

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**ELANE GALVÃO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
*Pseudomonas aeruginosa* EM SONDAS VESICAIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

Dourados/MS  
Outubro/2020

**ELANE GALVÃO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR  
*Pseudomonas aeruginosa* EM SONDAS VESICAIS**

**Orientadora: PROF. Dra. KELLY CRISTINA DA SILVA  
BRABES**

**Dissertação de mestrado submetida ao  
programa de pós-graduação em Ciência e  
Tecnologia Ambiental, como um dos  
requisitos necessários para a obtenção do  
título de mestre em Ciência e Tecnologia na  
área de concentração ciência ambiental.**

Dourados/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237a Santos, Elane Galvao Dos  
AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SONDAS  
VESICAIS [recurso eletrônico] / Elane Galvao Dos Santos. -- 2022.  
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES .  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande  
Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

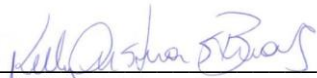
1. Biofilme. 2. sondas vesicais. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. ATCC 27853. I. Brabes, Kelly  
Cristina Da Silva. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

## Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SONDAS VESICAIS**”, de autoria **Elane Galvão dos Santos**, apresentada ao programa de Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



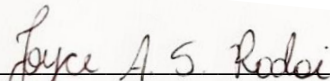
---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Cristina da Silva Brabes – PGTA/UFGD  
Presidente da banca



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Quézia Moura da Silva - FCS/UFGD  
Membro examinadora



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Joyce Alencar Santos Radai  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/ MS, 03 de Novembro de 2020

Dedico este trabalho aos meus pais Joel Pereira dos Santos e Eleni Vieira Galvão por me educarem e sempre me apoiarem em tudo o que faço e não medirem esforços para que eu estivesse aqui. Dedico também à minha irmã Poliana Galvão dos Santos que esteve ao meu lado durante todo este tempo.

*O Senhor é a minha força e o meu  
escudo,  
nele o meu coração confia, e dele  
recebo ajuda.  
Meu coração salta de alegria, e  
com o meu cântico lhe darei  
graças.  
Salmos 28:7*

***Dedico!***

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para realizar mais um trabalho.

Agradeço aos meus pais Joel Pereira dos Santos e Eleni Vieira Galvão, por acreditarem na minha capacidade e me apoiarem durante todo este tempo, e à minha irmã Poliana Galvão dos Santos pelos esforços e auxílio nas análises.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes, por depositar sua confiança em mim e por me auxiliar durante este período. Quero deixar meus agradecimentos às técnicas do laboratório da FCS (Faculdade de Ciências da Saúde) por me ajudarem a conseguir muitos dos materiais que faltavam em laboratório, e aos meus amigos que de uma forma ou de outra passaram para dar apoio e alegrar meus dias.

## RESUMO

Os biofilmes são estruturas heterogêneas de natureza difundida compostas de células bacterianas apresentando-se de forma emaranhada em uma matriz de polímeros orgânicos estando estes aderidos a uma superfície. Os mesmos podem ser benéficos, assim como os utilizados nas indústrias de alimentos, em tratamentos de influentes de água potável e na produção de fermentados. Contudo, o biofilme pode ter um impacto negativo, principalmente quando formados em dispositivos médicos, como as sondas vesicais. A formação e adesão do biofilme é uma estratégia de sobrevivência bacteriana, com isso as células se encontram sob a proteção do biofilme, havendo tolerância e resistência aos antibióticos, aumentando e dificultando ainda mais os tratamentos clínicos das infecções bacterianas. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais responsáveis por infecções nosocomiais sendo intrinsecamente resistentes a alguns antibióticos, obtendo maior importância clínica e epidemiológica. Quando este microrganismo se encontra em condições de estresse, ocorre alteração em seu modo de crescimento, acarretando a formação de biofilmes e fornecendo à bactéria mecanismos adaptativos. O presente estudo tem como objetivo avaliar a adesão e formação do biofilme em sondas vesicais com as bactérias multirresistentes *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 27853 retiradas do laboratório do Hospital Universitário. A superfície utilizada para análises da adesão e formação do biofilme foram as sondas vesicais de látex siliconizado, identificadas como “cupons” de prova, sendo estes cortados em um tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. As bactérias foram aderidas aos cupons de prova após 24 horas de crescimento em caldo Brain Heart Infusion (BHI). A avaliação do desenvolvimento do biofilme foi realizada em doze tempos de contato, sendo estes tempos 0, 1h, 2h, 3h, 5h, 9h, 22h, 34h, 54h, 70h, 127h e 262h (12 dias). Na análise de antibiograma houve ação inibitória mais efetiva dos antibióticos imipenem e meropenem nas diluições de 10<sup>-20</sup>, com halo em torno de 35 mm de diâmetro. As bactérias utilizadas foram isoladas de *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 27853 proveniente de ambiente hospitalar. As bactérias apresentaram dinâmica semelhante no desenvolvimento do biofilme acarretando a adesão das células planctônicas havendo pequena diferença no ciclo do biofilme bacteriano entre as duas espécies nos tempos analisados.

**Palavras-chaves:** Biofilme, sondas vesicais, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853.

## ABSTRACT

Biofilms are heterogeneous structures of a widespread nature composed of bacterial cells presenting in a tangled form in a matrix of organic polymers being these adhered to a surface. They can be beneficial, as well as those used in the food industries, in the treatment of influential drinking water and in the production of fermented products. However, biofilm can have a negative impact, especially when formed in medical devices, such as bladder tubes. The formation and adhesion of the biofilm is a bacterial survival strategy, with that the cells are under the protection of the biofilm, with tolerance and resistance to antibiotics, increasing and making even more difficult the clinical treatments of bacterial infections. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main responsible for nosocomial infections, being intrinsically resistant to some antibiotics, obtaining greater clinical and epidemiological importance. When this microorganism is in conditions of stress, there is a change in its growth mode, causing the formation of biofilms and providing the bacteria with adaptive mechanisms. The present study aims to evaluate the adhesion and formation of biofilm in bladder probes with the multiresistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and ATCC 27853 taken from the laboratory of the University Hospital. The surface used for the analysis of adhesion and biofilm formation were the bladder probes made of siliconized latex, identified as “test coupons”, which were cut to a size of approximately 1 cm<sup>2</sup>. The bacteria were adhered to the test coupons after 24 hours of growth in Brain Heart Infusion (BHI) broth. The evaluation of the biofilm development was carried out in twelve contact times, these times being 0, 1h, 2h, 3h, 5h, 9h, 22h, 34h, 54h, 70h, 127h and 262h (12 days). In the analysis of antibiogram, there was a more effective inhibitory action of antibiotics imipenem and meropenem in dilutions of 10-20, with a halo around 35 mm in diameter. The bacteria used were isolated from *Pseudomonas aeruginosa* and ATCC 27853 from the hospital. The bacteria showed similar dynamics in the development of the biofilm causing the adhesion of planktonic cells, with little difference in the cycle of bacterial biofilm between the two species at the analyzed times.

