

Biofilmes do conceito teórico à aplicação prática

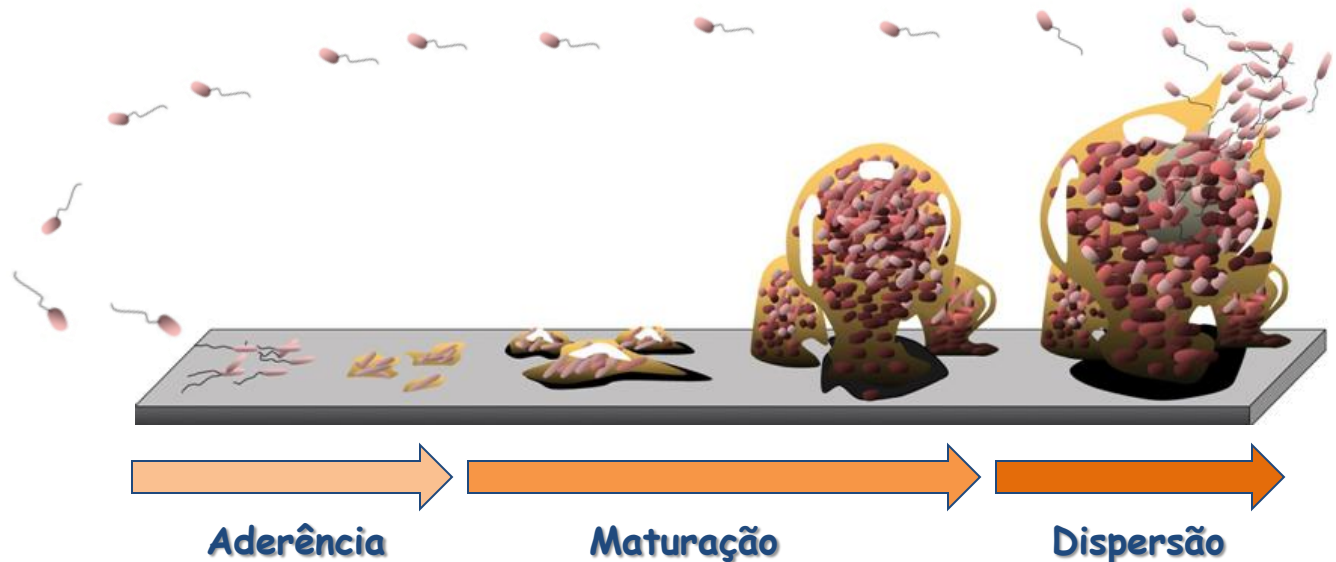
1º Encontro do GCR-PPCIRA da
ARSalentejo I.P.

6 Maio 2016

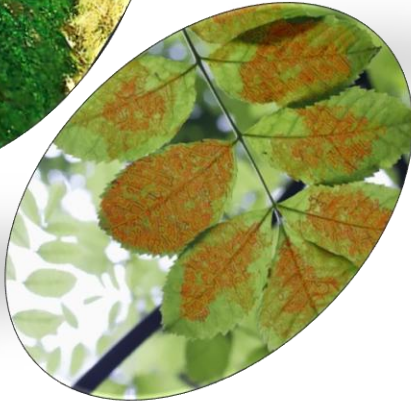
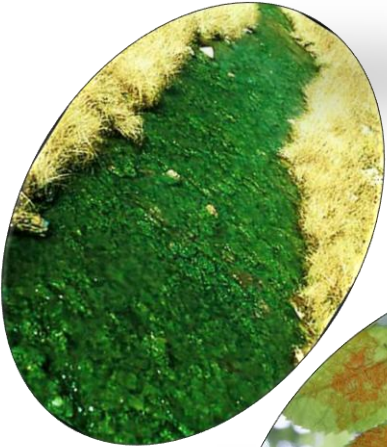
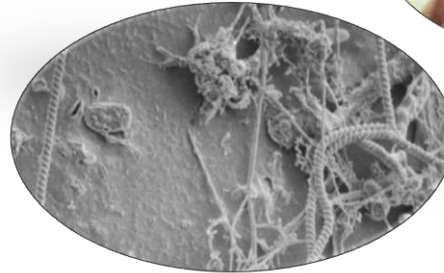
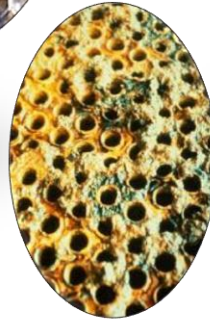
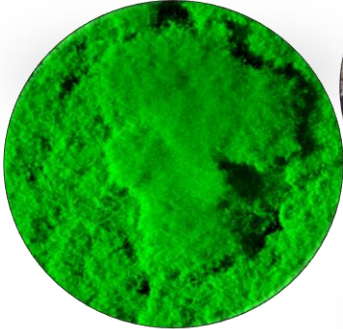
Luísa Jordão
Departamento de Saúde Ambiental do INSA
Unidade de Investigação e Desenvolvimento- Lisboa

Biofilmes: Conceitos gerais

- O biofilme é definido como o conjunto formado por uma ou mais espécies de microrganismos aderentes entre si e a uma superfície abiótica ou biótica, juntamente com a matriz extracelular segregada pelos microrganismos.



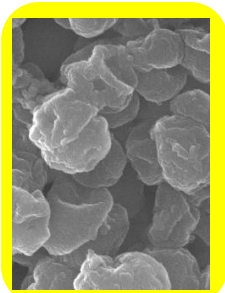
Distribuição



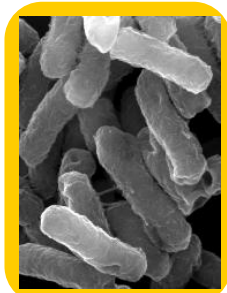
THREAT LEVEL
SERIOUS



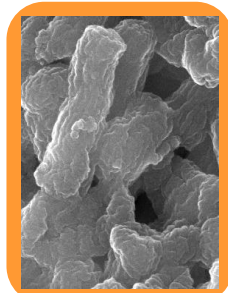
These bacteria are a serious concern and require prompt and sustained action to ensure the problem does not grow.



