

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**CINÉTICA E RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* NA
ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SONDAS
VESICAIS**

LUJAN NUNES SANABRIA ALIATTI

**DOURADOS-MS
2013**

LUJAN NUNES SANABRIA ALIATTI

**CINÉTICA E RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* NA ADESÃO E
FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SONDAS VESICAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. DR. FÁBIO JULIANO NEGRÃO

**DOURADOS-MS
2013**

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por me conceder paciência e serenidade nos momentos de dificuldades durante essa jornada.

A minha querida mãe, por ter me transmitido os valores familiares que tanto prezo, pelo incentivo em iniciar e principalmente em continuar essa árdua jornada quando imaginava que já não era mais possível.

Ao meu esposo Rafael, pelo apoio e pela compreensão nos momentos de ausência, e foram tantos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão por me transmitir seus conhecimentos, pela confiança e liberdade de realizar o experimento.

À Profa. Kelly Cristina da Silva Brabes, pelo apoio, incentivo e dedicação a mim dispensada desde o início, pela confiança depositada para realização de todo o trabalho, e acima de tudo pela amizade e paciência.

Ao Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes pela realização das análises estatísticas.

Aos meus amigos de trabalho, Agruslândia Rezende de Souza, Carlos Narciso Simão Junior, Ramão Souza de Deus Junior, Flora Martinez Moreira e Débora Regina Hoff Brait, pelo apoio desde o início, pela compreensão nos momentos de angústia e tormento.

A minha grande amiga, Agruslândia Rezende de Souza, que por várias vezes não mediu esforços para me ajudar durante as loucuras experimentais, obrigada “Gugu”.

Aos meus amigos Ramão Souza de Deus Junior, Débora Regina Hoff Brait e Flora Martinez Moreira, pela força com os experimentos, vocês foram muito importante pra mim nessa etapa.

As queridas amigas que fiz durante esses dois anos, Késia Esther Silva, Chaiane Regina Rech, Cibelli Mazzucato e Regiane Balbino Primo, obrigada pela companhia, pela grande ajuda, pelos momentos de descontração no laboratório, pelas loucuras em meio a tanto trabalho, obrigado por fazerem parte de uma etapa muito importante pra mim e por dividirem comigo os momentos de angústias e desabafos.

A minha amiga e irmã científica Quézia Moura da Silva, pelo companheirismo, pelos momentos de desabafo, e pela humildade em que sempre se dispôs a me ajudar.

A minha segunda irmã científica Alessandra Machado, pelos momentos de desabafos.

A sempre prestativa Flávia Patussi, por me disponibilizar as amostras, e por estar sempre disposta a tirar as minhas dúvidas.

A Fabiana Gomes da Silva, pela grande ajuda ao desenhar o experimento.

A mais nova amiga e companheira de trabalho Letícia Horbach, e também secretária do curso de Pós Graduação pela ajuda nos trâmites burocráticos e por me ouvir sempre que precisei falar.

Enfim, a todos que me ajudaram direta e indiretamente ao longo dessa jornada, mesmo que em pensamentos.

Dedicatória

Dedico este trabalho, a minha mãe Florencia, por ter me ensinado a nunca desistir, por ser o meu esteio, a minha fortaleza, e principalmente por te me transmitido valores que carrego comigo para todo sempre, e ao meu esposo Rafael, por dividir comigo os momentos de dificuldade, pela paciência na espera de ser “pai”.

Sumário

Agradecimentos	iii
Dedicatória.....	v
Listas de figuras.....	vii
Lista de tabelas	viii
Listas de abreviaturas e símbolos	ix
Resumo	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Histórico	14
2.2 O Biofilme	15
2.3 Formação do Biofilme	16
2.3.1 Matriz Extracelular	16
2.3.2 Etapas da Adesão e Formação do Biofilme.....	17
2.4 Patogenicidade do Biofilme.....	18
2.4.1 <i>Quorum sensing</i>	19
2.5 Micro-organismos.....	20
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.6. Biofilmes e as Infecções do Trato Urinário.....	21
2.7 Perfil de resistência a agentes antimicrobianos em adesão e biofilme	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5. ANEXOS	32

Listas de figuras

FIG 1. Representação das Etapas da Adesão e Formação de Biofilme Bacteriano.....18

Lista de Figuras do Artigo

FIG. 1 Cinética de Crescimento Bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem em função do tempo.....48

FIG 2. Cinética de Crescimento Bacteriano das células aderidas em Log UFC/ cm² de *E.coli* ATCC 25922 e Selvagem à superfície de sondas vesicais em função do tempo.....48

FIG 3. Contagem de células do biofilme em Log UFC/ cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E.coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Gentamicina pelo método do MIC.....49

FIG 4. Contagem de células do biofilme em Log UFC/ cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E.coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Tetraciclina pelo método do MIC.....50

