

Título em Português:

Avaliação de compostos em patógenos bacterianos multirresistentes como parte do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos - CIBFar

Título em Inglês:

EVALUATION OF COMPOUNDS IN MULTIRESTANT BACTERIAL PATHOGENS AS PART OF THE CENTER FOR INNOVATION IN BIODIVERSITY AND DRUG DISCOVERY (CIBFar)

Autor:

Gabriella Vidal Carnielli

Instituição:

Universidade de São Paulo

Unidade:

Instituto de Física de São Carlos

Orientador:

Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Biotecnologia

Agência Financiadora:

USP - Programa Unificado de Bolsas

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS EM PATÓGENOS BACTERIANOS MULTIRRESISTENTES COMO PARTE DO CENTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E FÁRMACOS - CIBFar

Gabriella Vidal Carnielli

Iago Silva e Carvalho

Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo

Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos

gabriellavidal@usp.br

Objetivos

Atualmente, de acordo com o relatório anual de 2020 da Organização Mundial da Saúde, o mundo ainda não está conseguindo desenvolver tratamentos antibacterianos necessários, apesar da crescente conscientização sobre a ameaça urgente da resistência aos antimicrobianos. Em vista disso, entende-se que é fundamental produzir tecnologias eficazes para controlar estes microrganismos. Dessa forma, a pesquisa no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo) tem como principal objetivo avaliar a ação antimicrobiana de novos compostos frente às bactérias denominadas ESKAPE, acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp., a partir de extratos enviados por integrantes do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBfar).

Métodos e Procedimentos

Para a realização da triagem dos compostos, são utilizadas 8 linhagens de bactérias da coleção de cultura americana (ATCC) padrão. Nesta etapa, para verificar a atividade do composto, utiliza-se a concentração mais alta, fixada em 512 µg/ml. Caso haja inibição do

crescimento bacteriano, determinado de forma visual, o composto é submetido a testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) embasado nas normas do CLSI (2003). A determinação da CIM é feita a partir de um gradiente de concentração, iniciada em 512 µg/ml em diluições seriadas (1:2) até 0,06 µg/ml. Após incubação de 24 horas a 37°C, determina-se a CIM a primeira concentração em que não se obteve o crescimento bacteriano. Alíquotas em que não houve crescimento são retiradas dos poços e semeadas em gota em meio *Mueller Hinton Cation Ajustado* sem antibiótico para determinação da CBM. Após a incubação, determina-se a CBM na concentração em que não houve crescimento de colônias. Para tanto, considerou-se que os compostos que tiveram a razão de CBM/CIM ≤ 4 , foram consideradas bactericidas, as com razão CBM/CIM > 4 foram consideradas bacteriostáticas. Para estudo da capacidade de erradicação de biofilme, como controles do teste são utilizadas linhagens de má formadora de biofilme, a *S. epidermidis* ATCC 12228 e a boa formadora de biofilme *S. epidermidis* ATCC 35984. O biofilme formado pela ATCC 35984 é usado para avaliar a atividade antibiofilme dos compostos. Ambas as linhagens são incubadas durante 24 horas a 35°C em caldo *Brain Heart Infusion (BHI)* suplementado com glicose 0,75%. Em seguida, lava-se os poços com PBS e adiciona-se meio fresco nas amostrar controle e meio fresco com

composto a 512 µg/ml em poços com ATCC 35984 para o teste. Após incubação, lava-se novamente com PBS, adiciona-se cristal violeta. Após lavagem com PBS, extrai-se o cristal violeta com etano:acetona (80:20) que é transferido para uma outra microplaca para quantificação indireta do biofilme a 595nm. Finalmente, os resultados são submetidos a testes estatísticos ANOVA e t-Student bicaudal, considerando que quando $p < 0,05$ existe uma redução significativa e assim esta variação de crescimento define a erradicação de biofilme em porcentagem.