**Keywords:** Biofilm, bladder catheters, *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853.



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	x
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	x
<b>1.1.1 Biofilme</b> .....	xi
<b>1.1.2 Biofilmes e resistência antimicrobiana</b> .....	xiii
<b>1.1.3 Formação de biofilmes em dispositivos hospitalares</b> .....	xiv
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	xvii
<b>1.2.1 Objetivo geral</b> .....	xvii
<b>1.2.2 Objetivo específico</b> .....	xvii
<b>1.3 REFERÊNCIAS</b> .....	xvii
<b>CAPÍTULO 2 – CAPACIDADE DA FORMAÇÃO E RESISTÊNCIA DE BIOFILME BACTERIANO EM SONDAS VESICAIS DE LÁTEX SILICONIZADO POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	xxii
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	xxii
<b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	xxiv
<b>2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b> .....	xxiv
<b>2.2.2 Preparo das sondas vesicais de látex siliconizado</b> .....	xxiv
<b>2.2.3 Suspensão bacteriana</b> .....	xxiv
<b>2.2.4 Indução do biofilme</b> .....	xxv
<b>2.2.5 Avaliação da adesão das células vegetativas</b> .....	xxv
<b>2.2.6 Perfil de resistência a antibiótico</b> .....	xxvi
<b>2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	xxvi
<b>2.4 CONCLUSÃO</b> .....	xxix
<b>2.5 REFERÊNCIAS</b> .....	xxix

## CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Introdução

O biofilme é um ecossistema composto por comunidades microbianas que aderem a superfícies bióticas ou abióticas (GU, 2014). Tais microrganismos vivem aglomerados envoltos em uma matriz autoproduzida, composta por substâncias poliméricas extracelulares, que se assemelha a uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células (ZHANG et al., 2011). Este comportamento surge como uma estratégia de adaptação para a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis (KASNOWSKY et al., 2010; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013). Essa condição também confere resistência a agentes antimicrobianos, a qual pode ser baixa, moderada ou alta (COSTA et al., 2014).

Estudos demonstram que cerca de 60% das infecções bacterianas estão relacionadas ao desenvolvimento de biofilmes, principalmente em ambiente hospitalar, apresentando-se como um importante desafio na medicina por estarem associados a infecções crônicas graves e infecções associadas a dispositivos médicos artificiais (CHIANG et al., 2013). Essa situação depende de vários fatores, sendo um deles associado à característica hidrofílica do biofilme que funciona como uma barreira aos antibióticos. Dentro dessa perspectiva 40% das contaminações são atribuídos a sondas vesicais que permanecem nos pacientes por tempos mais prolongados nas UTI's (JACOBSEN et al., 2008) e que podem estar ligadas a contaminação por meia dos instrumentos utilizados no momento da consulta do trato urinário, podendo ocorrer complicações graves além de aumento do tempo de internação, custos elevados de medicação e aumento de mortalidade (RAJAKANURA; HARBER, 2014). No corpo são existentes bactérias que através do canal da uretra se instalam na bexiga podendo ir diretamente aos rins, colonizando todo o organismo (ANVISA et al., 2017)

Assim, as peculiaridades com relação ao desenvolvimento do biofilme vêm sendo estudadas em diversas áreas, como na ambiental, industrial e na área da saúde, com forte tendência ao estudo das bactérias aderidas a uma superfície ao invés do estado planctônico (KASNOWSKY et al., 2010). Outro aspecto importante está na análise da adesão e dos mecanismos que conferem a resistência bacteriana, quando associados aos equipamentos

médicos. Estes mecanismos tem sua importância para inibir possíveis efeitos da infecção (LANGER et al., 2018).

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ambiental Gram-negativa, sendo um patógeno humano oportunista capaz de causar uma ampla variedade de infecções agudas e crônicas com risco de vida, particularmente em pacientes com defesa imunológica comprometida, sendo este de particular importância, pois é a principal causa de morbimortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e um dos principais patógenos nosocomiais que afetam pacientes hospitalizados, sendo intrinsecamente resistente a uma ampla gama de antibióticos (MORADALI; GODS; REHM, 2017). O Consórcio Internacional de Controle de Infecção Hospitalar relatou que as infecções hospitalares por *P. aeruginosa* se tornaram um problema de saúde a nível mundial (ROSENTHAL et al., 2016).

Segundo Neu e Lawrence (2015) os biofilmes mudaram consideravelmente nas últimas quatro décadas, obtendo como consequência o desenvolvimento de tecnologias e adaptações à ciência dos biofilmes, incluindo métodos bioquímicos e ecossistemas moleculares. Agora é possível obter uma visão geral da estrutura de biofilme em 3D e um conhecimento mais detalhado da estrutura até o nível de nanoescala.

### **1.1.1 Biofilme**

As bactérias apresentam um mecanismo fisiológico conhecido como biofilme que, de acordo com Lin et al. (2018), confere a estes microrganismos uma proteção contra a ação de antimicrobianos entre outras ações, uma vez que se trata de uma matriz composta por exopolissacarídeos (EPSs) (MAUNDERS; WELCH, 2017). O biofilme pode ser definido como uma aglutinação de microrganismos que estão complexamente ligados a um substrato e aderidos a uma superfície (RIBEIRO et al., 2019), podem ser considerados heterogêneos pela sua estrutura, que contém basicamente comunidades de células sésseis envolvidas por uma substância polimérica extracelular (SPE), similar a um gel, sintetizada pelas próprias células ou pelo seu hospedeiro (WILKINS et al., 2014).

De acordo com Maunders e Welch (2017), Algburi et al. (2017) e Al-Wrafy et al. (2017), neste ambiente podem estar presentes dois tipos de células bacterianas: as sésseis,

que se encontram aderidas à superfície; e as planctônicas, que estão livres e dispersas no meio, apresentando a capacidade de iniciar a formação de novos biofilmes. Em se tratando de bactérias Gram-negativas, os biofilmes são compostos por polissacarídeos neutros ou polianiônicos, enquanto que para as Gram-positivas são constituídos por polímeros catiônicos (SHUNMUGAPERUMAL, 2010).

O biofilme serve como uma proteção para as bactérias, apresentando-se como um sistema complexo possuindo canais interligados que distribuem os nutrientes para as bactérias no seu interior, sendo também responsáveis pela remoção de resíduos oriundos do metabolismo celular (LIN et al., 2018). O biofilme pode ser formado por uma única espécie ou mesmo por várias espécies, convergindo para uma relação intercelular que pode resultar na manutenção da comunidade, isto porque o metabólito excretado por uma espécie pode servir como nutriente para as outras, ou mesmo servir como ligante e facilitar na adesão de algumas espécies (CAZZANIGA et al., 2015; LIN et al., 2018). Essa relação intercelular é responsável pela plasticidade adaptativa dos microrganismos às condições do ambiente (SHARMA; PETCHIAPPAN; CHATTERJI, 2014; CAZZANIGA et al., 2015; TA; ARNASON, 2015).