Acinetobacter baumannii



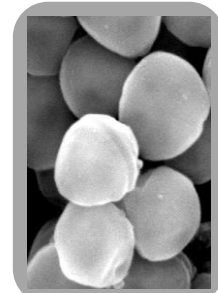
E.coli



K.pneumoniae



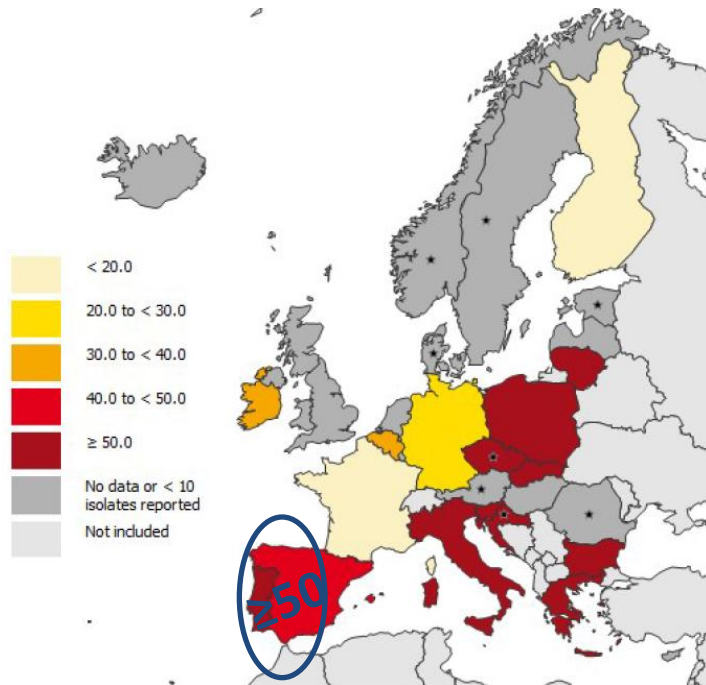
P.aeruginosa



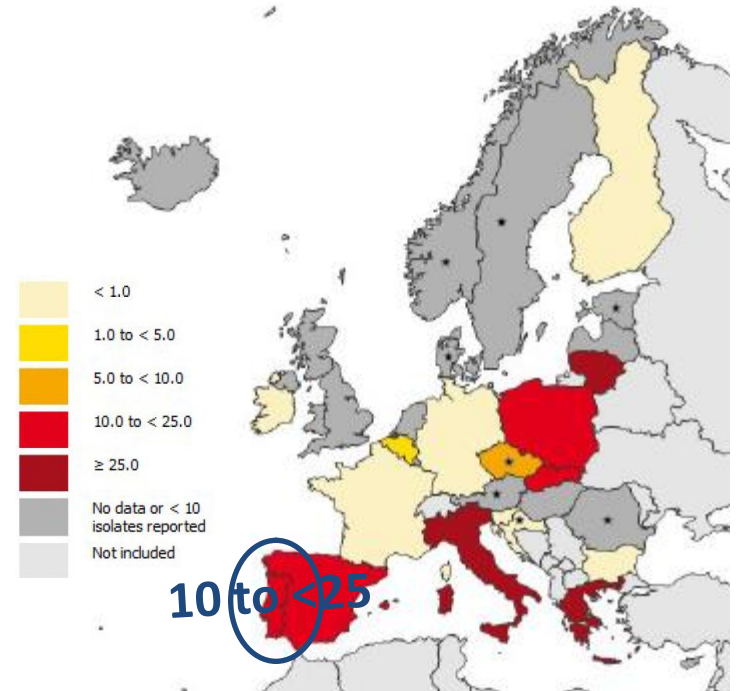
S.aureus

Percentage of *Klebsiella pneumoniae* isolates non-susceptible to

3rd generation cephalosporin

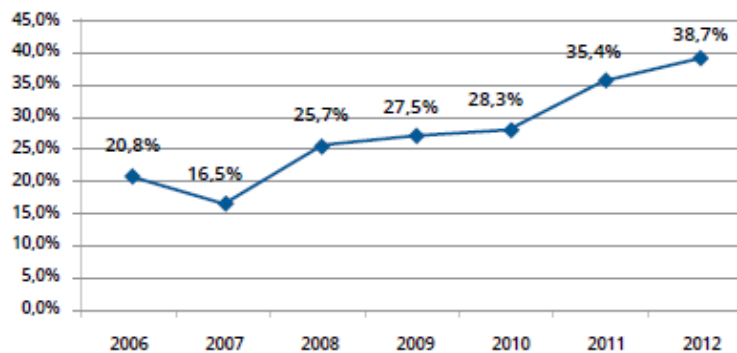


carbapenems



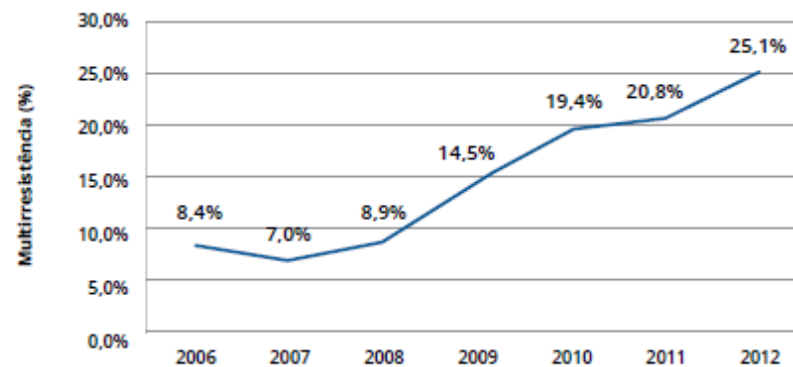
in HAIs in acute hospitals, ECDC PPS 2011-2012.

Taxa de *Klebsiella pneumoniae* resistente às cefalosporinas de 3ª geração, Portugal



Fonte: TESSy; ECDC, 2014

Taxa de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente, Portugal

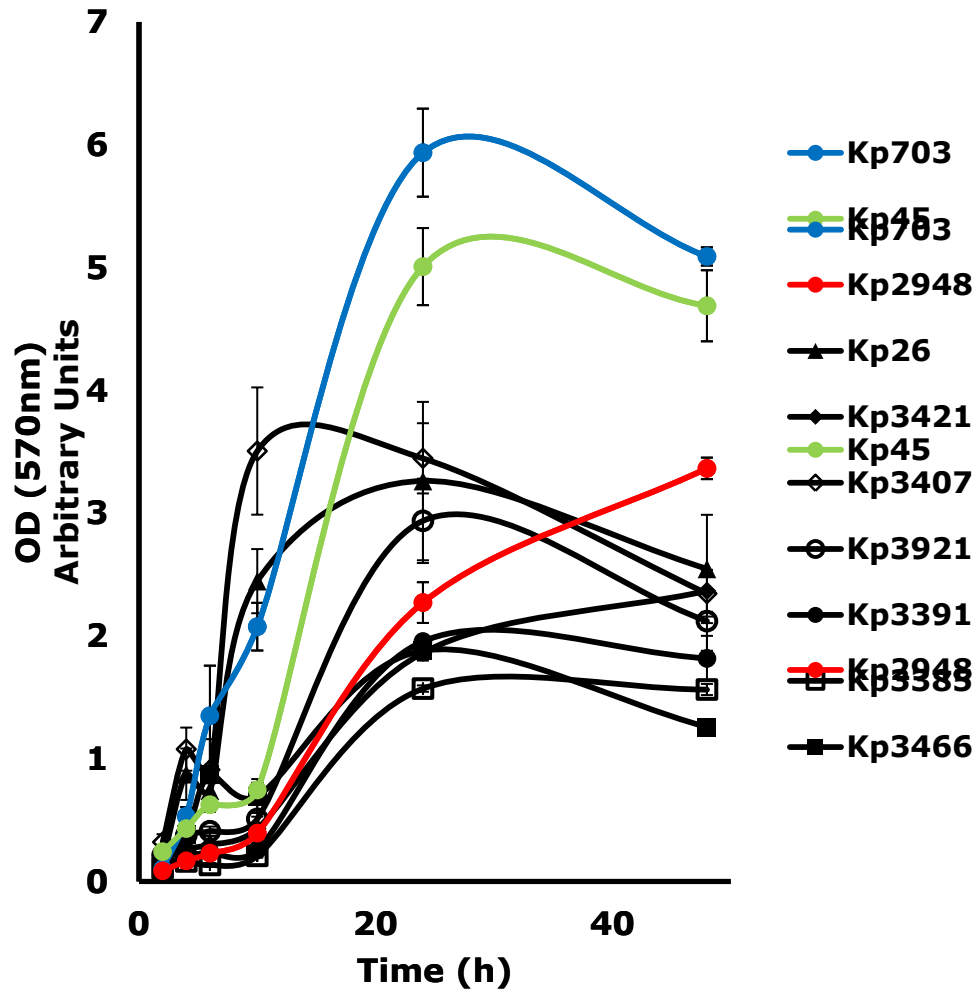


*Resistência combinada: resistência às cefalosporinas de 3.ª geração, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos

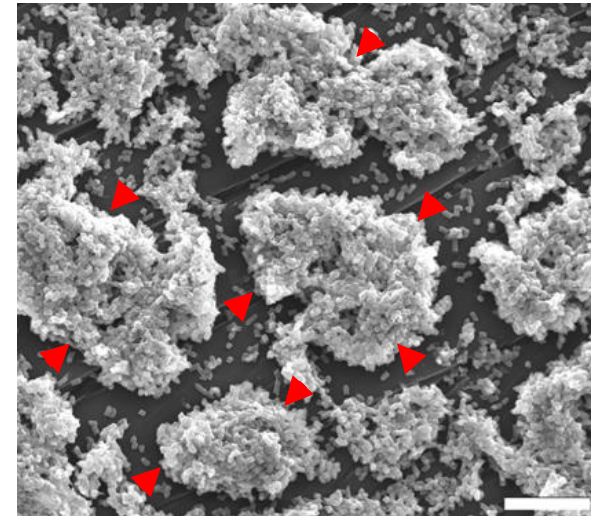
Fonte: TESSy; ECDC, 2014

Adaptado de Portugal: Prevenção e Controlo de Infeções e Resistência aos Antimicrobianos em números: 2014

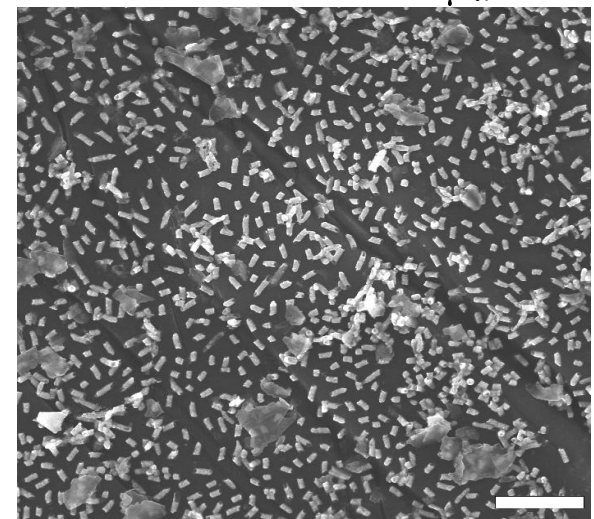
Biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*