FIG 5. Contagem de células do biofilme em Log UFC/ cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E.coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Cloranfenicol pelo método do MIC.....51

FIG 6. Contagem de células do biofilme em Log UFC/ cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de *E.coli* ATCC 25922 e selvagem após a exposição ao antibiótico Ciprofloxacina pelo método do MIC.....52

Lista de tabelas

Lista de Tabelas do Artigo

Tabela 1. Perfil Antimicrobiano das cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e Selvagem pelo Método de Disco-Difusão.....53

Tabela 2. Perfil Antimicrobiano da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da *Escherichia coli* ATCC 25922 e Selvagem planctônica.....54

Listas de abreviaturas e símbolos

ITU	Infecção do Trato Urinário
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Policloreto de vinila
%	Porcentagem

Resumo

Biofilmes são pequenos ecossistemas, complexos e dinâmicos, formados por microorganismos envolvidos em uma matriz de polímeros orgânicos aderidos a uma superfície. A patogenia das infecções atribuídas ao uso de cateteres está relacionada com a formação e permanência dessas comunidades microbianas em superfícies de dispositivos médicos, favorecendo a resistência aos agentes antimicrobianos e a dispersão das infecções. No entanto, as infecções do trato urinário estão frequentemente relacionadas à formação de biofilme, tendo a *Escherichia coli* como agente prevalente. O risco de infecção está associado ao tempo de permanência desse dispositivo no paciente e podem gerar complicações graves, sequelas, aumento no tempo de internação e aumento nos custos com o tratamento do paciente. O biofilme é um fator crucial nas infecções bacterianas graves por conferir resistência contra os agentes antimicrobianos. A dinâmica do desenvolvimento do biofilme é estudada nas áreas ambiental, industrial e, recentemente, na área da saúde, onde se observa uma forte preferência das bactérias pela vida aderida a uma superfície, ao invés do estado planctônico. A análise dessa dinâmica de adesão e os mecanismos de resistência bacteriana, associados aos dispositivos médicos, são a base para encontrar novas maneiras de interromper a evolução dos biofilmes frente às infecções crônicas que acometem pacientes hospitalizados e acarretam danos à saúde individual e a saúde pública. O objetivo dessa pesquisa foi observar a dinâmica de formação do biofilme e a resistência aos antibióticos de *Escherichia coli* em cateter urinário de látex siliconizado. Foram mostrados nos dados a curva de crescimento bacteriano e foi possível analisar a dinâmica da adesão e a associação da resistência bacteriana com o dispositivo médico e a visualização do padrão de resistência na condição de biofilme comparado a forma planctônica.

Abstract

Biofilms are small complex and dynamic ecosystems formed by microorganisms involved in a matrix of organic polymers attached to a surface. The pathogenesis of infections attributed to the use of catheters is related to the formation and permanence of these microbial communities on the surfaces of medical devices, promoting resistance to antimicrobial agents and the spread of infections. However, Urinary Tract Infections are frequently associated with biofilm formation, and *Escherichia coli* is a prevalent agent. The risk of infection is associated with how long this device stays in the patient and can lead to serious complications, sequels, increased length of hospitalization and increased costs in the patient's treatment. Nevertheless, biofilm is a crucial factor in serious bacterial infections because it possesses the ability to create resistance against antimicrobial agents. The dynamic of biofilm development has been studied for some time in the environmental, industrial areas, and, recently, in healthcare as well, where we observe a strong preference from the bacteria for the life attached to a surface, rather than in the planktonic state. The analysis of this dynamic adhesion and mechanisms of bacterial resistance, associated medical devices, are the basis for finding new ways to stop the development of biofilms in the chronic infections which affect hospitalized patients and cause damage to individual and public health. The objective of this research was to observe *Escherichia coli* dynamics of biofilm formation and bacterial antibiotic resistance in siliconized latex urinary catheter. We showed in the data microbial growth curve and bacterial resistance associated with medical devices, and was possible analyzed the dynamics of adhesion and the pattern of antibiotic resistance in biofilm condition compared to planktonic form.

1. INTRODUÇÃO

Os biofilmes são pequenos ecossistemas, complexos e dinâmicos, formados por micro-organismos envolvidos em uma matriz de polímeros orgânicos aderidos a uma superfície, configurando um modo protegido de desenvolvimento bacteriano mediante as situações hostis, tornando-se assim altamente resistentes aos tratamentos antimicrobianos. São os responsáveis pelos aumentos no número de infecções em ambiente hospitalar, devido a contaminação de superfícies de equipamentos e dispositivos médicos (1, 2).