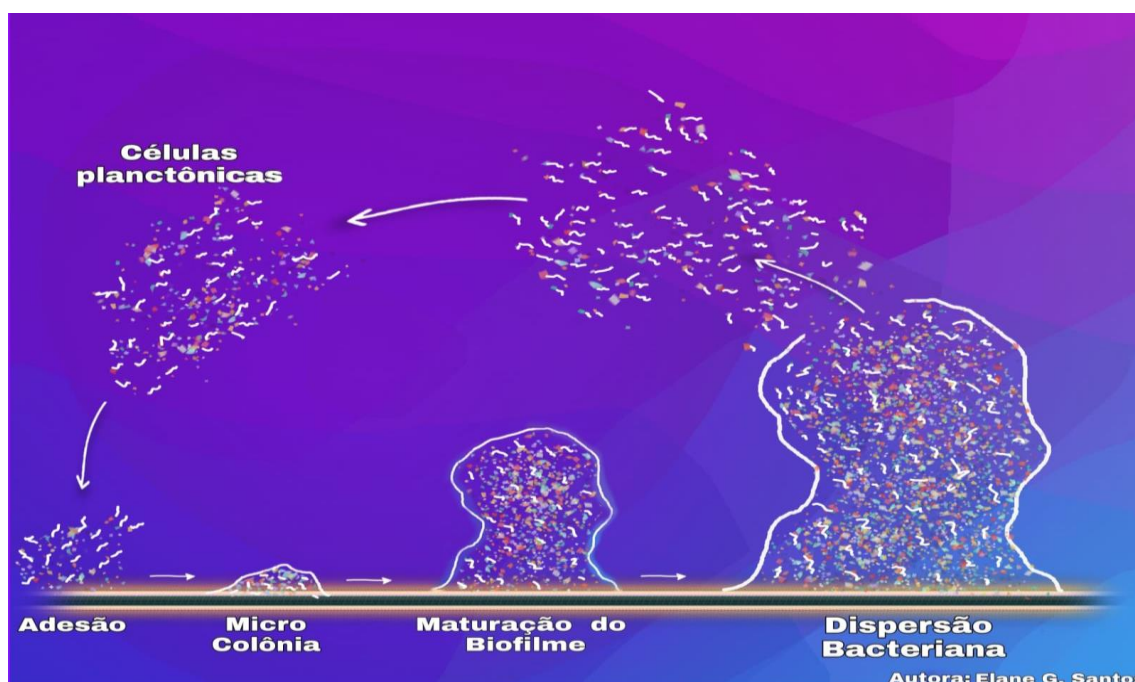
Neste contexto, quando a população bacteriana aumenta, as moléculas auto indutoras acumulam-se e podem induzir tanto a formação de biofilme como a transcrição de genes específicos que regulam as diferentes funções celulares (TA; ARNASON, 2015; GALANTE et al., 2015). Pode-se inferir ainda, que a adesão bacteriana possa ser influenciada pelo meio e por suas características, como pH, disponibilidade de nutrientes, hidrofobicidade da superfície e diferentes fatores de virulência apresentados pelas bactérias (SHARMA; PETCHIAPPAN; CHATTERJI, 2014; CAZZANIGA et al., 2015; KAZMIERCZAK; SCHNIEDERBEREND, 2015; TA; ARNASON, 2015; LIN et al., 2018).

A formação do biofilme ocorre de forma lenta e este pode surgir em vários locais da superfície. Quando atinge uma massa de biofilme específica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas externas tendem a liberar as células em estado planctônico, ocorrendo a dispersão e por conseguinte a multiplicação de forma mais rápida em novos locais (GUPTA et al., 2016). É considerado que a formação do biofilme ocorre em quatro estágios principais, sendo estes a adesão bacteriana sobre uma superfície, a formação de micro colônias, a maturação do biofilme e por fim seu deslocamento, sendo este

denominado como dispersão de bactérias, estando estas viáveis a colonizar novas áreas (Figura 1) (DOLAN; COSTERTON, 2002).

A etapa de adesão corresponde à distribuição das células bacterianas na superfície (que pode ser biótica ou abiótica) de forma reversível (BIXLER; BHUSHAN, 2012), formando uma monocamada e, em seguida, ocorre a produção de matriz, passando a ser irreversível, resultando em uma multicamada, o que caracteriza a adesão entre células e superfície formando as micro colônias (KARATAN; WATNICK, 2009). Nas bactérias Gram-negativas o papel de adesão ocorre pela fímbria, sendo este apêndice filamentososo a possível causa da hidrofobicidade do biofilme, estabelecendo interações moleculares entre a bactéria e a superfície de natureza apolar. Com isso, salienta-se que a eficiência de adesão se deve às características celulares da bactéria (presença de fímbria ou flagelo) em conjunto com as propriedades físico-químicas do biofilme, entre outros fatores (ESPER, 2011).

**Figura 1.** Formação de biofilme bacteriano em superfície.



Etapa 1: adesão a superfície nas células planctônicas. Etapa 2: Formação de micro colônias; Etapa 3: maturação do biofilme, Etapa 4: liberação de bactérias planctônicas desde a matriz do biofilme.

**Fonte:** Autora Elane G. Santos (2020)

### 1.1.2 Biofilmes e resistência antimicrobiana

A resistência dos biofilmes a tratamentos com antibióticos pode ter interferência de diferentes fatores intrínsecos relacionado aos nutrientes disponíveis e suas interações entre microrganismos, e fatores extrínsecos relacionados ao transporte e a temperatura do ambiente encontrado, como os fatores físicos, que causam limitações de difusão e impedem a ação dos antibióticos, uma vez que formam uma barreira de contenção diminuindo o alcance inibitório (SOLA et al., 2012). O controle químico do biofilme bacteriano se realiza através da sua remoção de toda massa, sendo esta uma das formas utilizadas como controle profilático do biofilme, evitando que haja acumulação bacteriana, e acarretando a prevenção do equilíbrio do micro-bioma (BARBOSA, 2015).

De acordo com Tyerman et al. (2013) a possibilidade da formação de biofilmes por um fenótipo “persistente”, explicaria a alta tolerância aos antimicrobianos, sendo que se considerados os fatores genéticos como um fator determinante de resistência.

Os biofilmes bacterianos podem ser considerados benéficos para a saúde humana, uma vez que as cepas de bactérias que evoluíram para formar biofilmes que persistem em nichos humanos específicos como por exemplo a microbiota intestinal, auxiliando na síntese de nutrientes e vitaminas e na regulação do sistema imunológico (POOLE, 2011). Contudo, o biofilme também pode se mostrar prejudicial para a saúde, pois pode colonizar superfícies de materiais e equipamentos utilizados em procedimentos hospitalares invasivos, formando bioincrustação, o que pode levar a infecções graves (RENNER; WEIBEL, 2011).

