

Biofilmes, micobactérias não tuberculosas e infeção

Biofilms, nontuberculous mycobacteria and infection

Maria Bandeira¹, Sigurd Wenner², Magda Ferreira¹, Patricia Almeida Carvalho², Luísa Jordão¹

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Foundation for Industrial and Technical Research (SINTEF), Trondheim, Noruega

_Resumo

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são agentes infecciosos emergentes responsáveis por infeções diversas, nomeadamente infeções associadas aos cuidados de saúde. Neste trabalho foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes por duas MNTs (*M. smegmatis* e *M. chelonae*). Os biofilmes foram caracterizados utilizando microscopia eletrónica e a eficácia de diversos desinfetantes foi avaliada contra MNTs recuperadas de biofilmes. Os resultados obtidos demonstram que as MNTs são capazes de formar biofilmes em materiais presentes em ambiente hospitalar e de resistir à ação de diversos desinfetantes.

_Abstract

*Non-tuberculous mycobacteria (NTMs) are emerging infectious agents responsible for various infections, namely, health-care-associated infections. In this work, biofilms assembly by two NTMs (*M. smegmatis* and *M. chelonae*) was assessed. Biofilms were characterized using electron microscopy and the efficacy of several disinfectants was determined against NTMs recovered from biofilms. The results obtained demonstrate that NTMs are able to assemble biofilms on materials present in a hospital environment and to resist the action of various disinfectants.*

_Introdução

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são um grupo heterogéneo constituído atualmente por 197 espécies de microrganismos ambientais (<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>). A sua natureza ubíqua fez com que o seu isolamento de amostras clínicas fosse visto como uma contaminação e/ou colonização não sendo valorizada. A emergência da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana trouxe uma MNT para a ribalta - *M. avium*. Esta MNT era um dos agentes etiológicos de infeções disseminadas nesta população. Atualmente, as MNTs são reconhecidas como agentes etiológicos de infeções diversas incluindo as infeções associadas aos cuidados de saúde (HAIs), que constituem um importante problema de saúde pú-

blica (1,2). Estas bactérias são frequentemente responsáveis pela colonização/infeção do trato respiratório, infeções relacionadas com procedimentos médicos e infeções disseminadas em pacientes imunocomprometidos. Embora *M. avium* continue a ser a MNT mais conhecida, outras MNTs de crescimento rápido, nomeadamente *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, têm vindo a ganhar relevância (3-5).

A transmissão das infeções por MNTs entre humanos carece de demonstração estando estabelecida a transmissão entre uma fonte ambiental e o Homem (6,7). Neste contexto, a presença de MNTs sob a forma de biofilmes em ambiente hospitalar pode constituir um reservatório de infeção para uma população particularmente fragilizada (8,9). A maioria dos microrganismos não vive numa forma isolada (plantónica) mas em comunidades bem organizadas e estruturadas chamadas biofilmes. O biofilme é definido como uma associação de microrganismos aderente a uma superfície biótica ou abiótica, envolvidos por matriz extracelular segregada pelos mesmos constituindo uma estratégia de sobrevivência bem-sucedida (10). Os microrganismos organizados em biofilmes são difíceis de erradicar através dos processos de descontaminação tradicionais, são relativamente resistentes aos desinfetantes, resistentes a antibióticos e são capazes de modular o sistema imunitário do hospedeiro (11). Como tal, as infeções associadas a biofilmes são particularmente difíceis de tratar.

_Objectivo

No presente trabalho, pretendeu-se avaliar a capacidade de duas MNTs de crescimento rápido (*M. chelonae* e *M. smegmatis*) para formar biofilme. O potencial zeta e mobilidade

por deslizamento foram determinadas, bem como a eficácia de vários desinfetantes contra MNTs recuperadas de biofilmes.

Materials e métodos

Micobactérias não tuberculosas

Neste estudo foram utilizadas duas estirpes de referência de MNTs, *M. smegmatis* mc²155 e *M. chelonae* ATCC 35752. As MNTs foram cultivadas em caldo Mueller Hinton (MH) ou em placas de MH agar a 37°C.

