

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

BIOMEDICINA

**EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUB-INIBITÓRIAS DE ANTIMICROBIANOS (RIFAMPICINA E MINOCICLINA)
SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOFILME EM AMOSTRAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

¹Alice Slotfeldt Viana (bolsista IC-UNIRIO); ¹Carmen Soares de Meirelles Saramago; ¹Cleonice de Alves Bento; ¹Henry Marcel Zalona Fernandes; ²Maria José de Souza; ¹Renato Geraldo da Silva Filho; ¹Agostinho Alves de Lima e Silva (orientador).

1 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Instituto Biomédico; UNIRIO

2 - Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro

Palavras-chave: Staphylococcus aureus, antimicrobianos, biofilme.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus destaca-se como um dos mais importantes agentes causadores de infecções hospitalares e em termos de resistência a antimicrobianos. As infecções hospitalares causadas por esta espécie frequentemente estão associadas a procedimentos médicos invasivos, como a implantação de cateteres, próteses, stents e outros dispositivos de implante. Infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter resultam no aumento da taxa de mortalidade, prolongamento da hospitalização e custos adicionais para o sistema de saúde (FALAGAS et al. 2007). A fase que precede a infecção relacionada ao cateter é a colonização microbiana das superfícies deste dispositivo, logo após a sua inserção no corpo humano (MAKI, 1989), evento que envolve a participação de fatores inespecíficos (físico-químicos) e adesinas específicas (APARNA, YADAV, 2008). Após a aderência inicial, ocorre a produção de uma matriz amorfa que garante a persistência da bactéria, protegendo-a das defesas do hospedeiro e da ação de antimicrobianos, além de propiciar a aderência inter-celular com acúmulo de bactérias, e conseqüente a formação de uma estrutura complexa e altamente organizada conhecida como biofilme (ROHDE et al., 2007). Essa matriz extracelular frequentemente é formada por um polissacarídeo denominado Adesina Polissacarídica Intercelular (PIA), cuja produção é codificada pelos genes do operon icaAIBC. Apesar da prevalência de biofilmes PIA-dependentes em amostras clínicas de S. aureus, estudos recentes identificaram a existência de biofilmes onde a presença de PIA não foi detectada e/ou amostras que não possuíam o operon ica (O'GARA, 2007; IZANO et al., 2008). Nestas amostras biofilme positivas, mas PIA negativas, a presença de proteínas como componente da matriz do biofilme tem sido relatada (GEOGHEGAN et al. 2010). Atualmente têm sido estudadas medidas de prevenção para reduzir a ocorrência de processos infecciosos relacionados a cateteres, como a impregnação de agentes antimicrobianos, tanto externamente quanto na sua superfície luminal (BALABAN et al. 2003; FALAGAS et al. 2007). Entre os antimicrobianos, a combinação de rifampicina com minociclina frequentemente é empregada no revestimento destes dispositivos (RAAD et al. 1997; SAMPATH et al. 2001). Porém, é importante ressaltar que a formação de biofilme pode ser influenciada por diferentes fatores (KNOBLOCH et al., 2002; KIM et al., 2008), inclusive, certos antimicrobianos em concentrações sub-inibitórias (RACHID et al., 2000). Assim, deve ser considerada a possibilidade de que tais dispositivos impregnados com antimicrobianos possam vir a favorecer a colonização de S. aureus mediada por biofilme, caso eles não mantenham a concentração inibitória durante todo o período de contato com os tecidos do hospedeiro.

OBJETIVO

- Avaliar a produção de biofilme por amostras de indivíduos portadores de S. aureus cultivadas na presença de concentrações sub-inibitórias de minociclina, e de minociclina combinada com rifampicina.
- Analisar a composição do biofilme produzido por amostras de portadores e de isolados clínicos de S. aureus.