O desenvolvimento de infecções no ambiente hospitalar em pacientes que estão nas unidades de terapia intensiva (UTIs), devido ao grande número de procedimentos invasivos realizados nestes locais e a debilidade do sistema imune dos pacientes. Notadamente a contaminação se dá através de dispositivos e equipamentos médicos (NEGRI; SILVA; REGINI, 2013). As bactérias que se encontram presentes em ambientes hospitalares em maior frequência são *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *A. baumannii* e *Klebsiella*. As mesmas são produtoras de biofilmes e decorre em pacientes com problemas e infecções do trato urinário, cirúrgico, uma vez que estas infecções estão associadas a equipamentos hospitalares (RAMANATHAN; DUANE 2014; VERMA et al., 2016; MOTA; OLIVEIRA, 2017; ALVES et al., 2014)

### **1.1.3 Formação de biofilmes em dispositivos hospitalares**

O uso de equipamentos e dispositivos como cateteres e sondas no âmbito hospitalar são indispensáveis nas distintas áreas da medicina, pois auxiliam na manutenção das condições fisiológicas dos pacientes e, apesar de se tratar de equipamentos sofisticados e elaborados com materiais esterilizáveis, ainda estão sujeitos à contaminação e colonização por microrganismos (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Alguns dados estimam que aproximadamente 80% das infecções no mundo estejam associadas à presença de biofilmes em equipamentos hospitalares (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). Os principais dispositivos que sofrem a colonização por bactérias e possuem prospecção de presença de biofilmes são os cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular, endo próteses coronarianas, implantes de estimulação neurológica, próteses articulares e os dispositivos para fixação de fraturas e sondas (CRESPO; FERNÁNDEZ, 2014).

Ainda, destaca-se a variedade de infecções humanas causadas pela capacidade que os biofilmes têm de se desenvolver em tecidos vivos, compondo o denominado biofilme de mucosa que, conforme Moreira (2011), causa sintomas de infecção com cultura negativa e resistência aos antimicrobianos. Com isso, a detecção de cepas produtoras de biofilmes se torna relevante nos ambientes clínicos, pois possibilita a adoção de medidas adequadas para minimizar a colonização nas superfícies e também oferece a possibilidade para se estabelecer políticas de controle que permitam evitar a sua formação (CASSENEGO et al., 2013).

Entretanto, observa-se que a disseminação de microrganismos pode ocorrer de formas distintas no ambiente hospitalar. Podendo haver contaminação cruzada entre os profissionais de saúde e o ambiente que o paciente se encontra, e a transmissão pode ocorrer pelo contato direto e por meio dos procedimentos resultando no desenvolvimento de diversas infecções (Tabela 2).

**Tabela 2.** Infecções associadas à formação de biofilme bacteriano.

<b>Infecções</b>	<b>Espécies bacterianas envolvidas</b>
<b>Cárie dentária</b>	<b>Cocos Gram-positivos (<i>Streptococcus spp.</i>)</b>
<b>Periodontite</b>	<b>Bactérias bucais anaeróbias Gram-negativas</b>
<b>Infecções sistêmicas</b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i>, <i>Staphylococcus aureus</i></b>

<b>Pneumonia</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>
<b>Endocardite</b>	<i>Streptococcus do grupo viridans e Staphylococcus spp.</i>
<b>Infecções urinárias</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Infecções renais</b>	<b>Bacilos Gram-negativos</b>
<b>Infecções em cateter endovascular</b>	<i>Staphylococcus spp.</i>

**Fonte:** Adaptado Henriques, Vasconcelos e Cerca (2013) e Vermelho, Bastos e Sá (2007).

Um bom exemplo é a sonda vesical que constitui um ambiente propício à presença de comunidades de microrganismos capazes de formar biofilme. Este tipo de sonda tem a finalidade de promover um fluxo contínuo da diurese dos pacientes com alguma obstrução ou incontinência, irrigação vesical em pacientes no pós-operatório e a obtenção de uma amostra de urina quando esta não pode ser obtida de forma satisfatória espontaneamente (SILVA; BRANDÃO; MEDEIROS, 2014). O tempo de uso prolongado ocasiona complicações ao sistema urinário, sendo necessária atenção para a retirada no tempo adequado, prevenindo assim a infecção generalizada (MENEGUETI et al., 2012).

Após a inserção do cateter vesical, as bactérias que já estão presentes e colonizam o meato uretral podem aderir à superfície do cateter e iniciar a formação de biofilme, podendo estar presentes compostos como ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídios (SUBRAMANIAN et al., 2012). O biofilme geralmente adere à superfície do cateter de modo que não pode ser facilmente removido, o material de látex siliconizado favorece em determinado de UTI a incrustação do biofilme bacteriano (MOTA; OLIVEIRA, 2017). Alguns microrganismos podem estar presentes nesses locais formando comunidades heterogêneas, como *Pseudomonas aeruginosa*, que apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos sendo causadoras de infecções hospitalares graves (DOHNT et al., 2011).

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, aeróbia, não-fermentadora, ubiquitária e capaz de causar infecções oportunistas em humanos, e é considerada um patógeno de prioridade crítica pela Organização Mundial de Saúde (MORADALI; GHODS; REHM, 2017). A *P. aeruginosa* foi descrita por Schroeter em 1972, pertencente à ordem Pseudomales, da família Pseudomonadaceae e ao gênero *Pseudomonas* (OZEN ET



AL, 2013). Esta bactéria pode causar uma ampla variedade de infecções agudas e crônicas com risco de vida, particularmente em pacientes com defesa imunológica comprometida. Tem sido de particular importância, pois é a principal causa de morbimortalidade em pacientes com fibrose cística (FC) e um dos principais patógenos nosocomiais que afetam pacientes hospitalizados, sendo intrinsecamente resistente a uma ampla gama de antibióticos, sendo estes cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos carbapenêmicos (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

As infecções hospitalares por *P. aeruginosa* se tornaram um problema de saúde a nível mundial (ROSENTHAL et al., 2016). Desta forma, pode-se dizer que a *P. aeruginosa* é prevalente em ambientes de saúde, porque é um companheiro comum de pacientes sob cuidados médicos e também pode sobreviver em superfícies abióticas e bióticas como equipamentos médicos, resistindo aos métodos de desinfecção, sendo altamente contagiosa (RUSSOTTO et al., 2015). Os casos de infecções por esta bactéria vêm aumentando consideravelmente ao longo dos anos, pois esta bactéria é extremamente resistente à ação de antibióticos (POOLE, 2011).

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o tempo de formação de biofilme, em superfícies de sondas vesicais constituídas de látex siliconizado, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* retiradas de ambiente hospitalar, testando a resistência da mesma à antibióticos comumente utilizados em meio hospitalar.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

Induzir a adesão e formação de biofilme em superfície de látex siliconizado, com as cepas de *P. aeruginosa* e ATCC 27853 oriunda de ambiente hospitalar associado a infecções do trato urinário.

Avaliar o tempo de formação do biofilme, utilizando técnicas microbiológicas de avaliação do crescimento bacteriano na sonda vesical, analisando o tempo em que o biofilme se estabelece na superfície da mesma;

Testar a resistência de ambas as cepas de *P. aeruginosa* e ATCC 27853 a antibióticos utilizados em meio hospitalar, com o verificando sua eficácia no combate aos microrganismos em questão.