Formação de biofilmes

O ensaio de formação de biofilme foi efetuado em placas de 96 poços como descrito anteriormente por Sousa e colegas (12).

Determinação do potencial zeta

Uma alíquota duma cultura em fase exponencial de cada MNT em caldo MH foi centrifugada a 2000rpm por 10 minutos (Megafuge 1.0 Heraeus Instruments). O sobrenadante foi descartado e os sedimentos bacterianos foram fixados com para-formaldeído (PFA) a 4% durante 15 minutos à temperatura ambiente. As bactérias foram lavadas com PBS, centrifugadas e dispersas em água (pH=6,3) de forma a obter densidades óticas a 600nm iguais a 0,4. O potencial zeta foi determinado num Malvern Zetasizer (Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, MALVERN).

Ensaio de mobilidade de MNTs

O ensaio foi efetuado usando meio M63 suplementado com cloreto de magnésio (1mM), glucose (0,2%), casamino acids (0,5%), cloreto ferroso (10µM) solidificado com 0,17% de agar. As colónias de MNTs foram inoculadas no centro da caixa de Petri utilizando um palito estéril. As placas foram seladas com parafilm e incubadas a 37°C até ser visível crescimento (3 dias).

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento (scanning electron microscopy- SEM, em inglês)

Em placas de seis poços foram colocados discos de silicone tendo o biofilme sido preparado como descrito acima. Decorridos três dias, o biofilme formado na superfície do meio de cultura foi transferido para outra caixa. Ambos os biofilmes (sobre o silicone e formado na superfície do MH) foram

lavados com água destilada várias vezes de forma a remover os microrganismos não aderentes. A fixação foi efetuada com uma mistura de PFA e glutaraldeído (GTA), pós-fixação com tetróxido de ósmio seguida de desidratação com uma série alcoólica constituída por soluções de etanol em concentrações crescentes (30% de etanol (v/v) a etanol absoluto). As amostras foram transferidas para um porta-amostras onde foi previamente colocada uma fita de carbono de face dupla, colocadas num exsiccador até ficarem completamente secas. A amostra foi então revestida com um filme de carbono e observada num SEM usando o detetor de eletrões secundários.

Elaboração de tomograma de biofilme usando microscopia eletrónica de varrimento de feixe duplo (focus ion beam scanning electron microscopy- FIB/SEM, em inglês)

Proceder como descrito anteriormente para SEM (eletrões secundários) até ao final da desidratação (etanol absoluto). Proceder à substituição do etanol por resina (p.e. Epon 812). Incubar a resina a 65°C até que esta polimerize. Colocar a amostra num suporte de SEM e cobrir com uma camada de ouro de 100nm. Introduzir a amostra no FIB/SEM (Helios 64 UX dual beam, FEI) e remover fatias da mesma com 30nm de espessura usando uma voltagem de 30 KV e uma intensidade de corrente de 2,4 nA. Adquirir uma micrografia de cada fatia da amostra utilizando uma voltagem de 5 KV, intensidade de 0,1 nA e o detetor de eletrões retrodifundidos. As imagens foram processadas de forma a obter o tomograma utilizando Matlab, Digital Monograph e Avizo.

Determinação da eficácia da atividade dos desinfetantes segundo uma adaptação da norma NF EN 1040:2006

Neste ensaio foram utilizadas MNTs recuperadas por sonicação de biofilmes com três dias de idade formados em caixas de cultura de seis poços. A determinação da eficácia dos desinfetantes foi realizada como preconizado na norma NF EN 1040:2006 (13).

