador
Ab10	1,83	Forte formador
Ab13	1,01	Forte formador
Ab15	1,28	Forte formador
Ab47	1,12	Forte formador
C-	0,09	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,13	Fraco formador
Pa02	0,11	Fraco formador
Pa03	0,09	Não formador
Pa04	1,79	Forte formador

*STEPANOVIC et al. (2007); Ab: *Acinetobacter baumannii*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*; DO: Densidade ótica.

A cepa padrão *A. baumannii* ATCC 19606 apresentou maior capacidade de formação de biofilme quando comparado com *P. aeruginosa* ATCC 27853, DO = 1,63 e 0,13, respectivamente. O mesmo pode ser observado quando analisamos os isolados das duas espécies. Todos os isolados de *A. baumannii* foram classificados como fortes formadores de biofilme, já dos isolados de *P. aeruginosa*, apenas um (Pa04) mostrou-se forte formador de biofilme, enquanto que os demais isolados obtiveram a classificação de fraco formador (Pa02) e não formador de biofilme (Pa03) (Tabela 1).

ZEIGHAMI et al. (2019) testando 100 isolados de *A. baumannii* observaram que todos os isolados foram capazes de formar biofilme, sendo 42 isolados moderados formadores e 58 fortes formadores. LIN et al. (2020) utilizando em seu

experimento 33 diferentes cepas de *A. baumannii*, incluindo 21 isolados clínicos, observou que a grande maioria dos isolados foi forte formadora de biofilme (20), com exceção de dois que foram classificados como moderados formadores. ALAMRI et al., (2020) utilizando um método diferente, com ágar vermelho congo e método de placa de cultura de tecido padrão, analisou 183 isolados clínicos multidroga resistente (MDR) de *A. baumannii* e obteve como resultado, 98 dos isolados como fortes formadores, 72 como moderados formadores e 13 como fracos formadores. Segundo YOUNG-SUNG (2018), a taxa de formação de biofilme em *A. baumannii* é de 80-90%, sendo assim, maior que de outras espécies (5-24%).

KARAMI et al., (2019) testando 58 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, obteve a classificação de forte formador de biofilme para 35 isolados, com somente 3 não formadores. Assim como CHO et al., (2018), que testando 82 isolados de *P. aeruginosa* obteve como resultado, 76 isolados fortes formadores de biofilme e 6 não formadores de biofilme. E ABDELRAHEEM et al., (2020) que de 100 isolados de *P. aeruginosa* testados, obteve 14 isolados classificados como fortes formadores, 7 moderados e 6 fracos formadores de biofilme.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que os isolados clínicos e a cepa padrão de *A. baumannii* mostraram-se fortes formadores de biofilme. Enquanto para *P. aeruginosa*, a classificação foi de fraco formador de biofilme para a cepa padrão e Pa02, não formador para Pa03 e forte formador de biofilme para Pa04.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAMRI, A. M.; ALSULTAN, A. A.; ANSARI, M. A.; ALNIMR, A. M. Biofilm-Formation in Clonally Unrelated Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. **Pathogens**, v. 9, 630, 2020.
- ABDELRAHEEM, W. M.; ADBELKADER, A. E.; MOHAMED, E. S.; MOHAMMED, M. S. Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression in different *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Meta Gene**, v. 23, p. 7, 2020.
- CHO H. H., KWON K. C., KIM S., PARK, Y., KOO, S. H.; Association between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 48; no, 3., 2018
- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.15, p. 1-15 ,2017.
- DEL POZO, J. L. Biofilm-related disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v.15, p. 1-15 ,2017.
- KARAMI, P.; KAHLEDI, A.; MASHOOF, R. Y.; YAGHOUBI, M. H.; KARAMI, M.; DASTAN, D.; ALIKHANI, M. Y. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. **Gene Reports**, v. 18, p. 1-7, 2019.
- LIN, M-F., LIN, Y-Y.; LAN, C-Y. Characterization of biofilm production in different strains of *Acinetobacter baumannii* and the effects of chemical compounds on biofilm formation. **PEER J**, v. 8., 2020.
- MAURICE, N. M.; BEDI, B.; SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Hot Response and Clinical Implications in Lung Infections, **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, p. 1-36 ,2018.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview

of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. **APMIS**, v. 115, n.8, p. 891-899, 2007.

THUMMEEPK, R.; KONGTHAI, P.; LEUNGTONGKAM, U.; SITTHISAK, S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, v. 19, n.2, p. 121–9, 2016.

VÁZQUEZ-LÓPEZ, R.; SOLANO-GÁLVEZ, S. G.; VIGNON-WHALEY, J. J. J.; VAAMONDE, J. A. A.; ALONZO, L. A. P.; RESÉNDIZ, A. R.; ÁLVAREZ, M. M.; LÓPEZ, E. N. V.; FRANYUTI-KELLY, G.; ÁLVAREZ-HERNANDÉZ, D. A.; GUZMÁN, V. M.; BAÑUELOS, J. E. J.; FELIZ, J. M.; BARRIOS, J. A. G.; FORTES, T. B. *Acinetobacter baumannii* Resistance: A Real Challenge for Clinicians. **Journal Antibiotics**, 2020.

YAN, J.; BASSLER, B. L. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. **Cell host & Microbe**, v. 26, 2019.

YOUN-SUNG, J. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* Clinical isolates from Daejeon, **Korean Journal of Clinical Laboratory Science**, v, 50, 2018.

ZEIGHAMI, H.; VALADKHAMI, F.; SHAPOURI, R.; SAMADI, E.; HAGHI F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p. 1-9, 2019.