### 1.3 REFERÊNCIAS

- AL-WRAFY, F. et al. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 71, n. 1, p. 78–91, 14 fev. 2017.
- ALGBURI, A. et al. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 1–16, 1 fev. 2017.
- ALVES, M. J. et al. Propensity for biofilm formation by clinical isolates from urinary tract infections: developing a multifactorial predictive model to improve antibiotherapy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 471–477, 1 mar. 2014.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília.
- BARBOSA, Á. P. C. **Biofilmes e resistência antibiótica nas infecções do trato respiratório superior**. 2015. Tese de Doutorado.
- BIXLER, G. D.; BHUSHAN, B. Biofouling: Lessons from nature. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1967, p. 2381-2417, 2012.
- CASSENEGO, A. P. V et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1433–1440, 2013.
- CAZZANIGA, G. et al. Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. **American Journal of Dentistry**, v. 28, n. 6, p. 311–320, 2015.
- CHIANG, W.-C. et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2352–2361, maio 2013.
- COSTA, J. C. M. et al. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666–671, abr.

- 2014.
- CRESPO, J. M. C.; FERNÁNDEZ, C. R. Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica. **Reduca**, v. 6, n. 1, p. 293–299, 2014.
- DOHNT, K. et al. An in vitro urinary tract catheter system to investigate biofilm development in catheter-associated urinary tract infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, n. 3, p. 302–308, dez. 2011.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- ESPER, L. M. R. Formação de biofilmes microbianos. **V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Universidade Federal Fluminense**, p. 1–19, 2011.
- GALANTE, J. et al. *Quorum sensing* and biofilms in the pathogen, *Streptococcus pneumoniae*. **Current pharmaceutical design**, v. 21, n. 1, p. 25-30, 2015.
- GU, H. Patterned biofilm formation to investigate bacteria-surface interactions. n. May, p. 236, 2014.
- GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: A review. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 16 jan. 2016.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais - O estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 27–36, 2013.
- JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 26–59, jan. 2008.
- KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, jun. 2009.
- KASNOWSKY, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 15, p. 1–23, 2010.
- KAZMIERCZAK, B. I.; SCHNIEDERBEREND, M.; JAIN, R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 28, p. 78–82, dez. 2015.

- LANGER, L. T. A. et al. Biofilmes em infecção por *Candida*: Uma revisão da literatura. **Revista interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 1–15, 3 dez. 2018.
- LIN, Q. et al. Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 5, p. 667–672, nov. 2018.
- MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides: The sticky side of biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 13, p. 1–10, 15 jul. 2017.
- MENEGUETI, M. et al. Infecção urinária em unidade de terapia intensiva: Um indicador de processo para prevenção. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 13, n. 3, p. 632–638, 2012.
- MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–29, 15 fev. 2017.
- MOREIRA, C. A. **Atividade in vitro de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus spp.* de otite canina**. [s.l.: s.n.]. 2011.
- MOTA, É. C.; OLIVEIRA, A. C. Biofilme em cateter vesical de demora e a segurança do paciente: Uma revisão da literatura. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 5, n. 3, p. 116–122, 31 ago. 2017.
- NEGRI, M.; SILVA, H. R.; REGINI, J. R. R. Biofilme: Ameaça invisível em ambientes cirúrgicos. **Braz J Surg Clin Res**, v. 4, n. 1, p. 43-8, 2013.
- NEU, T. R.; LAWRENCE, J. R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 4, p. 233-242, 2015.
- POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–13, 2011.
- RAJAKANURA, G. K.; HARBER, M. **Practical Nephrology**. London: Springer London, 2014.
- RAMANATHAN, R.; DUANE, T. M. Urinary tract infections in surgical patients. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, n. 6, p. 1351–1368, dez. 2014.
- RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347–355, 18 maio 2011.
- RIBEIRO, A. C. et al. Prevalência de microrganismos em infecções e casos de SEPSE

- associadas ao cateter: Uma revisão da literatura. **Ciência & Inovação**, v. 4, n. 1, p. 55–60, 2019.
- ROSENTHAL, V. D. et al. International nosocomial infection control consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 12, p. 1495–1504, dez. 2016.
- RUSSOTTO, V. et al. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. **Journal of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 54, 10 dez. 2015.
- SHARMA, I. M.; PETCHIAPPAN, A.; CHATTERJI, D. *Quorum sensing* and biofilm formation in mycobacteria: Role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. **IUBMB Life**, v. 66, n. 12, p. 823–834, dez. 2014.
- SHUNMUGAPERUMAL, T. **Biofilm eradication and prevention: A pharmaceutical approach to medical device infections**. John Wiley & Sons, 2010.
- SILVA, J. P.; BRANDÃO, J. O. C.; MEDEIROS, C. S. Q. Intervenção de enfermagem na prevenção das infecções do trato urinário relacionado ao cateterismo vesical de demora: Uma revisão integrativa da literatura. **Ciências biológicas e da saúde, Recife**, v. 1, n. 3, p. 21-33, 2014.
- SOLA, M. C. et al. Manutenção de microorganismos: Conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1398–1418, 2012.
- SUBRAMANIAN, P. et al. Antibiotic resistance pattern of biofilm forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. **Australasian Medical Journal**, v. 5, n. 7, p. 344–348, 1 ago. 2012.
- TA, C.; ARNASON, J. Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and *Quorum Sensing* inhibitors. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 29, 26 dez. 2015.
- TRENTIN, S. D.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.
- TYERMAN, J. G. et al. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2013.
- VERMA, A. et al. Differences in bacterial colonization and biofilm formation property of uropathogens between the two most commonly used indwelling urinary catheters. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 6, p. 1–3, 2016.

- VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. Bacteriologia geral. In: **Bacteriologia Geral**. 2007. p. 582-582.
- WILKINS, M. et al. New approaches to the treatment of biofilm-related infections. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S47–S52, nov. 2014.
- WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 12 mar. 2015.
- ZHANG, D. Y. et al. Bacterial community and function of biological activated carbon filter in drinking water treatment. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 2, p. 122–131, 2011.

## **CAPÍTULO 2 - CAPACIDADE DA FORMAÇÃO E RESISTÊNCIA DE BIOFILME BACTERIANO EM SONDAS VESICAIS DE LÁTEX SILICONIZADO POR *Pseudomonas aeruginosa***

### **2.1 INTRODUÇÃO**

Biofilmes constituem um modo de crescimento protegido que permite que os microrganismos sobrevivam em ambientes hostis. Esses biofilmes podem se tornar 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos do que seus homólogos planctônicos. Assim é difíceis controlar seu crescimento na indústria e em ambientes hospitalares (YORK, 2018). A *P. aeruginosa* é conhecida por ser um patógeno oportunista estando frequentemente associado a infecções hospitalares no trato urinário, sistema respiratório, infecções de tecidos moles, dermatites entre outras (PACZKOWSKI et al., 2017).