Resultados e discussão

A capacidade de *M. smegmatis* e *M. chelonae* formarem biofilmes foi avaliada. Como se pode observar na [tabela 1](#), o *M. smegmatis* apresenta valores de absorvância superiores aos do *M. chelonae* ao fim de três dias, indicando que é melhor formador de biofilmes. Uma vez que está descrito que o potencial zeta e a mobilidade em meio sólido por deslizamento estão associadas à formação de biofilme, procedemos à sua avaliação [\(14,15\)](#). Quanto menor for o valor de potencial zeta da membrana micobacteriana menor será a capacidade dessa MNT formar biofilme [\(16\)](#). O valor mais elevado de potencial zeta foi observado para *M. smegmatis* ($-39,7 \pm 1,01$ mV- [tabela 1](#)). Este resultado está de acordo com o descrito na literatura. O mesmo foi observado para a mobilidade por deslizamento uma vez que a MNT que exibiu maior mobilidade (*M. smegmatis*) é a melhor formadora de biofilme e vice-versa ([tabela 1](#)). O deslizamento (*sliding*, em inglês) é definido como o mecanismo através do qual uma bactéria é capaz de se espalhar sobre uma superfície sem ação de flagelos [\(15\)](#). No caso das micobactérias existe uma relação diretamente proporcional entre o deslizamento sobre uma superfície e a formação de biofilmes [\(17\)](#). O movimento resulta duma diminuição do atrito devida à interação entre forças geradas no seio da comunidade bacteriana e a superfície sólida sobre a qual se encontram [\(17\)](#).

A presença de biofilmes de microrganismos, potencialmente patogénicos para o Homem, em unidades hospitalares podem

funcionar como reservatórios representando um aumento do risco de infeção. Por esta razão avaliamos a capacidade das MNT formarem biofilme sobre silicone, um material amplamente utilizado como revestimento de utensílios médicos de uso múltiplo não suscetíveis de serem esterilizados por ação do calor húmido. À semelhança do que observamos anteriormente para *K. pneumoniae* [\(18\)](#), também as MNTs foram capazes de formar biofilmes sobre silicone. Na [figura 1A](#) é apresentada uma micrografia representativa dos biofilmes observados para *M. chelonae*. Contudo, as MNTs apresentaram a particularidade de formarem um biofilme na interface ar/líquido, ou seja, na superfície do meio de cultura. Como se pode observar na [figura 1B](#) para *M. chelonae*, o biofilme formado na superfície do meio de cultura é bastante mais compacto do que o biofilme formado sobre o silicone, sendo particularmente rico em matriz extracelular (evidenciada na figura pelas setas azuis). Esta capacidade evidenciada pelas MNTs representa um fator de risco adicional e pode contribuir para a sua propagação através dos sistemas de distribuição de água [\(19\)](#).

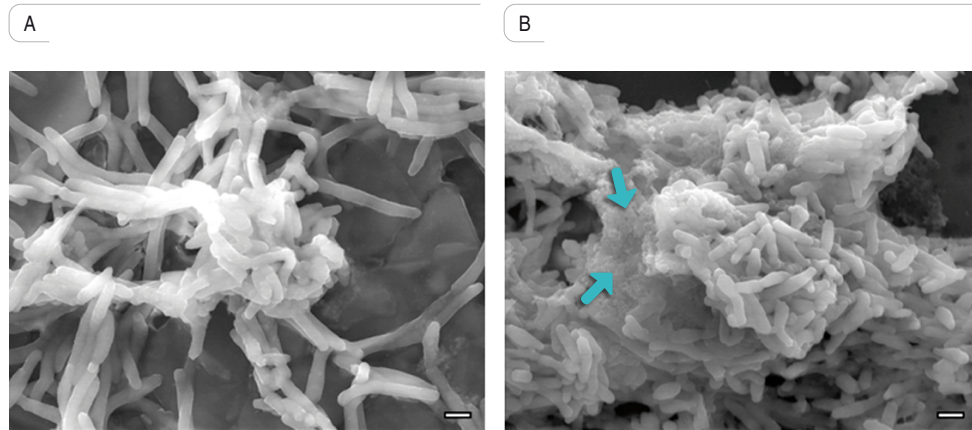
O biofilme de *M. smegmatis* formado na interface ar/líquido é muito semelhante a uma película tendo sido descrito que a mobilidade por deslizamento está envolvida na formação do mesmo [\(20\)](#). Na [figura 2](#) é apresentado um biofilme representativo desta MNT com três dias. Para além duma micrografia obtida por SEM em modo de eletrões secundários [\(2A\)](#) são também apresentadas micrografias obtidas por FIB/SEM em modo de eletrões retrodifundidos [\(2B\)](#) que uma vez integradas originam um tomograma [\(2C\)](#). Esta abordagem permite-nos ter uma estrutura tridimensional do biofilme. Tal permite observar, por exemplo, a existência de canais no interior do biofilme que podem facilitar a circulação de nutrientes ou outras substâncias. A utilização do FIB-SEM permite uma análise mais detalhada e precisa do que a anteriormente utilizada por nós permitindo aumentar o conhecimento sobre a estrutura interna do biofilme [\(12\)](#).

