I Congresso Internacional
em Saúde e Desenvolvimento Socioambiental
Garanhuns, Brasil
2024

ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM RHODOCOCCUS EQUI ISOLADOS DE POTROS ACOMETIDOS NO AGRESTE DE PERNAMBUCO

Alysson Paulo dos Santos Godoi[1,2]
alysson.godoi@ufrpe.com
Vitória Irene da Silva Albuquerque[1]
vitoriairsilva99@gmail.com
Aline Oliveira da Silva[2]
aline.oliveirasilva@ufape.edu.br
Elizabete Rodrigues da Silva[2]
elizabete.rodrigues@ufape.edu.br
Marcelo Mendonça[2]
marcelo.mendonca@ufape.edu.br

[1]Universidade Federal Rural de Pernambuco
[2]Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

INTRODUÇÃO

A rodococose equina é considerada a causa mais comum de broncopneumonia granulomatosa subaguda ou crônica em potros com menos de 5 meses de idade (Sanz, 2023). Seu agente etiológico, *Rhodococcus equi* é um microrganismo intracelular facultativo, Gram-positivo aeróbico e imóvel, apresentando formato de cocos ou cocobacilos e colônias mucóides, não hemolíticas, de coloração rosa-salmão. Nas últimas décadas diversos trabalhos demonstraram a capacidade de *R. equi* em causar doença em humanos, especialmente indivíduos imunocomprometidos (Ribeiro *et al.*, 2011; Vázquez-Boland e Meijer, 2019) .

A presença de um plasmídeo de virulência é considerada como o fator central responsável pela virulência do patógeno (Stranahan *et al.*, 2018; Takai *et al.*, 1991). Entretanto, outros fatores podem estar associados ao desenvolvimento da enfermidade e à resistência aumentada ao tratamento antimicrobiano dos pacientes acometidos (Anastasi *et al.*, 2015; Higgins e Huber, 2023). Estudos realizados analisando a formação de biofilme por R. *equi* demonstraram que um aumento da tolerância a antibióticos em células presentes nos biofilmes em até dez vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) (Gressler *et al.*, 2015; Rampacci *et al.*, 2019). Dessa maneira, esse estudo teve como objetivo, analisar a capacidade de produção de biofilme de quatro isolados de potros acometidos no Agreste de Pernambuco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 4 isolados (Rhodo1, 2, 3, e 4) obtidos de quatro potros que vieram a óbito num haras no Agreste de Pernambuco, genotipicamente identificados como *R. equi* através de análises moleculares (Ladrón et al., 2003). A avaliação da formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Bujold, Lani e Sanz (2019), com modificações. Para padronização do inóculo inicial em UFC de entrada de ~ 10^5 UFC/mL, realizou-se um ensaio de diluição seriada, dos isolados crescidos em caldo BHI por 24h. Padronizado o inóculo, 100 µL de cultura bacteriana de cada isolado a 0h pós-inoculação foram adicionados a seis poços em paralelo de uma placa de 96 poços (Greiner Bio-One, Brazil). A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle positivo, sendo adicionada no mesmo volume em dez poços. Para controle negativo, adicionou-se caldo BHI estéril em dez poços por placa. Para controle intraespecífico, as cepas *R. equi* ATCC 6939, *R. equi* 103+ e R. *equi* 103- (*plasmid cured*) foram utilizadas. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24, 48 ou 72 horas. Após o período de incubação, deu-se a remoção do caldo por sucção suave e inversão em papel toalha. Posteriormente, os poços foram fixados termicamente a 56 °C durante 20 min, e então corados com violeta de cristal (0,1%). Em seguida, lavados 3-5 vezes com água destilada, secos ao ar e descorados

com etanol a 70%. A absorbância foi medida a 595nm usando um leitor de microplacas Asys UVM 340 (Biochrom, Cambridge, UK).

Para a interpretação e classificação dos resultados dos isolados, foi utilizado o critério estabelecido por Darwish e Asfour (2013) com modificações. A partir da medição da densidade óptica (OD) de cada poço, a OD de corte (ODc) foi definido no valor de três desvios padrão acima da OD média do controle negativo. As cepas foram interpretadas da seguinte forma: (1) não produtoras de biofilme (OD ≤ ODc); (2) fracas produtoras de biofilme (ODc < DO ≤ 2 × ODc); (3) moderadas produtoras de biofilme (2 × ODc < DO ≤ 4 ×ODc); (4) fortes produtoras de biofilme (4 × ODc < OD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, de acordo com os critérios de avaliação, às 24h todas as cepas, com exceção do *R. equi* 103+, apresentaram uma fraca produção de biofilme. Às 48h, todas as cepas apresentaram uma elevação da DO média, e a cepa Rhodo1 passou a apresentar uma formação moderada de biofilme, assim como o controle positivo, *S. aureus* ATCC 25923. No entanto, as cepas entanto, as cepas *R. equi* 103+ e *R. equi* 103-, de acordo com os critérios interpretativos adotados, não apresentaram formação do biofilme. Às 72h observou-se as maiores DO's médias de todos os isolados. Os isolados Rhodo1, Rhodo2 e a cepa controle *R. equi* 103- apresentaram uma formação moderada de biofilme, enquanto os isolados Rhodo3 e 4 apresentaram uma fraca formação. O controle positivo foi considerado como apresentando uma forte formação de biofilme.