Existem muitos tipos de doenças causadas por microrganismos formadores de biofilme. Dentre elas, as principais são as infecções do trato urinário, sendo este tipo de patologia um dos mais recorrentes entre a classe de infecções nosocomiais. Tal fato se dá devido à utilização frequente de cateteres urinários que, neste âmbito, encontram-se contaminados devido à falta de cuidados de armazenamento e/ou manipulação (GUGGENBICHLER et al., 2011).

A formação do biofilme em cateteres urinários causados pela *P. aeruginosa* também é reconhecida como um importante causa de infecções crônicas devido à sua capacidade de formar biofilmes, onde as bactérias estão presentes em agregados envoltos em uma matriz extracelular autoproduzida e são difíceis ou impossíveis de erradicar com o tratamento antibiótico. *P. aeruginosa* causa infecções crônicas nos pulmões de pacientes com fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica, bem como infecções crônicas do trato urinário em pacientes com cateter de bexiga permanente, e pneumonia associada ao ventilador em pacientes entubados, e também é um importante patógeno em feridas crônicas (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019). Desta forma, pode-se dizer que a *P. aeruginosa* é prevalente em ambientes de saúde, devido ser um companheiro comum de pacientes sob cuidados médicos, podendo sobreviver em superfícies abióticas e bióticas como equipamentos médicos, resistindo aos métodos de desinfecção (RUSSOTTO et al., 2015). As infecções bacterianas estão cada vez mais difíceis de tratar devido ao maior número de pacientes com condições subjacentes complexas e ao aumento de patógenos resistentes às terapias antimicrobianas disponíveis (PIDDOCK, 2016). Quando as bactérias aderem a uma superfície e formam o biofilme se tornam menos suscetíveis à ação dos antibióticos, uma vez que podem ocorrer alterações metabólicas nas células que estão no interior do biofilme, que influenciam nas características estruturais de permeabilidade do medicamento de acordo com Jolivet-Gougeon e Bonnaure-Mallet (2014).

As bactérias podem apresentar resistência aos antibióticos através de vários mecanismos fisiológicos tanto intrínsecos como extrínsecos (ou adquiridos), sendo que nos mecanismos intrínsecos a diferença principal está na estrutura da parede celular entre organismos Gram-positivos e Gram-negativos (BLAIR et al., 2015). Nas bactérias Gram-negativas a membrana externa limita a ação de vários antibióticos existentes, tornando-os ineficazes (RANDALL et al., 2013).

As bactérias podem sofrer mutações que resultam em alterações das estruturas celulares e inibir o efeito do antibiótico (REDGRAVE et al., 2014). As mutações podem resultar em múltiplos mecanismos que podem ser herdados por via de transmissão vertical do material genético (HUGHES; WEBBER, 2017). Em segundo lugar, as bactérias são capazes de produzir enzimas que podem inativar ou modificar o antibiótico (ZHAO; HU, 2013).

Além desses mecanismos de resistência, existem os chamados mecanismos fenotípicos de resistência, dentre os quais destaca-se a formação de biofilme. Os biofilmes são produzidos por quase todas as espécies de microrganismos, e são capazes de aderir às superfícies e formar colônias encapsuladas, sendo que os biofilmes formados por bactérias patogênicas são os mais estudados, pois são reconhecidos como uma fonte de infecção (WINGENDER; FLEMMING, 2011). Um bom exemplo está na *Pseudomonas aeruginosa* que na forma planctônica se agrega em uma superfície biótica ou abiótica via transporte passivo não havendo gasto de energia durante o processo ou transporte ativo onde ocorre gastos, havendo a intervenção de estruturas específicas, como os flagelos (PERCIVAL; KNOTTENBELT; COCHRANE, 2011), que auxiliam na sua adesão.

Diferentes estratégias estão sendo consideradas para prevenir ou inibir o desenvolvimento de biofilme. Por exemplo, limitando o estágio de adesão, a passagem do formulário planctônico em forma de biofilme, o estágio de maturação ou trocas intercelulares, mas também reativando as células dormentes ou promovendo a dispersão das células bacterianas do biofilme (BORDI; BENTZMANN, 2011). Neste contexto, a resistência ou tolerância conferida às bactérias produtoras de biofilme é responsável pelo fracasso de certos tratamentos antibióticos que, impulsionam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, combinadas ou não, com o tratamento antibiótico iniciado (CERI; OLSON; TURNER, 2010).

Deste modo, este estudo tem por objetivo avaliar o tempo de formação de biofilme, em superfícies de sondas vesicais constituídas de látex siliconizado, utilizando ATCC 27853 e isolados de *P. aeruginosa* provenientes de ambiente hospitalar, testando a resistência das mesmas a antibióticos comumente utilizados em meio hospitalar.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**

Foram utilizadas na colonização das sondas vesicais cepas de *P. aeruginosa*, cedida apenas três amostras em microtubos de 2ml retiradas e estocadas da urina de um paciente pelo laboratório Clínico do HU (Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados – HU-UFGD), e a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



### **2.2.2 Preparo das sondas vesicais de látex siliconizado**

As sondas vesicais estéreis de látex, foram utilizadas nas análises de adesão das células bacteriana e na formação do biofilme na superfície deste dispositivo. As sondas foram cortadas em um tamanho de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, em condições assépticas com o auxílio de uma tesoura esterilizada e exposta à luz UV no comprimento de onda de 260 nm, por 15 minutos (KOWALCZUCK; GINALSKA; GOLUS, 2010).

### **2.2.3. Suspensão bacteriana**

Para a obtenção de uma suspensão bacteriana de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL, as cepas foram reativadas a partir da cultura estoque, armazenada em ultrafreezer -70°C em caldo Brain Heart Infusion (BHI), utilizando alça de platina de 1,6 microlitros e inoculando em 9 mL de caldo BHI que foi incubado a 37°C por 24h. O caldo foi preparado com uma adaptação de dupla concentração, com a finalidade de fornecer nutrientes suficientes para a reativação da cepa. Após o primeiro ciclo de ativação, 1 mL dessa suspensão foi transferido para outro tubo contendo 9 mL de caldo BHI e depois incubado novamente nas mesmas condições do primeiro ciclo, totalizando 10 mL de suspensão bacteriana com dois ciclos de ativação (LEE et al., 2017).

### **2.2.4 Indução do biofilme**

Os cupons de prova foram imersos em 200 mL de meio de cultura enriquecido (BHI) em concentração dupla com 10 mL de suspensão bacteriana. Foram incubados a 37°C por 262 horas, sem troca do meio de cultura durante o período de incubação havendo meio suficiente para o enriquecimento microbiano (BRITO et al., 2007).

A avaliação do desenvolvimento do biofilme foi realizada em doze tempos de contato, sendo estes tempos 0, 1h, 2h, 3h, 5h, 9h, 22h, 34h, 54h, 70h 127h e 262h (12 dias). Estes tempos foram selecionados próximo aos tempos encontrados na literatura. O tempo 0 (zero) correspondeu à análise logo após a imersão dos cupons de prova no meio de cultura juntamente com a suspensão bacteriana, a fim de avaliar a possível interação do microrganismo com a superfície neste primeiro momento (KOSTAKI et al., 2012).