METODOLOGIA

Para o estudo da influência de concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos na produção de biofilme em placas de microtitulação foram testadas cinco amostras de S. aureus isoladas de indivíduos portadores (estudantes da área de saúde da UNIRIO). As soluções de minociclina foram obtidas a partir de eluição de um disco de 30µg do antimicrobiano em 10mL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB), procedendo-se, a seguir, diluições seriadas da droga.. As soluções de rifampicina combinada à minociclina foram preparadas a partir de eluição de um disco de rifampicina de 5 µg no caldo TSB, seguido de diluições seriadas, e posterior mistura de alíquotas destas diluições às diluições das soluções de minociclina, de modo a obter as mesmas concentrações de rifampicina utilizadas em estudo prévio. A seguir, 100µL das diluições dos antimicrobianos e 100µL da suspensão da amostra bacteriana diluída a 1/100 foram transferidas para placa de microtitulação de 96 poços. Três poços foram reservados para a realização do teste controle (TSB, sem a bactéria). Após incubação por 24h a 35°C, procedeu-se à leitura visual dos poços, visando determinar o valor da concentração mínima inibitória (CMI) da droga para cada amostra. A seguir, foi realizada a quantificação do crescimento bacteriano (DOg), por meio da determinação da densidade óptica em equipamento leitor de Elisa. Para a determinação quantitativa da produção de biofilme, procedeu-se a remoção das culturas dos poços, seguido de lavagem dos poços por 3 vezes com 200µL de água destilada. Após fixação do biofilme com 200µL de metanol por 15-20 minutos, o metanol foi removido dos poços, e as placas submetidas à secagem por 15 min. A seguir, foram adicionados 200µL de solução aquosa de Cristal Violeta 2% em cada poço e, após 15min, os poços foram submetidos à lavagem por 3 vezes com água destilada e à secagem. Para a extração do corante foram adicionados 200µL de etanol em cada

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

poço, seguido de agitação em agitador orbital por 30 min. A absorbância do extrato alcoólico (D0eb) foi então determinada no leitor de ELISA a 595nm. A quantidade de biofilme produzida pelas amostras foi determinada pela média dos valores da D0eb de uma triplicata, sendo este teste repetido 3 (três) vezes em eventos separados, ou seja, o valor final considerado na leitura foi o resultado da média de 9 determinações. A caracterização da produção de biofilme pelas amostras foi definida conforme sugerido por Stepanovik et al. (2007). Para análise da composição do biofilme por meio de testes de desagregação com metaperiodato de sódio ou proteinase K (KOGAN et al.; 2006) foram estudadas as cinco amostras de portadores, além da inclusão cinco isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de pacientes do Hospital dos Servidores do Estado do RJ, cujos resultados para indução de biofilme pelas drogas estudadas foram obtidos em etapa anterior do trabalho. Seguindo o procedimento da técnica de biofilme em placa de microtitulação, após a leitura da D0g, as culturas crescidas em TSB com e sem as concentrações sub-inibitórias de rifampicina ou minociclina foram removidas da microplaca e esta lavada com água destilada. Em seguida, a cada 4 poços foram adicionados 200µL de solução de PBS (controle), ou 200µL de solução de metaperiodato, ou 200µL de solução de Proteinase K. Após incubação por 1h a 37°C procedeu-se a remoção das culturas dos poços, seguido de lavagem com 200µL de água destilada, adição de 200 µL de metanol a cada poço e, após 20min de contato, remoção do metanol e secagem das por 15 minutos. Os poços foram então preenchidos com 200µL de solução de Cristal Violeta 2% por 15 minutos, submetidos à lavagem com água destilada corrente e à secagem. Após adição de 200µL de etanol em cada poço, seguido de agitação em agitador orbital por 30 minutos, a D0eb foi determinada em leitor de ELISA (595nm). Com base na média dos valores da D0eb de quadruplicatas das amostras, a natureza do biofilme foi estabelecida por meio das diferenças de DO obtidas com e sem o tratamento com metaperiodato ou proteinase K, considerando-se como ponto de corte para caracterização da natureza polissacarídica ou proteica do biofilme um valor de D0eb $\leq 50\%$ em relação ao teste controle. A determinação da produção de biofilme em Ágar Vermelho Congo (AVC) foi realizada conforme sugerido por Freeman e colaboradores (1989), exceto pela não adição de sacarose ao meio, de modo a se poder comparar os resultados com os obtidos nos testes com placas de microtitulação. Adicionalmente, foi testado o comportamento das amostras em AVC contendo rifampicina na concentração que determinou indução mais intensa da produção de biofilme nos testes em microplacas. A semeadura nesse meio foi realizada por meio de "spots" de 10 µL de suspensões diluídas a 1/100 de cada amostra bacteriana e, após incubação por 24h à 37°C, os crescimentos foram analisados quanto ao seu aspecto e coloração.