Kp703



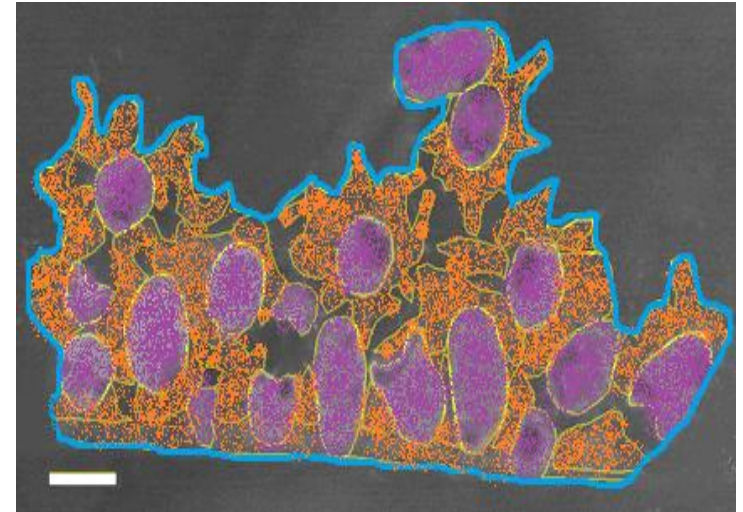
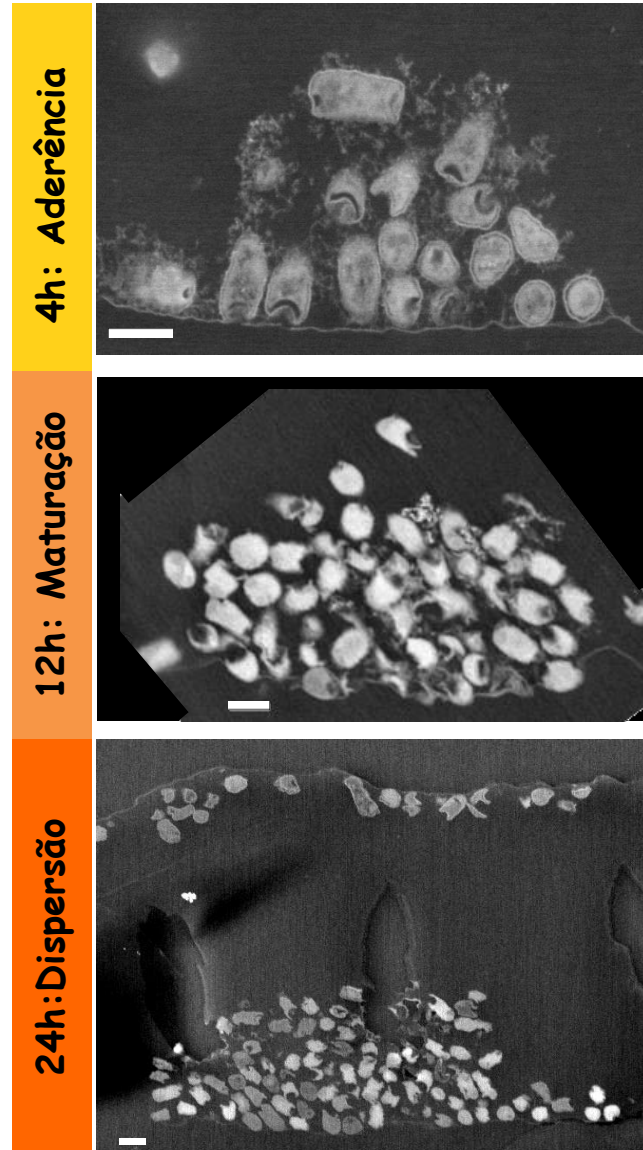
Barra de escala 10 μm