### **2.2.5 Avaliação da adesão das células vegetativas**

A cada tempo de análise realizado, os cupons foram retirados com o auxílio de uma pinça, dispostos em placas de Petri esterilizadas e forrada com papel filtro para a retirada do excesso de células planctônicas. Em seguida os cupons foram adicionados em tubos contendo 10 mL de solução tampão fosfato e homogeneizados manualmente durante 15 minutos no vórtex, com a finalidade de remover o biofilme formado para posterior contagem das células viáveis. Foi retirado 1 mL das suspensões bacterianas homogeneizadas para o preparo de diluições seriadas até  $10^{-20}$  em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada. Essas diluições foram plaqueadas, pela técnica de incorporação, em Plate Count Agar (PCA) e incubadas a 37 °C/24 horas. Os resultados da contagem das células viáveis foram expressos na unidade de Log UFC/cm<sup>2</sup> por cupom de sonda avaliado (LEE et al., 2017). Valores acima de 5 Log UFC/cm<sup>2</sup> foram considerados positivos para biofilme estabelecido, com isso foi analisado o desenvolvimento da curva de crescimento e adesão bacteriana nos doze tempos, havendo posteriormente a contagem de células viáveis para determinação desta população (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998).

### **2.2.6 Perfil de resistência a antibiótico**

Na avaliação de perfil de resistência bacteriana aos antibióticos, as mesmas se encontravam em estado planctônico e aderida a superfície. A concentração inibitória mínima (MIC), de acordo com a metodologia preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2019), foi utilizada para realização do teste da eficiência dos antibióticos mediante as condições em que o biofilme se encontra estabelecido. O teste foi adaptado para o mesmo protocolo de concentrações estabelecidas pela CLSI, havendo substituição da suspensão bacteriana ajustada para a escala de McFarland  $1,5 \times 10^8$  usado como inóculo, os cupons (sonda vesical de latex siliconizado) aderidos com o biofilme estabelecido. Foi adicionado na placa de elisa 2 mL de caldo Muller Hinton diluído com antibióticos e incubados a 37 °C/24 horas. Os antibióticos testados foram amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, cefepime, gentamicina, imipenem, levofloxacina e meropenem (CLSI 2019). Posteriormente ao período de incubação os cupons foram retirados e

adicionados a 10 ml no tubo falcon com solução tampão fosfato e rinsado por 5 minutos no vortex, foi realizada a mesma técnica de diluição e plaqueamento para que houvesse a obtenção do numero de células viáveis.

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dinâmica observada no desenvolvimento do biofilme bacteriano nas situações de células planctônicas aderidas houve diferença apenas no número de ciclos como demonstrado na (Figura 1), com isso as duas cepas obtiveram um comportamento celular esperado, havendo repetibilidade nas fases do desenvolvimento bacteriano. Pode-se observar que ambos os microrganismos apresentaram semelhança no perfil de crescimento do biofilme nos tempos analisados, havendo diferença somente no seu comportamento nos doze tempos em relação ao tempo de cultivo.

Os resultados demonstrados na figura 1, observa-se que o tempo inicial de 0h (zero), a *P. aeruginosa* apresentou 20,0 Log UFC/mL e ATCC 27853 22,0 Log UFC/mL, sendo que é população o suficiente para iniciar o processo das células planctônicas aderindo-se a superfície de sonda vesical. Observou-se que a quantidade de população ativa de *P. aeruginosa* e ATCC 27853 foi de 18,0 Log UFC/mL e 22,0 UFC/mL para o tempo de 2h. O desenvolvimento do biofilme bacteriano observado na figura 1, exibe o comportamento dos períodos de crescimento exponencial, caracterizando as etapas do ciclo de um biofilme, com disponibilidade de células planctônicas para o processo de liberação da mesma, assim como células aderidas na superfície como biofilme maduro. É notável que a bactéria selvagem teve desenvolvimento constante em todos os períodos analisados comparado a ATCC 27853.

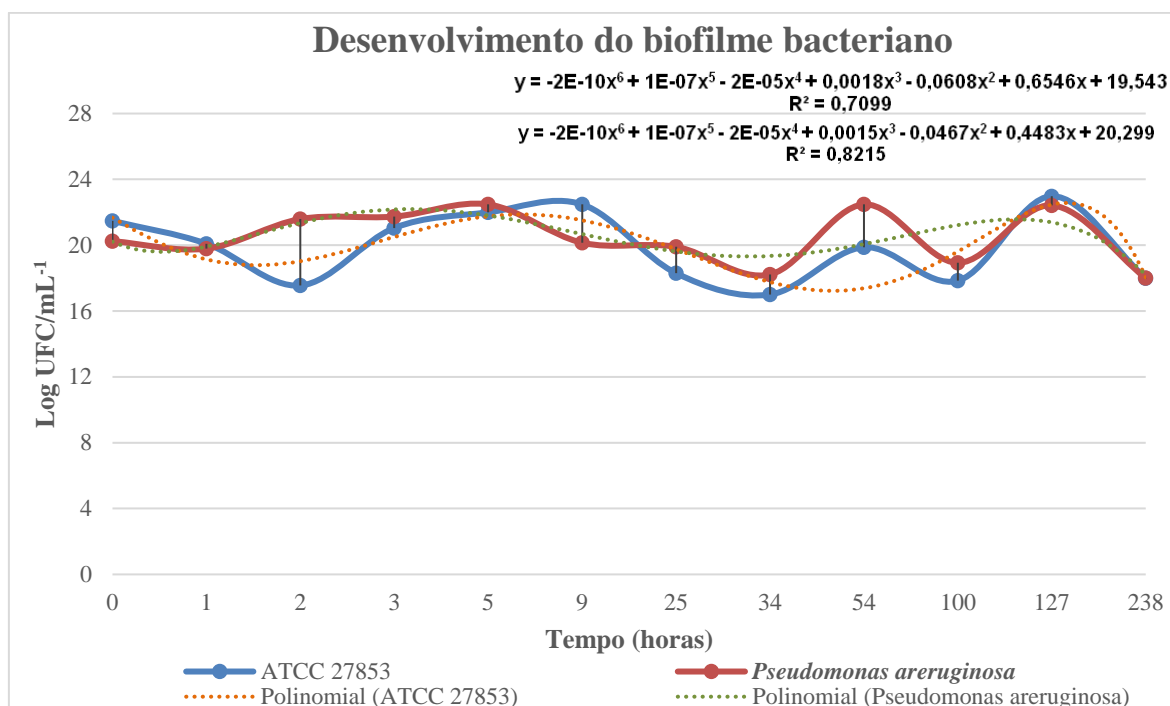
Segundo Ramanathan e Duane (2014) a etapa de adesão de biofilme na superfície de sonda vesical de látex do biofilme pode ocorrer de 1 a 3 dias. Isso se deve a uma mistura adaptada de superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, permitindo assim a colonização por diversos microrganismos. Os mais comuns encontrados neste tipo específico de superfície são os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Através dos resultados estabelecidos por métodos quantitativos de contagem de células viáveis expressos em UFC/cm<sup>2</sup> em cada cupom, houve a confirmação da adesão do biofilme em sondas vesicais, demonstrando as interações que ocorreram entre as bactérias e o material utilizado (KOWALCZUK et al., 2012).