Uma forma de diminuir a possibilidade de infeções será erradicar os biofilmes através da desinfeção das superfícies. Assim, o último passo deste trabalho consistiu na avaliação da eficá-

Tabela 1: Micobactérias não tuberculosas (MNTs): biofilmes e propriedades associadas.

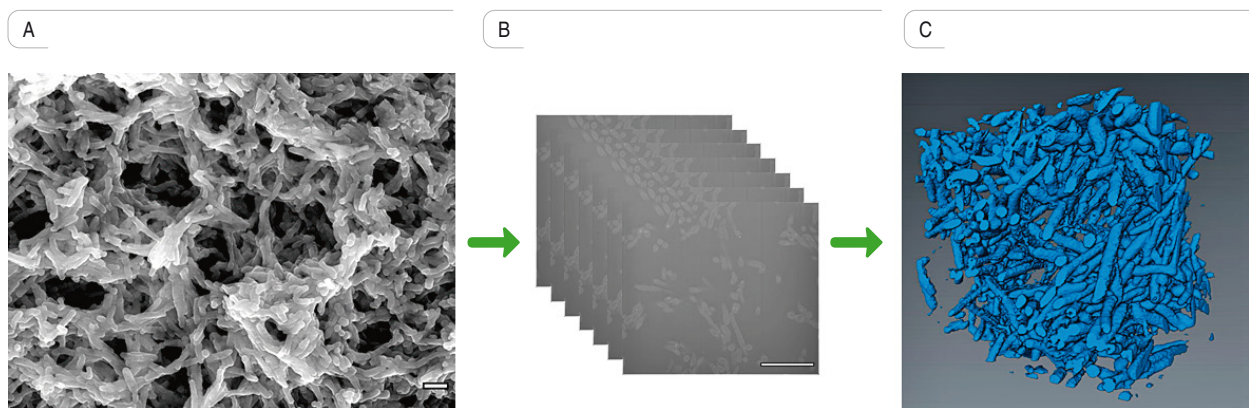
MNT	Biofilme OD 570nm	Potencial zeta (mV)	Mobilidade
<i>M. smegmatis</i>	1,195	$-39,7 \pm 1,01$	
<i>M. chelonae</i>	0.415	$-55,7 \pm 1,58$	

Figura 1: ⬇️ Biofilme de *M. chelonae*.



Micrografia de um biofilme de *M. chelonae*, formado ao fim de três dias, sobre silicone (A) e na interface líquido/ar (B) onde é notório o aumento da matriz extracelular (setas azuis). Barras de escala 1µm.

Figura 2: ⬇️ Biofilme de *M. smegmatis*.



Micrografia de um biofilmes de *M. smegmatis*, formado ao fim de três dias, na interface líquido/ar obtido por SEM utilizando um detetor de eletrões secundários (A), ou eletrões retrofundidos (B) e a reconstrução em 3D (C). Barras de escala na figura A e B são de 1µm e 5µm, respetivamente.

cia de vários desinfetantes (peróxido de hidrogénio- H_2O_2 , hipoclorito de sódio- NaClO, desinfetante à base de glutaraldeído- GTA e desinfetante à base de sais quaternários de amónio- SQA) em MNTs recuperadas de biofilmes (tabela 2). O desinfetante com SQA é eficaz para ambas as espécies independentemente das condições do ensaio, pelo contrário o peróxido de hidrogénio é ineficaz independentemente das condições testadas. Para o NaClO e GTA a eficácia do desinfetante depende do tempo de contacto e/ou concentra-

ção sendo, numa forma geral, o *M. chelonae* mais fácil de erradicar do que o *M. smegmatis*. Estes resultados não são tranquilizadores por diversas razões: (i) os ensaios foram realizados em condições “limpas” que favorecem a atividade do desinfetante, (ii) as MNTs foram recuperadas do biofilme, ou seja, estavam mais acessíveis à ação do desinfetante e (iii) tanto *M. smegmatis* como *M. chelonae* possuem porinas na sua membrana o que facilita a ação do biofilme. Daqui se depreende que não é fácil eliminar biofilmes de MNT.