Kp2948

Biofilmes com 12h

Biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*

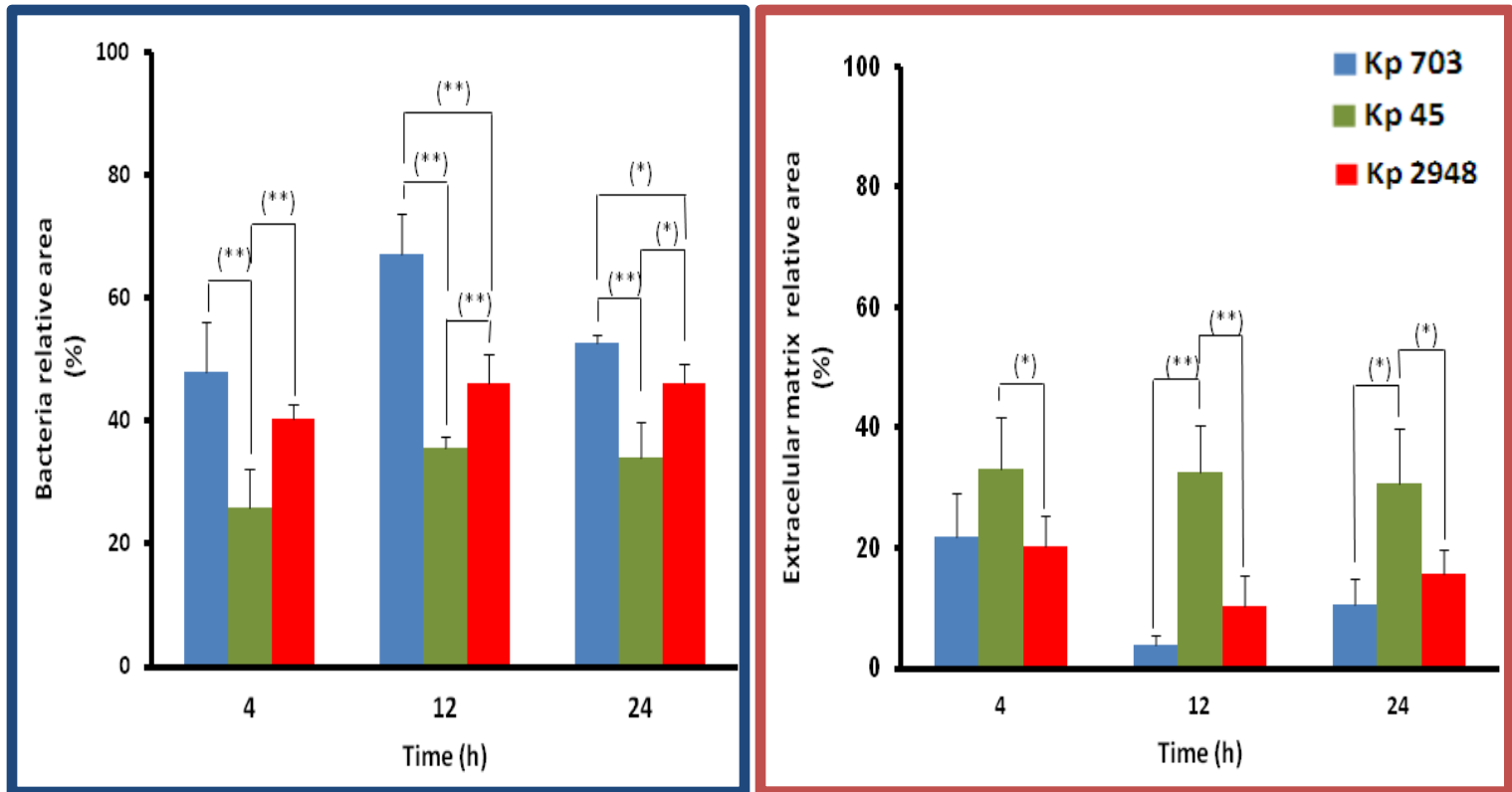


Area total do biofilme

Bacteria

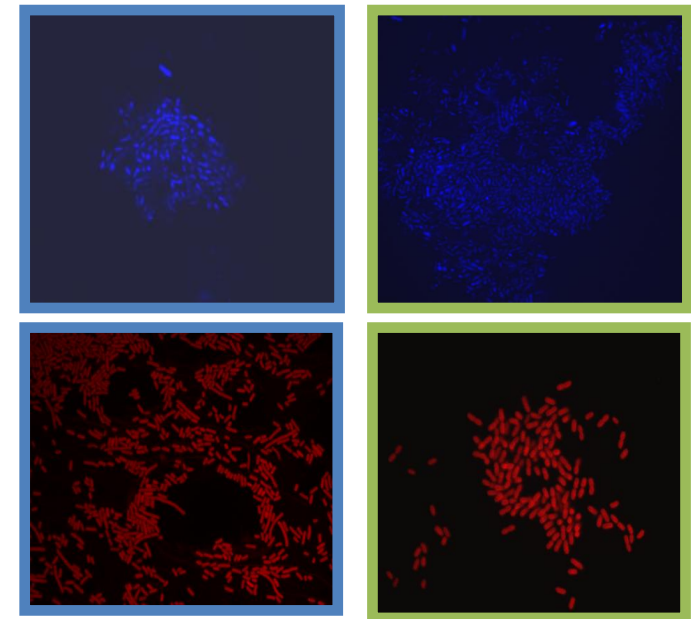
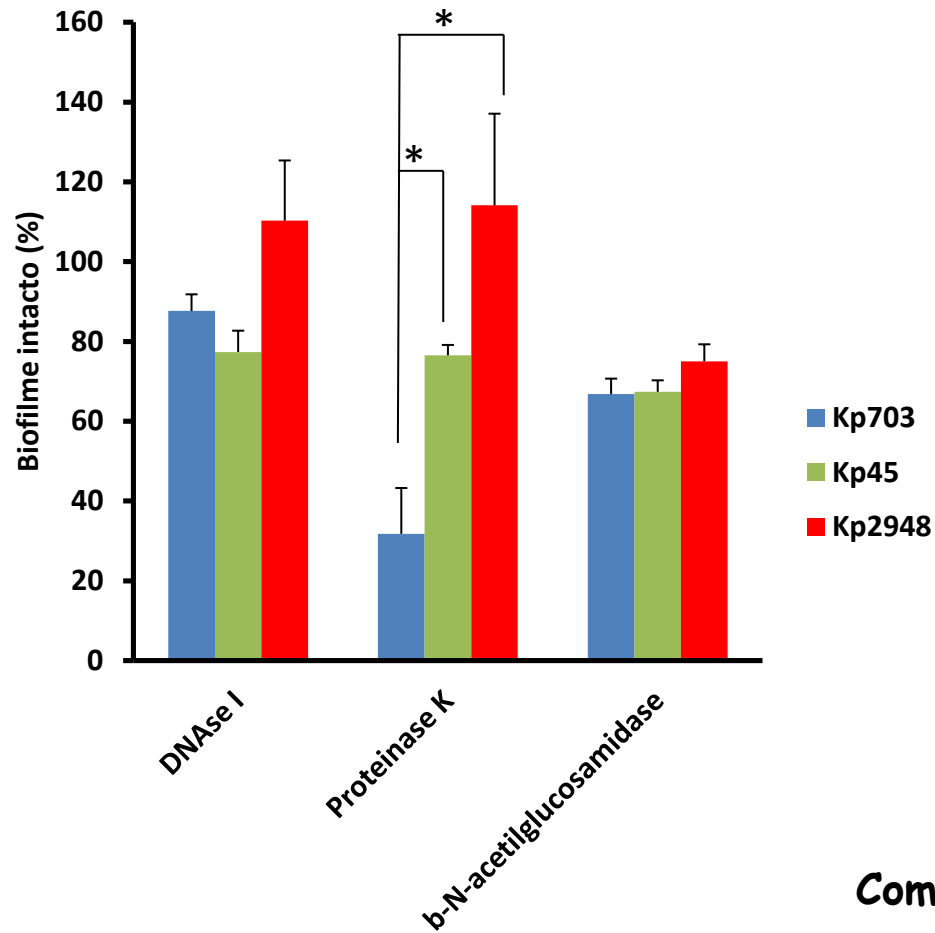
EPS

Biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*



- Kp703: Maior biomassa em todas as fases da formação do biofilme.
- Kp45: Menor biomassa e maior EPS em todas as fases de formação do biofilme.
- Kp703 e Kp2948 formam biofilmes idênticos seguindo diferentes cinéticas.
- Kp45 forma um biofilme com características únicas seguindo uma cinética semelhante à da Kp703.

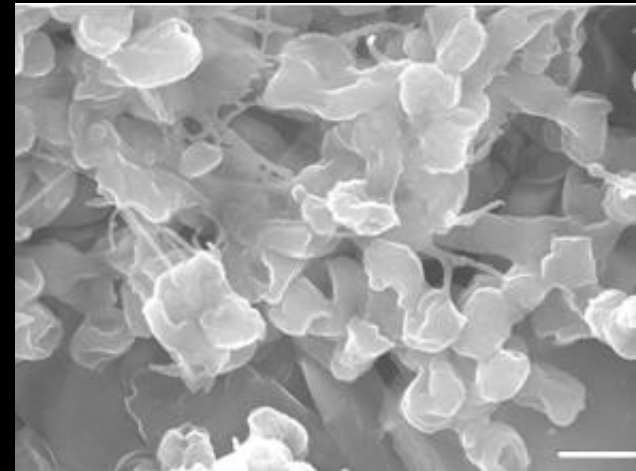
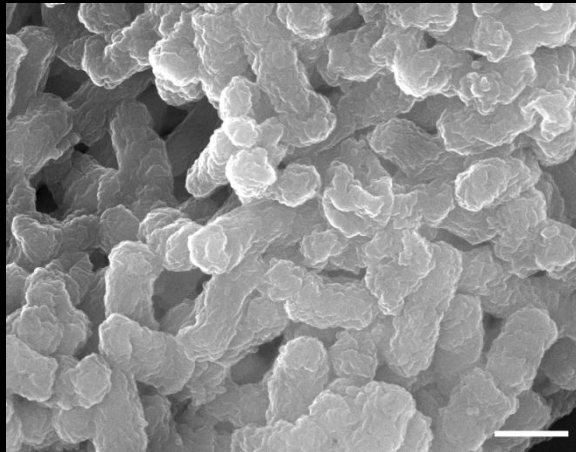
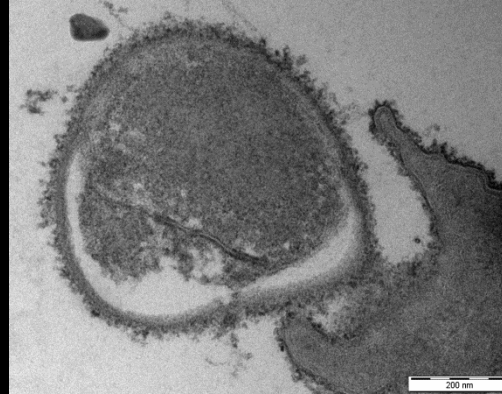
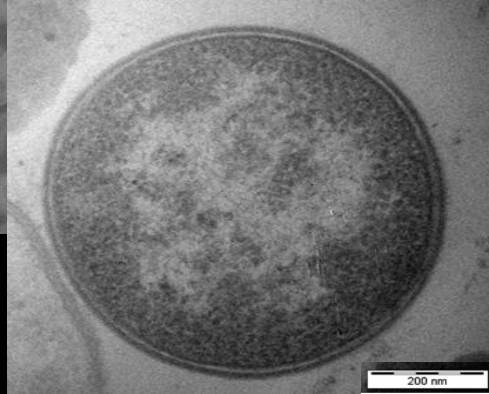
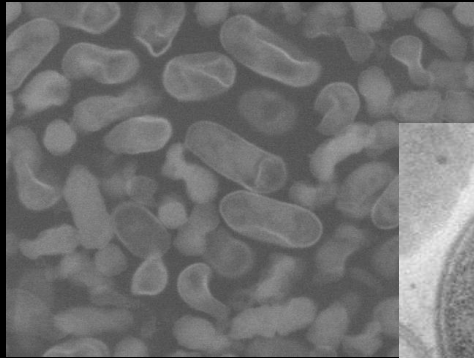
Biofilmes de *K. pneumoniae* : a matriz