O papel do biofilme na resistência ao agente antibacteriano é envolvido por vários mecanismos. Pode-se observar que no teste de susceptibilidade (MIC) realizado nas condições de adesão do biofilme bacteriano a sonda vesical de látex siliconizado a *Pseudomonas aeruginosa* obteve resistência a dois antibióticos sendo o imipenem e meropenem, e demonstrando sensibilidade aos outros antibióticos testados (CLSI 2019). Segundo Guo et al., (2020) a *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi resistente a diversos antibióticos incluindo ampicilina, tetraciclina e clorafenicol, o mesmo relata que os antibióticos foram eficazes em terapia para tratar de infecções de patógenos microbianos, então a função ecológica dos antibióticos tem sido de grande importância na descoberta de novos antibióticos mais eficazes para combater na adesão do biofilme bacteriano.

Durante a análise do MIC de células em biofilme, observou-se visivelmente uma turbidez do meio em algumas concentrações, indicando o desenvolvimento bacteriano e resistência aos agentes, porém para que avalie a presença de células viáveis e eliminação de resultados falsos positivos, foi feita a técnica de plaqueamento em incorporação em ágar, para que posteriormente pudesse confirmar o crescimento bacteriano.

**FIG 1.** Cinética de Crescimento Bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 27853 em função do tempo.



Análise dos diferentes tempos de formação, maturação e desprendimento das células planctônicas do biofilme estando aderidos nos cupons. As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e ATCC 27853 em Log UFC/mL<sup>-1</sup>

(logaritmo da unidade formadora de colônias). O tempo de 262h não foi adicionado por não obter contagem de células viáveis.

**Tabela 1.** Perfil Antimicrobiano da concentração inibitória mínima (MIC) da *Pseudomonas aeruginosa*.

MICs (µg/mL)							
Amicacina	Cefepime	Ceftazidma	Ciprofloxacina	Gentamicina	Imipenem	Levofloxacina	Meropenem
<=8*	8***	4*	0.5*	<=2*	>8***	2*	>8***

Sensibilidade do biofilme bacteriano aos antibióticos estão apresentados da seguinte forma (\*) sensível e (\*\*\*) resistente.

## 2.4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a formação e adesão do biofilme bacteriano em sondas vesicais de látex siliconado nos tempos determinados, havendo alterações na formação desta população. Os antibióticos utilizados para o teste (MIC) na *P. aeruginosa*, dois deles foram resistentes ao biofilme bacteriano, meropenem e imipenem, já na amicacina, cefepime, ceftazidma, ciprofloxacina, gentamicina e levofloxacina foram sensíveis ao microrganismo. As análises da dinâmica de adesão e do mecanismo de resistência bacteriana que estavam presentes nos cupons (sonda vesical) são de extrema importância para análises mais aprofundadas e prevenção do biofilme bacteriano.

Os dados obtidos neste estudo auxiliarão nas informações de tempos de formação e adesão do biofilme bacteriano, frente aos antibióticos eficazes na inibição da mesma. Com isso servirão como base para discutir novos métodos de interrupção do biofilme bacteriano.

## 2.5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of food protection**, v. 61, n. 7, p. 833-

838, 1998.

- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.
- BORDI, C.; BENTZMANN, S. DE. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. **Annals of Intensive Care**, v. 1, n. 19, p. 1–8, 13 dez. 2011.
- BRITO, D. V. D. et al. Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepse relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos. **Arquivos de ciências da saúde**, p. 80-84, 2007.
- CERI, H.; OLSON, M. E.; TURNER, R. J. Needed, new paradigms in antibiotic development. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 11, n. 8, p. 1233-1237, 2010.
- CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents - How *P. aeruginosa* can escape antibiotics. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 913, 2019.
- GUO, Ding-Ding, et al. "O regulador PltZ regula um sistema transportador ABC putativo PltIJKNOP de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em resposta ao antimicrobiano 2, 4-diacetilfloroglucinol." **Frontiers in microbiology**, v. 11 p. 1423, 2020.
- GUGGENBICHLER, J. P. et al. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials—catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. **GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär**, v. 6, n. 1, 2011.
- HUGHES, G.; WEBBER, M. A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 14, p. 2237–2246, jul. 2017.
- JOLIVET-GOUGEON, A.; BONNAURE-MALLET, M. Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, n. 1, p. 49–56, mar. 2014.
- KOSTAKI, M. et al. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2586-2595, 2012.
- KOWALCZUK, D. et al. Prevention of biofilm formation on urinary catheters: Comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1874-1882, 2012.

- KOWALCZUK, D.; GINALSKA, G.; GOLUS, J. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 402, n. 1-2, p. 175-183, 2010.
- LEE, C. R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1–35, 13 mar. 2017.
- NICOLLE, L. E. Infecções do trato urinário associadas a cateter. **Resistência antimicrobiana e controle de infecção**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2014.
- OZEN Asli I. & David W. Ussery Setting the Pseudomonas Genre: Where do we draw the line Azotobacter?. **Ecology Microbiology**, v. 63 n. 2, p. 239-248, 2013.
- PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 10, p. 4064-4076, 2017.
- PERCIVAL, S. L.; KNOTTENBELT, D. C.; COCHRANE, C. A. (Ed.). **Biofilms and veterinary medicine**. Springer Science & Business Media, 2011.
- PIDDOCK, L. J. V. Reflecting on the final report of the O'Neill review on antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 767–768, jul. 2016.
- RAMANATHAN, R.; DUANE, T. M. Urinary tract infections in surgical patients. **Surgical Clinics of North America**, v. 94, n. 6, p. 1351–1368, dez. 2014.
- RANDALL, C. P. et al. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-Negative pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–639, jan. 2013.
- REDGRAVE, L. S. et al. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 438–445, ago. 2014.
- ROMERO, D., Traxler, M. F., López, D., and Kolter, R. Antibiotics as signal molecules. **Chemical Review**, v. 111, p. 5492–5505, 2011. doi: 10.1021/cr2000509
- RUSSOTTO, V. et al. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. **Journal of intensive care**, v. 3, n. 1, p. 54, 2015.
- TENKE, P. et al. Update on biofilm infections in the urinary tract. **World Journal of Urology**, v. 30, n. 1, p. 51–57, 18 fev. 2012.
- VERMA, A. et al. Differences in bacterial colonization and biofilm formation property of uropathogens between the two most commonly used indwelling urinary catheters.

- Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 6, p. 1–3, 2016.
- WAYNE, P. A. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
- WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, n. 6, p. 417–423, nov. 2011.
- YORK, A. Fungal safeguards in the gut. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-1, 2018.
- ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 79–101, 15 fev. 2013.