RESULTADOS

Entre as 5 amostras bacterianas oriundas de portadores, uma mostrou-se produtora moderada de biofilme em TSB nos testes em microplaca, resultado este que se apresentou inalterado na presença de concentrações sub-inibitórias de minociclina. Porém, quando exposta à solução de minociclina combinada com rifampicina observou-se aumento na produção de biofilme por esta amostra, sendo este, em média, de 82,9% em relação ao controle sem as drogas.

As quatro amostras restantes de indivíduos portadores, originalmente não-produtoras de biofilme em TSB, também não mostraram alterações quando expostas à minociclina isoladamente, enquanto que na presença de minociclina combinada a rifampicina três destes isolados passaram a produzir biofilme intensamente. Os aumentos médios na D0eb foram mais acentuados nas concentrações equivalentes a 1/2 da CMI (360% a 967% em comparação aos controles) e em 1/4 da CMI (245% a 1039%). Em relação à composição do biofilme, entre as dez amostras testadas (5 de portadores e 5 clínicas), a única caracterizada como formadora de biofilme proteico foi o isolado clínico que havia se mostrado produtor em TSB sem droga, e que não se mostrou induzido a produzir biofilme por concentrações sub-inibitórias dos antimicrobianos estudados. As quatro amostras clínicas restantes, originalmente negativas para a produção de biofilme em TSB, exibiram produção de biofilme de natureza polissacarídica quando cultivadas na presença de concentrações sub-inibitórias de rifampicina. Quanto aos isolados de portadores, a amostra originalmente produtora em TSB apresentou biofilme de natureza polissacarídica, tanto em meio sem rifampicina quanto em TSB com esta droga, observando-se o mesmo resultado (biofilme polissacarídico) para as 4 amostras restantes quando cultivadas na presença de concentrações sub-inibitórias de rifampicina. A quinta amostra não foi testada para composição de biofilme, uma vez que se mostrou não produtora tanto em TSB quanto em TSB com os antimicrobianos. Os resultados obtidos em AVC modificado foram compatíveis com os obtidos para os testes em placas de microtitulação. Neste meio, as 4 amostras de portadores originalmente negativas para produção de biofilme em TSB apresentaram crescimento liso em AVC (reação negativa), enquanto o isolado originalmente produtor em TSB mostrou crescimento rugoso (reação positiva). Em AVC com rifampicina todas as amostras (clínicas e de portadores) apresentaram reação positiva, exceto aquela que não se mostrou induzida a produzir biofilme nos testes com microplaca. Entre as amostras clínicas, o isolado produtor de biofilme proteico mostrou reação negativa em AVC com e sem rifampicina, enquanto os isolados não produtores em TSB mostraram reação negativa no meio sem droga, e reação positiva na presença de rifampicina.

CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que concentrações sub-inibitórias de minociclina não induziram a produção de biofilme em amostras de *S. aureus* originalmente negativas em TSB, ao contrário da combinação de rifampicina com minociclina. Porém, com base em resultados obtidos anteriormente, provavelmente esta ação indutora foi decorrente da ação da rifampicina isoladamente, e não de uma combinação sinérgica das drogas. A diferença na influência destes antimicrobianos sobre a produção de biofilme talvez resida, em parte, nos seus mecanismos de ação. A minociclina é uma droga inibidora da síntese de proteínas, o que poderia, mesmo em baixas concentrações, afetar a aderência direta, considerada a primeira etapa na formação do biofilme. Já a rifampicina atua se ligando à RNA polimerase bacteriana, podendo se admitir que, em baixas concentrações, talvez consiga se ligar também a genes inibidores da produção de biofilme, inativando-os e, desse modo, desreprimir a expressão do operon ica. Ao contrário do observado para a minociclina, estes achados podem levar ao questionamento se a rifampicina consiste em uma droga ideal para o revestimento de catéteres. Os biofilmes induzidos pela rifampicina foram de natureza exclusivamente polissacarídica, como demonstrado pelos testes com

13ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

metaperiodato, e as reações obtidas em AVC corroboraram estes resultados. A adição de rifampicina ao AVC pode constituir uma alternativa complementar ao uso da sacarose para a detecção de amostras com produção de biofilme reprimida em TSB, uma vez que ensaios preliminares com o meio de AVC suplementado com este açúcar mostraram uma maior dificuldade na interpretação das reações positivas para este grupo bacteriano.

REFERÊNCIAS

- APARNA, M. S.; YADAV, S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.*, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.
- BALABAN, N.; GOV, Y.; BITTLER, A.; BOELAERT, R. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.*, 63, 340-345, 2003.
- FALAGAS, M. E.; FRAGOULIS, K.; BLIZIOTIS, I. A.; CHATZINIKOLAOU, I. Rifampicin-impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 359-369, 2007.
- 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, n. 8, p. 872-874, 1989.
- GEOGHEGAN, Joan A. et al. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 21, p. 5663-5673, 2010.
- IZANO, E. A.; AMARANTE, M. A.; KHER, W. B.; KAPLAN, J. B. Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular dna in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.*, v. 74, n. 2, p. 470-476, Jan, 2008.
- KIM, J.; KIM, C.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W.; LEE, B. K.; CHO, S. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J Microbiol Biotechnol.*, v.18, n. 1, p. 28-34, 2008.
- KNOBLOCH, J. K.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; KAULFERS, P.; MACK, D. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *S. epidermidis*. *J Antimicrob Chemother.*, v. 49, n.4, p.683-687, 2002.
- KOGAN, G.; SADOVASKAYA, I.; CHAIGNON, P.; CHOKR, A.; JABBOURI, S. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 255, p. 11-16, 2006.
- MAKI D. G. Pathogenesis, prevention and management of infections due to intravascular devices used for infusion therapy. *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1989: 161-77.
- O'GARA, J.P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 270, p. 179-188, 2007
- RAAD I., DAROUICHE R., DUPUIS J., ABI-SAID D., GABRIELLI A., HACHEM R., WALL M., HARRIS R., JONES J., BUZAID A., ROBERTSON C., SHENAG S., CURLING P., BURKE T., ERICSSON C. Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections. A randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med.* 127(4):267-74, 1997.
- RACHID S., OHLSSEN K., WITTE W., HACKER J., and ZIEBUHR W.. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesion expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3357-3363, 2000.
- ROHDE, H.; BURANDT, E. C.; SIEMSEN, N.; FROMMELT, L.; BURDELSKI, C.; WURSTER, S.; SCHERPE, S.; DAVIES, A. P.; HARRIS, L. G.; HORSTKOTTE, M. A.; KNOBLOCH, J. K.; RAGUNATH, C.; KAPLAN, J. B.; MACK, D. Polysaccharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.*, v.28, n.9, p.1711-1720, 2007.
- SAMPATH L. A., TAMBE S. M., MODAK S. M., *In Vitro and In Vivo Efficacy of Catheters Impregnated With Antiseptics or Antibiotics: Evaluation of the Risk of Bacterial Resistance to the Antimicrobials in the Catheters.* *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.*, v. 22, n.10, p. 640-646, 2001.
- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; CIRKOVIĆ, 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, p.891-899, 2007.