Hoecht / Calcofluor

Composição da matriz extracelular é diferente nas 3 bactérias

Bactérias na forma planctónica vs biofilme: Estrutura



Planctónicas

Biofilmes

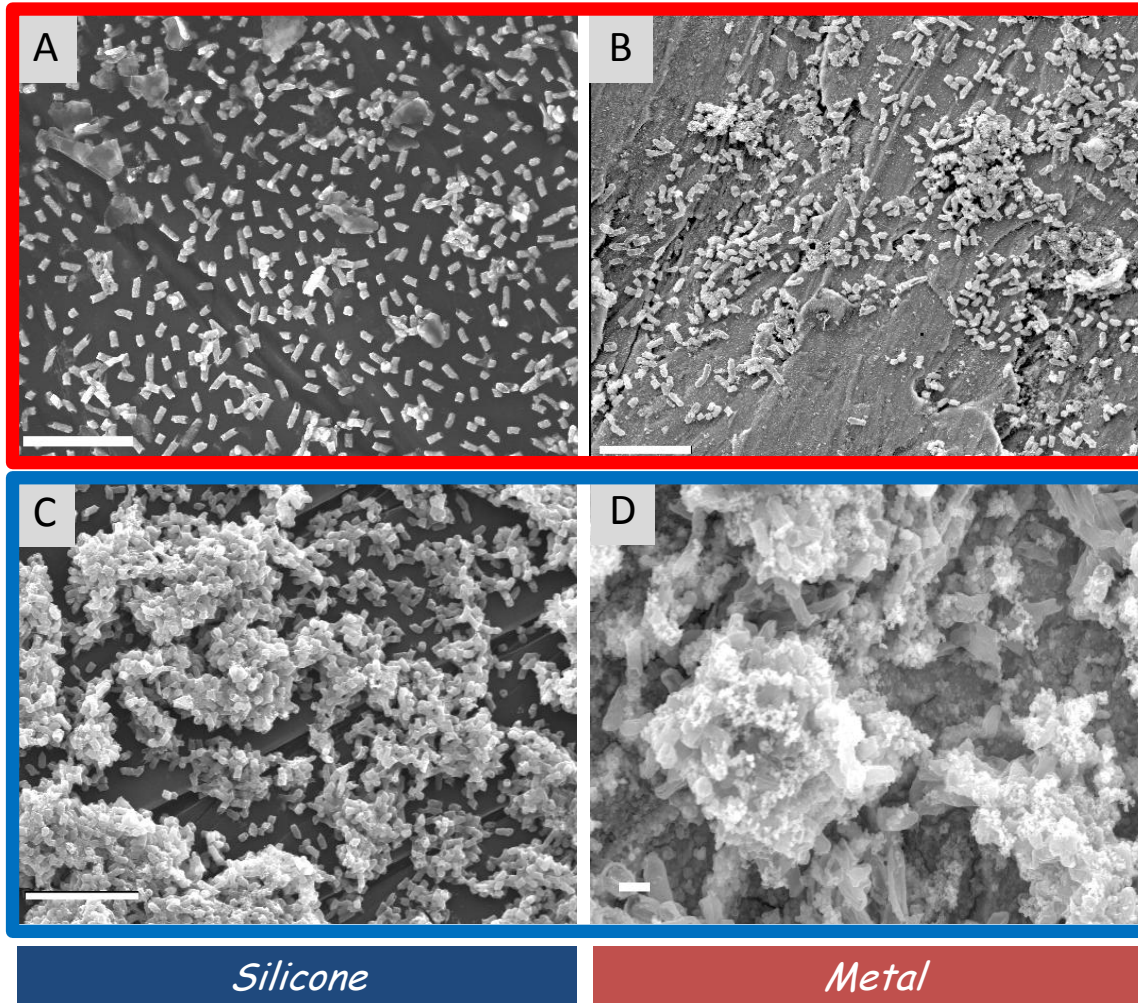
Biofilmes e resistência aos antibióticos

	Bactéria	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
		Amoxicilina	Fosfomicina	Gentamicina
Planctónicas	<i>Kp 45</i>	250	0.781	3.05
	<i>Kp 703</i>	250	< 0.488	0.76
	<i>Kp 2948</i>	> 500	0.781	1.52
Biofilme	<i>Kp 45</i>	10	=	8
	<i>Kp 703</i>	10	1000	257
	<i>Kp 2948</i>	5	=	2

O valor da CMI varia com o antibiótico e a bactéria.

CMI biofilme \geq CMI planctónica

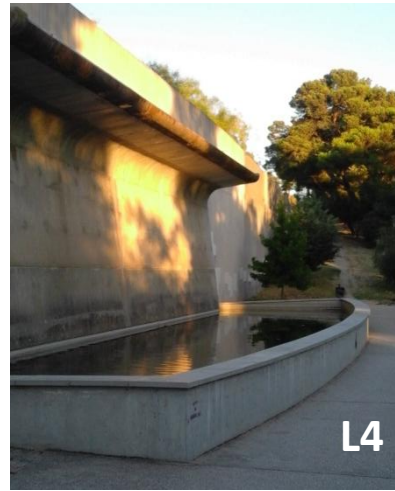
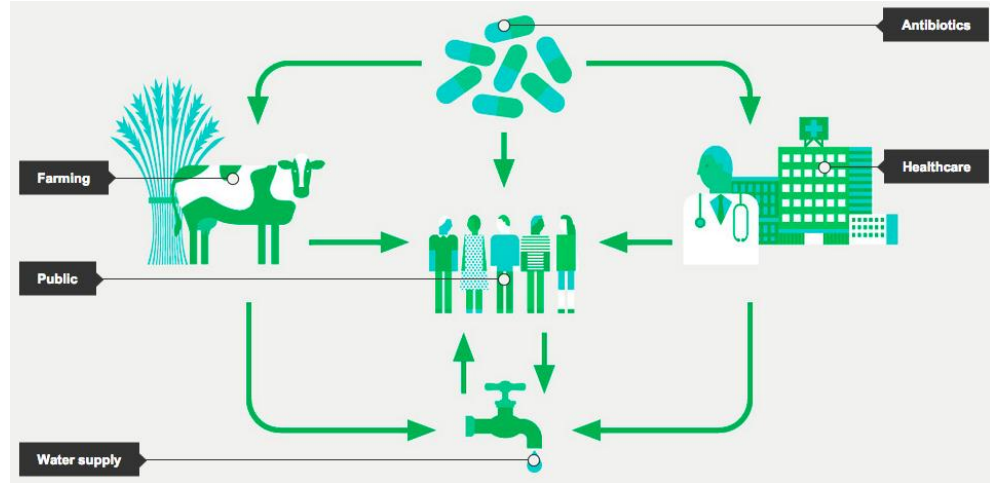
Materiais presentes em ambiente hospitalar e biofilmes



O ranking de formadores de biofilme é independente da superfície mas a composição depende da superfície onde este se forma.

Biofilmes com 12h de *Kp2948* (A - B) e *Kp 703* (C - D).

... biofilmes no meio ambiente?



L1	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia odorifera</i> <i>Serratia rubidea</i> <i>Vibrio metschnikovii</i>
L2	<i>Elisabethkingia meningoseptica</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
L3	<i>Serratia rubidea</i>
L4	<i>Klebsiella pneumoniae ozonae 1</i> <i>Klebsiella pneumoniae ozonae 2</i> <i>Pastorella, Shigella</i>

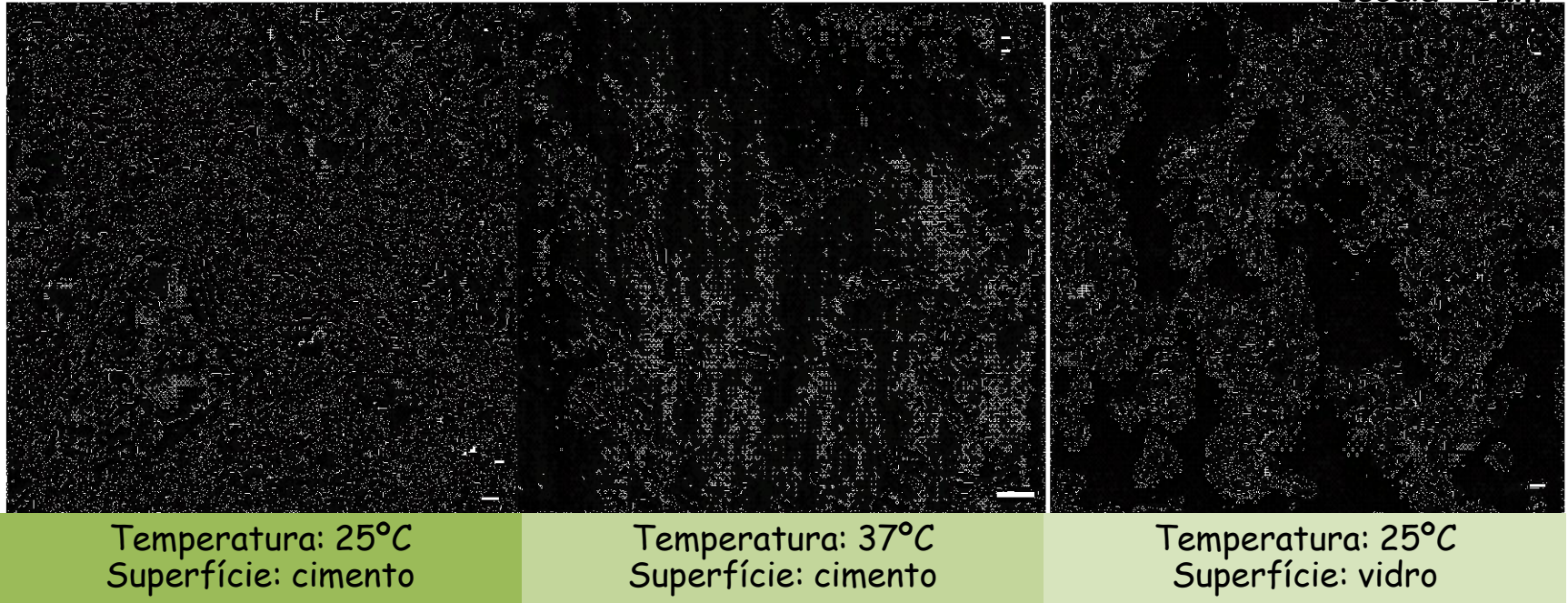
... biofilmes no meio ambiente e resistência aos antimicrobianos?