Resultados

Ao todo, foram analisados 88 extratos submetidos aos diferentes testes, sendo que, 70 passaram pelo processo de triagem inicial, mas apenas 5 obtiveram resultado positivo nesta triagem (Figura 1). Em seguida, aqueles em que se obteve um resultado positivo na triagem passaram para a determinação da CIM e CBM. Dezoito compostos foram diretamente para a determinação da CIM, já que não havia extrato suficiente para a triagem inicial.

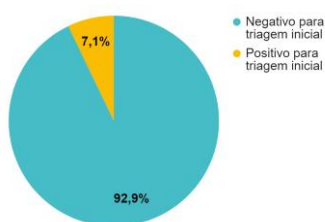


Figura 1: Resultado da etapa de triagem inicial

Observou-se que uma maior quantidade de compostos ativos estavam na faixa de CIM entre 8 a 32 µg/ml (Tabela 1). Quanto menor a CIM, melhor são as chances do extrato apresentar resultados positivos em testes futuros.

Tabela 1 – Quantidade de compostos ativos para cada linhagem de bactéria

Linhagens Bacterianas	Quantidade de compostos ativos em cada faixa de CIM (µg/ml)			
	0.06 a 4	8 a 32	64 a 256	512
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0	3	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC25923	0	1	1	1
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0	0	2	2
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	0	2	1	2
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	0	1	1	0
<i>E. coli</i> ATCC25922	0	2	0	1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0	2	1	1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	1	2	1

Dos 48 compostos testados, 37 reduziram o biofilme pelo menos uma linhagem Figura 2.

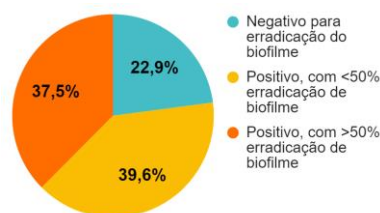


Figura 2 – Resultado geral de compostos testados em biofilme pré-formados

Conclusões

De maneira geral, os testes apresentados foram promissores para uma próxima etapa de desenvolvimento de um possível antimicrobiano, levando em consideração que os valores obtidos para triagem inicial, refletem a realidade observada na indústria farmacêutica, que pouco tem investido no desenvolvimento de antimicrobianos devido ao grande custo para seu desenvolvimento. Os testes *in vitro* são os indicadores iniciais de um potencial fármaco, sendo fundamentais para canalizar as próximas etapas de elaboração do fármaco e estudos pré-clínicos e clínicos.

Referências Bibliográficas

Clinical And Laboratory Standarts Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing. In: 23th Informational Supplement. CLSI document M100- S23. Wayne: 2013

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018)**. Brasil. Ministério da Saúde. Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde, p. 307–327, 2018.

ORGANISATION, W. H. **2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development**. Geneva: [s.n.]

EVALUATION OF COMPOUNDS IN MULTIRESISTANT BACTERIAL PATHOGENS AS PART OF THE CENTER FOR INNOVATION IN BIODIVERSITY AND DRUG DISCOVERY (CIBFar)

Gabriella Vidal Carnielli

Iago Silva e Carvalho

Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo

University of São Paulo – São Carlos Institute of Physics

gabriellavidal@usp.br

Objectives

Nowadays, according to the World Health Organization's 2020 annual report, the world is still unable to prepare antibacterial treatments, despite growing awareness of the urgent threat of antimicrobial resistance. It is essential to produce effective technologies to control these microorganisms. Thus, a research at the Laboratory of Epidemiology and Molecular Microbiology (LEMiMo) aims to evaluate the antimicrobial action of new compounds against bacteria called ESKAPE, an acronym for *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp., through extracts sent by members of the Center for Innovation in Biodiversity and Drug Discovery (CIBFar)

Materials and Methods

Eight American Type Culture Collection (ATCC) bacterial strains are used to carry out the compounds screening. In this step, the highest concentration of the compounds is used (512 µg/ml) to verify their activities. If there is inhibition of bacterial growth, the compound is submitted to tests to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) based on CLSI (2013) standards. The MIC is determined from a concentration gradient, ranging from 512