Todas as cepas foram produtoras de biofilme. Demonstrou-se ainda haver variação na capacidade de formação entre os isolados clínicos estudados, em razão de que, às 72h, dois dos quatro isolados clínicos estudados demonstraram ser produtores moderados e os outros dois isolados fracos produtores.

A capacidade de formação de biofilme é considerada um fator de virulência em patógenos bacterianos em razão da tolerância aumentada aos compostos antimicrobianos e persistência da infecção (Sauer *et al.*, 2022). Um trabalho realizado com cepas isoladas no sul do Brasil observou que nenhuma das concentrações de três antimicrobianos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) testados em pelo menos 4 vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) para bactérias na forma planctônica não foi capaz de erradicar *R. equi* no biofilme (Gressler *et al.*, 2015). Esse aumento na tolerância também foi observado em um trabalho realizado na Itália, que relatou que o aumento das concentrações MIC de antimicrobianos em dez vezes, sozinhos ou em combinação, não foi capaz de erradicar completamente os biofilmes pré-formados de *R. equi* (Rampacci *et al.*, 2019). A formação de biofilme por *R. equi* também possui importância na medicina humana, como demonstrou um trabalho realizado em catéteres obtidos de pacientes com câncer que apresentaram uma bacteremia persistente por *R. equi* apesar do tratamento antimicrobiano(Akhrass, Al *et al.*, 2012), constatou-se que todos os isolados aderiram à superfície de cateteres venosos centrais (CVC) de poliuretano, formando biofilme.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de isolados de *R. equi* capazes de formação de biofilme no Agreste de Pernambuco é de importante atenção no que concerne à terapêutica da infecção, não somente em Medicina Veterinária, como também no aspecto da Saúde Pública, uma vez que este patógeno possui potencial zoonótico.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhodococcus equi*; biofilme; Nordeste.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio a este trabalho, da bolsa concedida a APSG – Código de Financiamento 001.

Referências

AKHRASS, F. AL; WOHOUSH, I. AL; CHAFTARI, A. M.; REITZEL, R.; JIANG, Y.; GHANNOUM, M.; TARRAND, J.; HACHEM, R.; RAAD, I. Rhodococcus Bacteremia in Cancer Patients Is Mostly Catheter Related and Associated with Biofilm Formation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32945, 13 mar. 2012.

ANASTASI, E.; GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L. J.; HONDALUS, M. K.; WILLINGHAM-LANE, J. M.; MACARTHUR, I.; COHEN, N. D.; ROBERTS, M. C.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Novel transferable *erm* (46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkv279, 16 set. 2015.

BUJOLD, A. R.; LANI, N. R.; SANZ, M. G. Strain-to-strain variation of Rhodococcus equi growth and biofilm formation in vitro. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 19 ago. 2019.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. C. DE; COSTA, M. M. DA; SUTILI, F. J.; SCHWAB, M.; PEREIRA, D. I. B.; SANGIONI, L. A.; BOTTON, S. DE A. Biofilm formation by Rhodococcus equi and putative association with macrolide resistance. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 10, p. 835–841, out. 2015.

HIGGINS, C.; HUBER, L. Rhodococcus Equi : Challenges to Treat Infections and to Mitigate Antimicrobial Resistance. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 127, p. 104845, 2023.

LADRÓN, N.; FERNÁNDEZ, M.; AGÜERO, J.; GONZÁLEZ ZÖRN, B.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; NAVAS, J. Rapid identification of Rhodococcus equi by a PCR assay targeting the choE gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3241–3245, 1 jul. 2003.

RAMPACCI, E.; MARENZONI, M. L.; GIOVAGNOLI, S.; PASSAMONTI, F.; COLETTI, M.; PIETRELLA, D. Phenotypic Characterization of Rhodococcus equi Biofilm Grown In Vitro and Inhibiting and Dissolving Activity of Azithromycin/Rifampicin Treatment. **Pathogens 2019, Vol. 8, Page 284**, v. 8, n. 4, p. 284, 4 dez. 2019.

RIBEIRO, M. G.; TAKAI, S.; GUAZZELLI, A.; LARA, G. H. B.; SILVA, A. V. DA; FERNANDES, M. C.; CONDAS, L. A. Z.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T. Virulence genes and plasmid profiles in Rhodococcus equi isolates from domestic pigs and wild boars (Sus scrofa) in Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 478–481, dez. 2011.

SANZ, M. G. Rhodococcus equi–What is New This Decade? **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 39, n. 1, p. 1–14, 1 abr. 2023.

SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 10, p. 608–620, 3 out. 2022.

STRANAHAN, L. W.; PLUMLEE, Q. D.; LAWHON, S. D.; COHEN, N. D.; BRYAN, L. K. Rhodococcus equi Infections in Goats: Characterization of Virulence Plasmids. **Veterinary Pathology**, v. 55, n. 2, p. 273–276, 1 mar. 2018.

TAKAI, S.; SEKIZAKI, T.; OZAWA, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent Rhodococcus equi. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 4056–4060, 1991.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; MEIJER, W. G. The pathogenic actinobacterium Rhodococcus equi: what's in a name? **Molecular Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 1–15, 1 jul. 2019.