ID	Local de isolamento	Formação de biofilme (OD570nm)		Antibiograma							CMI AMX (µg/ml)	
		25°C	37°C	AMC	FOX	CAZ	CTX	IPM	GM	CIP	Plant	Biof
Kp1	Lago 4	0,240	0,153	R	S	S	S	S	S	S	7,81	62,5
Kp2	Lago 1	0,076	---	R	S	S	S	S	S	S	0,98	125
Kp3	Lago 1	0,740	0,256	R	S	S	S	S	S	S	500	>500
Kp4	Biofilme Lago 1	1,159	0,285	R	R	S	S	S	S	S	500	>500

Os antibióticos testados foram a associação de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), gentamicina (GM) e ciprofloxacina (CIP).

... biofilmes no meio ambiente

Escala= 1µm



Kp4 (biofilme L2) tempo de incubação 48h

A melhor performance foi obtida nas condições que melhor mimetizam as encontradas no ambiente em termos de superfície (revestimento do lago) e temperatura (25°C) (A).

A manutenção da superfície com alteração da temperatura para 37°C (B) ou a manutenção da temperatura com alteração da superfície (C) afetam a formação de biofilme.

Conclusões:

Biofilme < > Resistência aos antibióticos

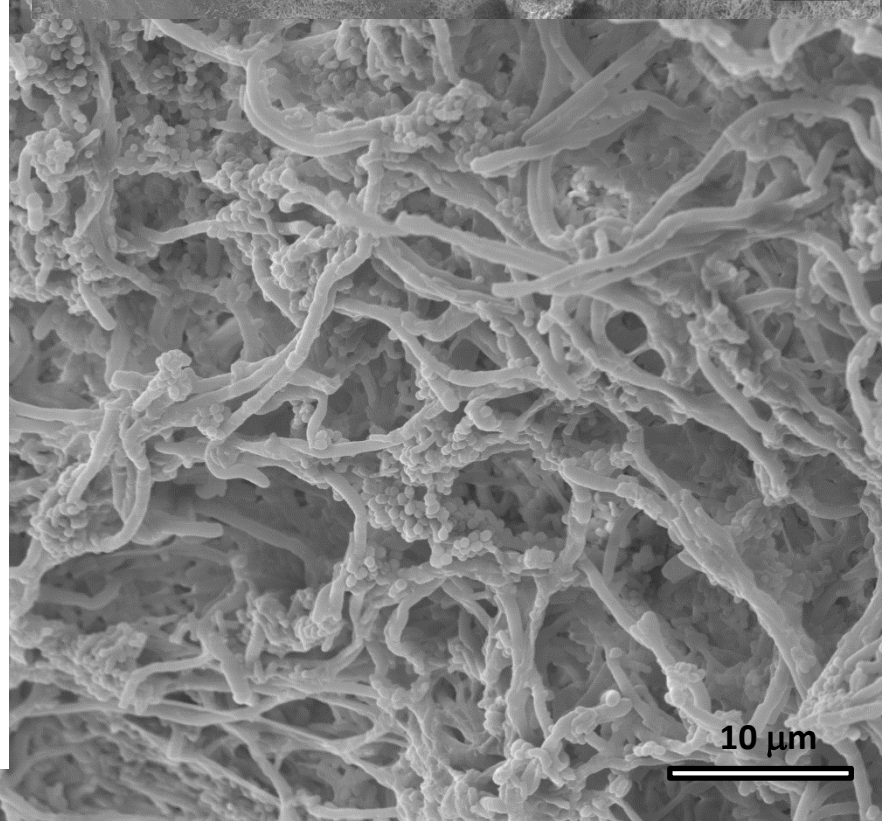
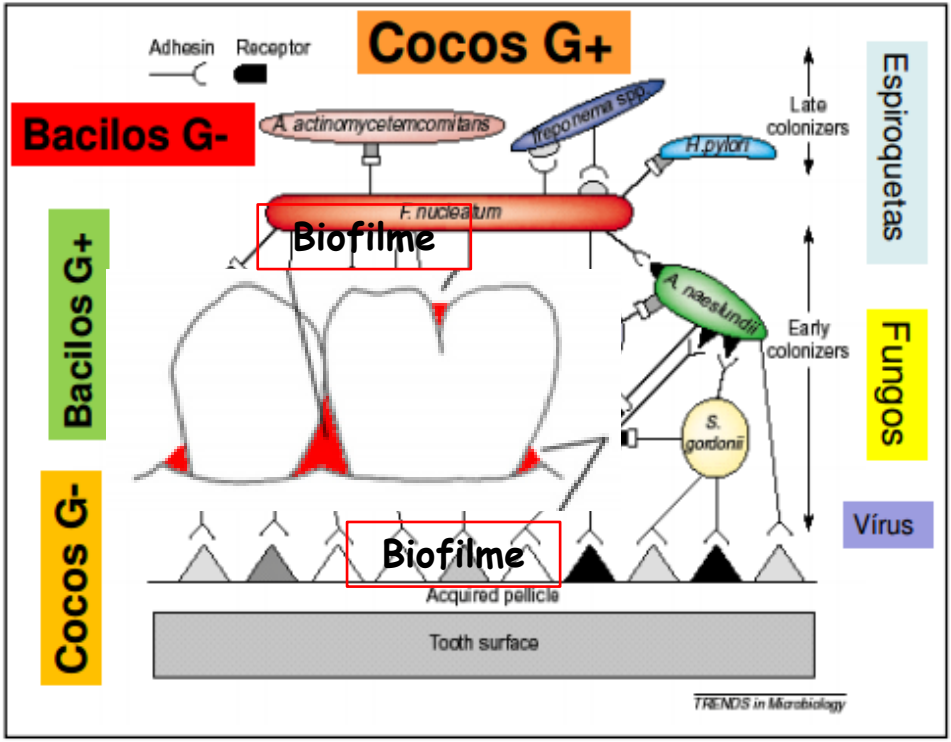
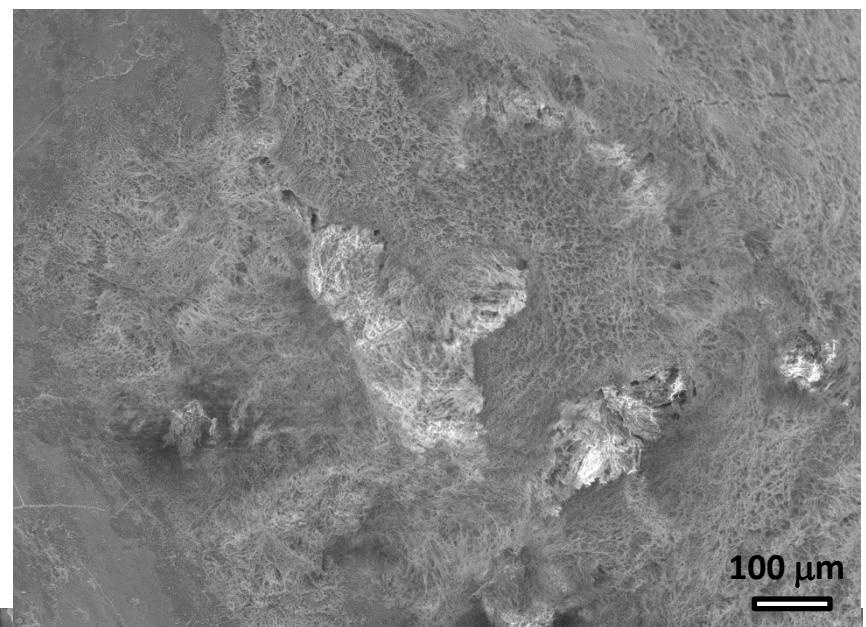
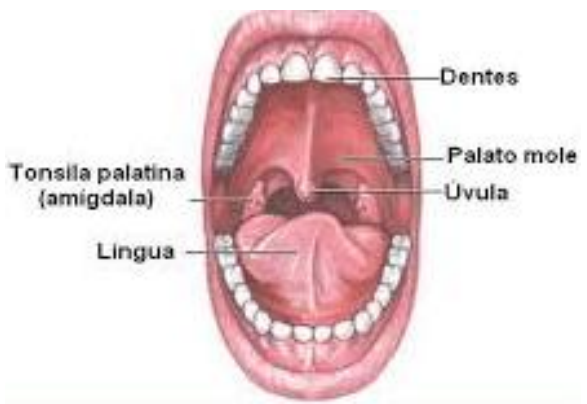
Formação de biofilme é bactéria dependente