µg/ml to 0.06 µg/ml, in two-fold dilutions. After incubating 24 hours at 35°C, the MIC is determined to be the first concentration with no bacterial growth. Aliquots in which there was no growth are removed from the wells and cultivated on *Mueller Hinton Cation Adjusted* without antibiotic. After incubation, CBM is determined at the concentration in which there was no colony growth in the absence of the antimicrobial compound. Therefore, it was considered that the compounds that had MBC/MIC ratio ≤ 4 were considered bactericidal, those with a MBC/MIC ratio > 4 were considered bacteriostatic. To study the biofilm eradication capacity, two strains are used as the test quality control: *S. epidermidis* ATCC 12228, strain of poor biofilm former, and *S. epidermidis* ATCC 35984, the good biofilm former. This biofilm from ATCC 35984 is also used to assess the antibiofilm activity of compounds. Both strains are incubated for 24 hours at 35°C in *Brain Heart Infusion (BHI)* supplemented with 0.75% glucose. Then, the well are washed with PBS and fresh medium is added to the control samples and fresh medium with compound at 512 µg/ml in wells with ATCC 35984 for the test. After incubation, and a washing step with PBS, crystal violet is added. After washing with PBS, the crystal violet is extracted with ethanol:acetone (80:20) and transferred to another microplate for indirect quantification of the biofilm at 595nm. Finally, the results are submitted to two-tailed ANOVA and t-Student statistical tests, considering that when $p < 0.05$ there is a significant reduction and

thus this growth variation defines the biofilm eradication in percentage.

Results

Eighty-eight extracts were analyzed and submitted to different tests, 70 were submitted to the initial screening process, but only 5 presented bacterial activity (Picture 1). for the determination of CIM and CBM. Eighteen compounds went directly to MIC determination, as there was not enough extract for the initial screening.

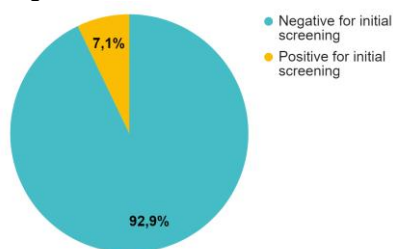


Figure 1: Result of the initial screening step

It was observed that a greater amount of active compounds had the MIC ranging from 8 to 32 µg/ml (Table 1).

Table 1 - Number of active compounds for each bacterial strain

Bacterial Strains	Number of active compounds in each MIC range (µg/ml)				
	0.06 a 4	8 a 32	64 a 256	512	
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	0	3	0	0	
<i>S. aureus</i> ATCC25923	0	1	1	1	
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	0	0	2	2	
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	0	2	1	2	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC700603	0	1	1	0	
<i>E. coli</i> ATCC25922	0	2	0	1	
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	0	2	1	1	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	1	2	1	

Thirty seven out of 48 compounds tested reduced the pre-formed biofilm from at least one strain Figure 2.

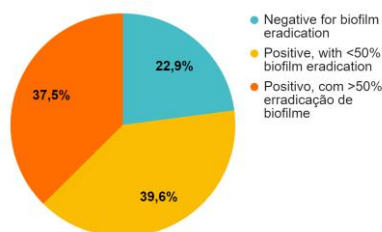


Figure 2 - Overall result of tested compounds in preformed biofilm

Conclusions

In general, the presented tests were promising for the next stage of development of a possible antimicrobial, taking into account that the values obtained for initial screening reflect the reality observed in the pharmaceutical industry, which has invested less in the antimicrobials development due to the large cost for their development. *In vitro* tests are the initial indicators of a potential drug, being essential to indicate the next stages of drug development and pre-clinical and clinical studies.

References

Clinical And Laboratory Standarts Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing. In: 23th Informational Supplement. CLSI document M100- S23. Wayne: 2013

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018)**. Brasil. Ministério da Saúde. Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde, p. 307–327, 2018.

ORGANISATION, W. H. **2020 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development**. Geneva: [s.n.]