Tabela 2: Avaliação da eficácia de desinfetantes contra micobactéria não tuberculosa (MNT).

Desinfetante*	Tempo** (min)	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. chelonae</i>
H ₂ O ₂ 3%	5	NE	NE
	15	NE	NE
H ₂ O ₂ 9%	5	NE	NE
	15	NE	NE
NaClO 0,1%	5	NE	NE
	15	NE	NE
NaClO 5%	5	NE	E
	15	NE	E
GTA 0,4%	5	NE	E
	15	E	E
GTA 7%	5	E	E
	15	E	E
SQA 0,2%	5	E	E
	15	E	E
SQA 3,9%	5	E	E
	15	E	E

* Princípio ativo do desinfetante: glutaraldeído (GTA) e sais quaternários de amónio (SQA).

** Tempo de contacto com o desinfetante; NE=não eficaz; E=eficaz

Conclusão

As MNTs têm capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies funcionando como potenciais reservatórios de agentes infecciosos, ou seja, focos de infeção.

O resultado da eficácia de desinfetantes sugere que a melhor estratégia para combater as infeções associadas a biofilmes de MNT é prevenir a formação dos mesmos.

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2012: reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of surgical site infections and prevention indicators in European hospitals - HAI-Net SSI protocol, version 2.2. Stockholm: ECDC, 2017. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/HAI-Net-SSI-protocol-v2.2.pdf>
- (3) Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. Clin Infect Dis. 2001;33(8):1363-74.
- (4) De Groot MA, Huit G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin Infect Dis. 2006;42(12):1756-63.
- (5) Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak Cet al.; Nontuberculous Mycobacteria Network European Trials Group. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013;42(6):1604-13. <http://erj.ersjournals.com/content/42/6/1604.long>
- (6) Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. Appl Environ Microbiol. 2002;68(11):5318-25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129932/>
- (7) Falkingham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev. 1996;9(2):177-215. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC129932/>
- (8) Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001;358(9276):135-8.
- (9) Francolini I, Donelli G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;59(3):227-38. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00665.x>
- (10) Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, et al. The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). J Clin Diagn Res. 2012;6(9):1478-82. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3527774/>
- (11) Bryers JD. Medical biofilms. Biotechnol Bioeng. 2008;100(1):1-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706312/>
- (12) Sousa S, Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, Jordao L. Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. Int J Mycobacteriol. 2015;4(1):36-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.065/>
- (13) NF EN 1040:2006. Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide de base des antiseptiques et des désinfectants chimiques - Méthode d'essai et prescriptions (phase 1).
- (14) Tariq M, Bruijs C, Kok J, et al. Link between culture zeta potential homogeneity and Ebp in Enterococcus faecalis. Appl Environ Microbiol. 2012;78(7):2282-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302607/>
- (15) Martínez A, Torello S, Kolter R. Sliding motility in mycobacteria. J Bacteriol. 1999;181(23):7331-8. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103697/>
- (16) Pang CM, Hong P, Guo H, et al. Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. Environ Sci Technol. 2005;39(19):7541-50.
- (17) Shi T, Fu T, Xie J. Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of Mycobacterium smegmatis. Curr Microbiol. 2011;63(5):470-6.
- (18) Bandeira M, Borges V, Gomes JP, et al. Insights on Klebsiella pneumoniae Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. Microorganisms. 2017;5(2). pii: E16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488087/>
- (19) Bordi C, de Bentzmann S. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. Ann Intensive Care. 2011;1(1):19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224501/>
- (20) Ojha A, Hatfull GF. The role of iron in Mycobacterium smegmatis biofilm formation: the exochelin siderophore is essential in limiting iron conditions for biofilm formation but not for planktonic growth. Mol Microbiol. 2007;66(2):468-83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2170428/>