A mesma bactéria forma biofilmes diferentes dependendo da superfície

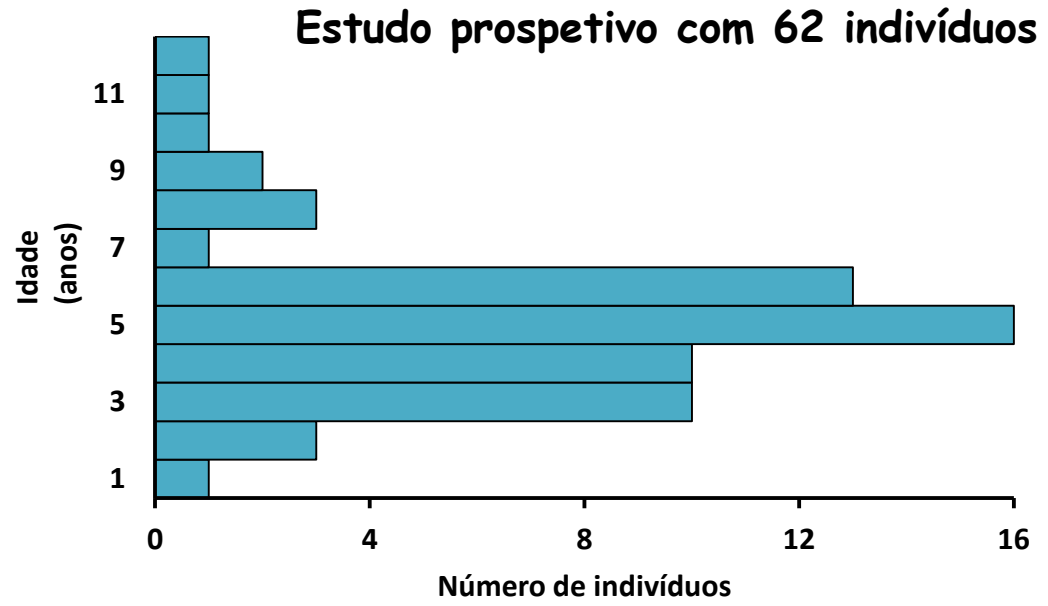
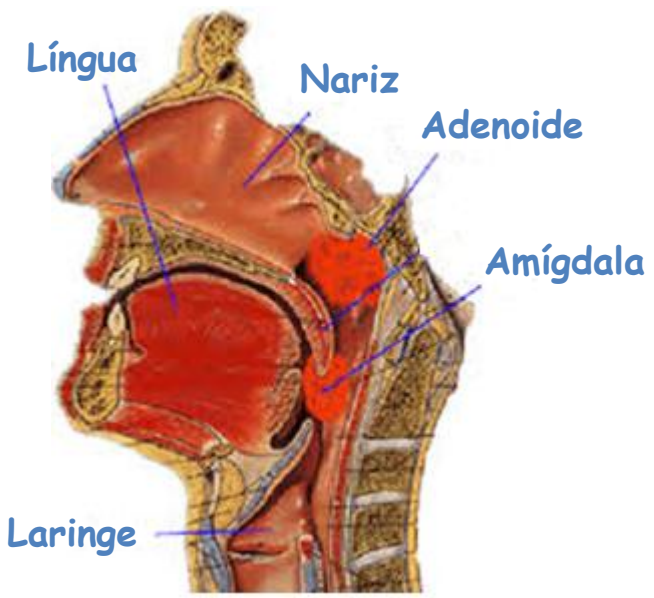
Composição do biofilme (Biomassa/ EPS) é específica da bactéria

Bactérias ambientais - Risco de infecção

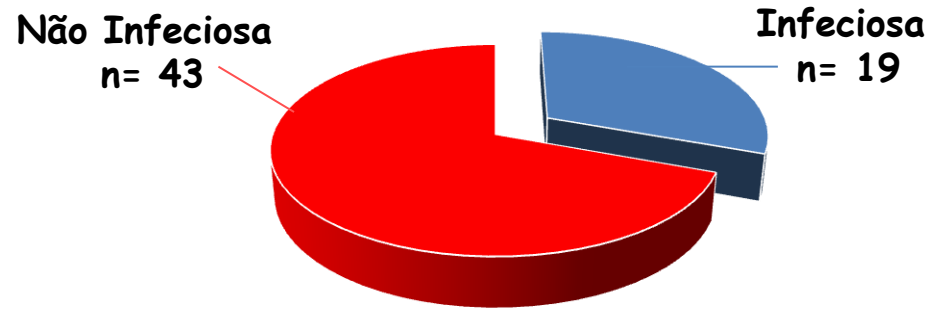
NO corpo humano



Adenoides



Avaliar a relação entre a presença de biofilmes nos adenoides e a incidência de infecções respiratórias altas recorrentes com indicação cirúrgica na criança.



Haemophilus

Neisseria

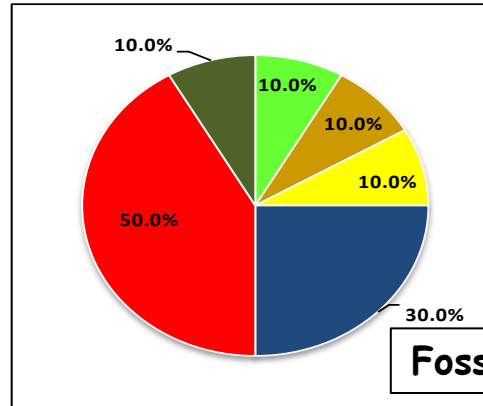
Staphylococcus

Streptococcus

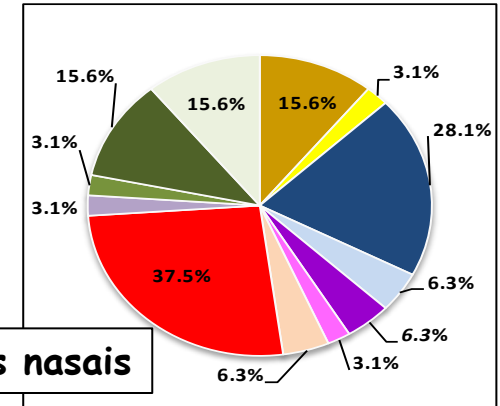
**Maior diversidade nas amostras
não infecciosas**

- *Actinomyces naeslundii*
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*
- *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- *Gemella morbillorum*
- *Granulicatella elegans*
- *Haemophilus influenzae*
- *Haemophilus spp*
- *Kocuria rosea*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Neisseria meningitidis*
- *Neisseria spp.*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus spp*

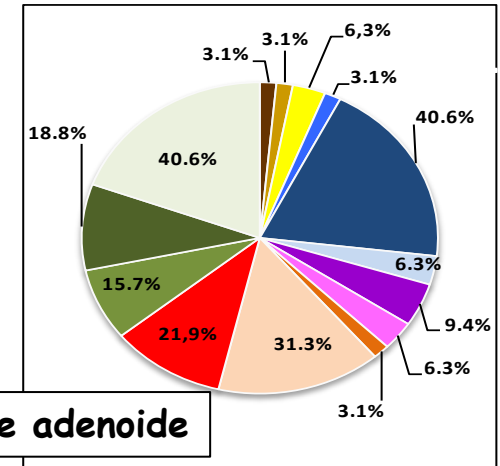
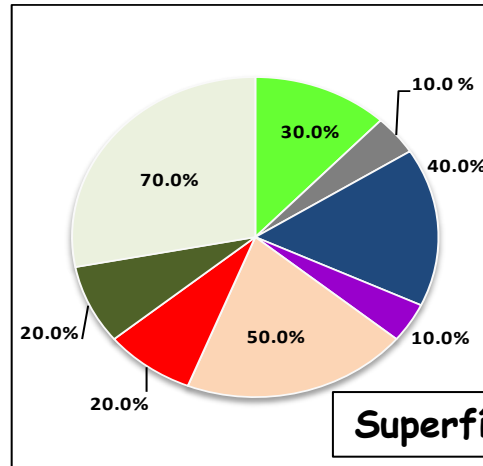
Infeciosa



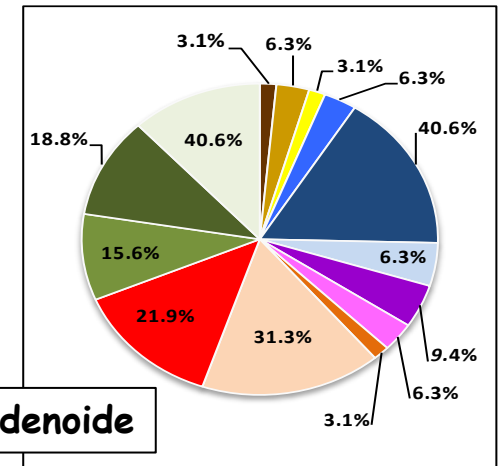
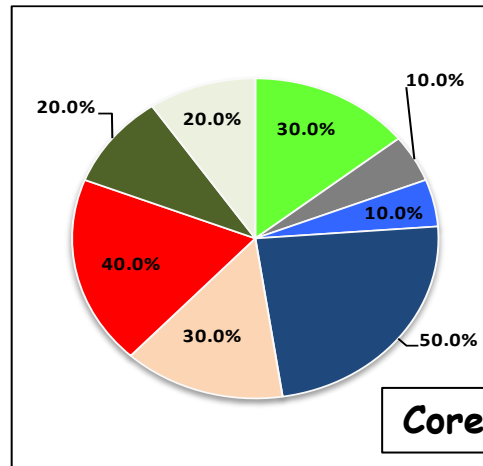
Não infecciosa



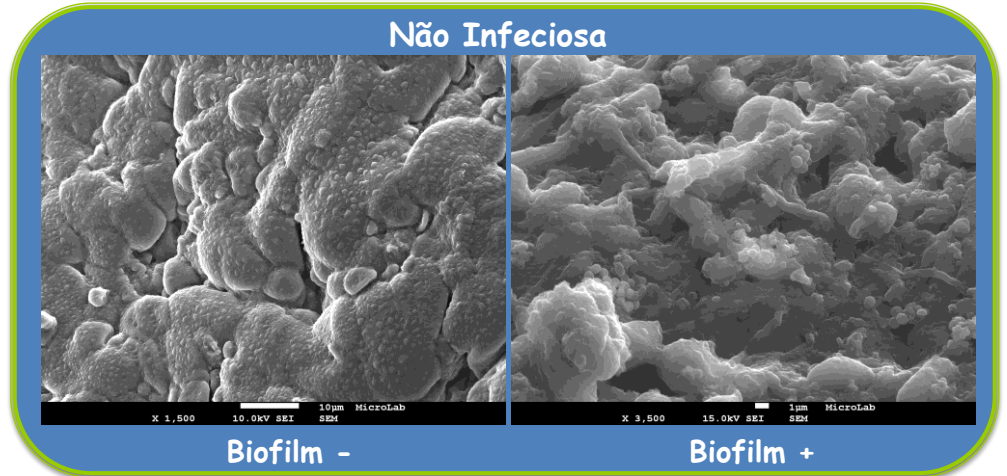
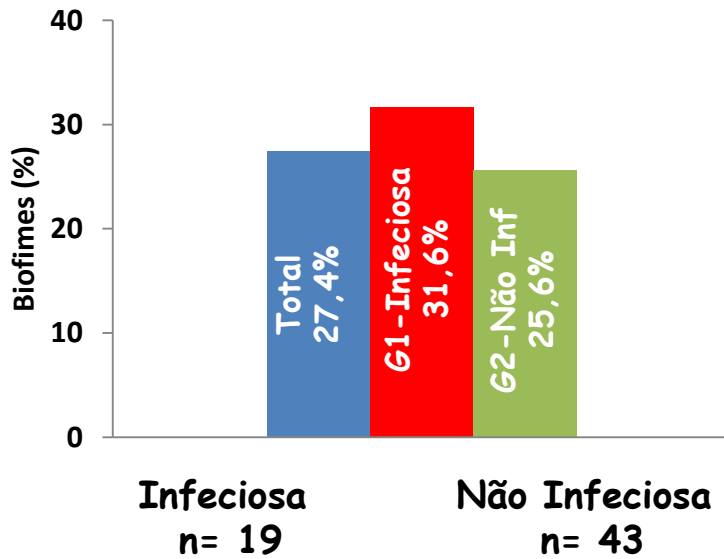
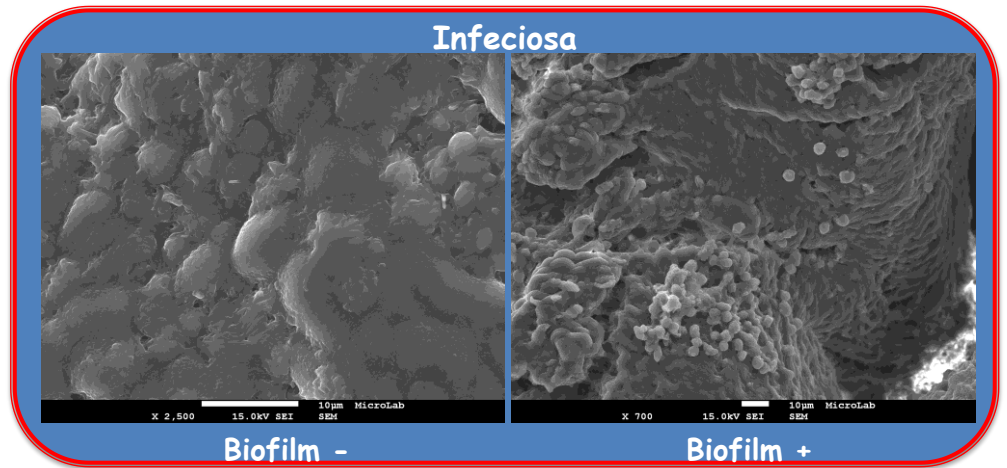
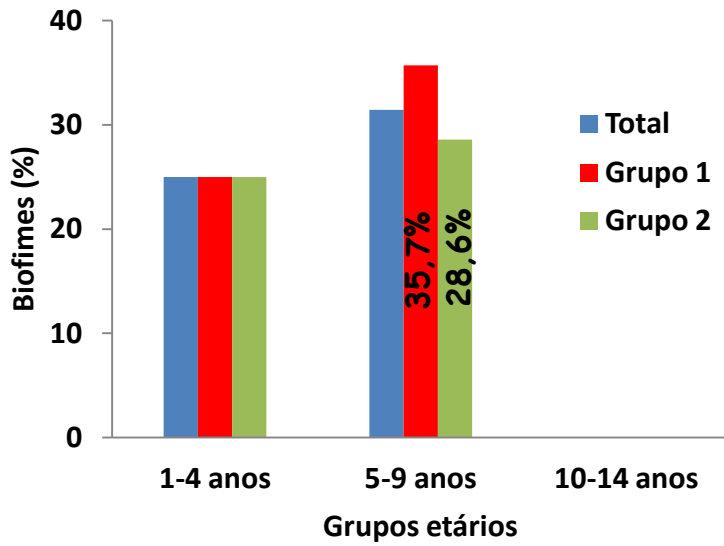
Fossas nasais



Superfície adenoide



Core adenoide



Conclusões

- Biofilmes presentes na superfície do adenoide e a associação entre a colonização da superfície do adenoide e a infecção da mucosa nasal



Adenoides funcionam como reservatório de microrganismos responsáveis por infecções das vias aéreas superiores

- Não existe uma associação com significado estatístico entre a flora da superfície e do core do adenoide

Agradecimentos

INSA

João Carlos Rodrigues, Lúcia Reis

Maria Bandeira, Sara Sousa, Vera Fernandes, Maria Duarte,
Patricia Morgado



FFUL

Aida Duarte



IST

Patricia Almeida Carvalho, Isabel Nogueira



HBA

João Subtil, Luís Freitas, Joana Filipe, Alberto Santos, Carlos Macor,
Sofia Simões, Claudia Vieira