Cerca de 50 % das infecções microbianas estão associadas à formação de biofilmes, o que aumenta a resistência de algumas espécies de bactérias em função da susceptibilidade das mesmas aos agentes antimicrobianos. O modo de crescimento através de estratégias multicelulares do biofilme confere maior cronicidade às infecções e consequente resistência, já que a impenetrabilidade dos antimicrobianos se dá devido à presença do polímero hidrofílico que reveste os micro-organismos (3, 4).

As infecções nosocomiais mais frequentes estão relacionadas à formação de biofilme, principalmente as infecções do trato urinário (ITU), que representam 40% dos casos e são atribuídos à sondagem vesical por tempo prolongado, o que diretamente pode estar ligado à instrumentação e ao manuseio do trato urinário, além da própria colonização do meato uretral (5, 6). Elas podem gerar complicações graves, sequelas, aumento no tempo de internação e, conseqüentemente, aumento nos custos com o tratamento do paciente (7).

Apesar das defesas inatas do trato urinário humano contra infecções microbianas, alguns micro-organismos são capazes de colonizar e sobreviver nesse ambiente. A microbiota desenvolve estratégias específicas para permanecer nesse local, incluindo a colonização de materiais utilizados em procedimentos de sondagem, a evasão das defesas do hospedeiro e o dano às células do paciente. A maioria dos micro-organismos causadores dessas infecções são contaminantes fecais, habitantes da microbiota normal do indivíduo ou da microbiota dos profissionais de saúde que entram em contato com o paciente (8).

Os agentes da família *Enterobacteriaceae* são os mais isolados, incluindo o gêneros *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp., no entanto, *Escherichia coli* se destaca sendo responsável por quase 40% das infecções urinárias (9). *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* também estão presentes nas infecções urinárias relacionadas ao uso de cateteres, porém com menos frequência (10, 11).

Em pacientes com sondagem prolongada os materiais na composição da sonda como teflon, silicone e látex não previnem a infecção (12), ao contrario o látex tem demonstrado ser uma superfície que facilita a adesão comparada outros tipos de materiais. Sendo assim, deve-se considerar o uso desnecessário das sondas, a escolha do tipo de drenagem, dimensão do cateter, o tipo de cateter utilizado como critério para diminuir os riscos da formação do biofilme (13).

A dinâmica do desenvolvimento do biofilme vem sendo estudada há algum tempos nas mais diversas áreas, incluindo a ambiental, industrial e mais recentemente na área da saúde onde se observa uma forte tendência das bactérias pela vida aderida a uma superfície, ao invés do estado planctônico (2).

O biofilme como um ponto inicial para as infecções bacterianas graves conferindo aumento na resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos deve ser mais amplamente estudado ao passo que são crescentes as preocupações em combatê-lo. A análise da dinâmica de adesão e os mecanismos de resistência bacteriana, associados aos dispositivos médicos, são de grande importância, pois servirão de base para encontrar maneiras de erradicação ou interrupção da evolução dos biofilmes frente às infecções crônicas que acometem pacientes hospitalizados, minimizando o prejuízo à saúde individual e a saúde pública (7).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

O registro fóssil de formação de biofilme data de aproximadamente 3,25 bilhões de anos, portanto, biofilme é um modo de vida antigo dos procariotos como meio de sobrevivência em ambientes hostis (14). Além disso, em meados do século XVII Antonie van Leuwenhoek realizou o estudo com placa de tártaro dentário, primeiros relatos documentados sobre o biofilme, utilizando seu microscópio para descrever esses agregados (15).

Claude Zobell observou no ambiente marinho que o número de bactérias aderidas à superfície era maior do que as disponíveis no meio circundante, portanto, as células bacterianas eram mais atraídas pelas superfícies formando assim populações sésseis. A partir disso, concluiu que o processo de adesão se resumia a duas fases; inicialmente a ligação reversível, em que as células bacterianas podem se desprender da superfície, e a irreversível que representa o processo completo da adesão e fixação, com o desprendimento apenas das células que se encontram na camada externa do biofilme (15, 16, 17).

Na área industrial, estudos observacionais da formação de biofilmes em sistemas de água industriais demonstraram que além de um rearranjo estrutural bastante organizado, os biofilmes eram resistentes a desinfetantes e agentes sanificantes, o que inicialmente sugeriu a resistência aos agentes antimicrobianos (18, 19).

Historicamente, os micro-organismos são caracterizados como de vida livre, ou células em suspensão, mas o rearranjo estrutural desses indivíduos de vida livre redirecionou esse conceito. A estruturação desses micro-organismos denominados biofilmes, demonstra uma grande especificidade em relação ao mecanismo de adesão em diversas superfícies inanimadas, bem como em tecidos vivos (20, 19).

Os biofilmes são uma realidade que afetam os seres humanos diretamente, abrangendo as áreas naturais, industriais e médicas. Esse tipo de interação bacteriana não é

totalmente prejudicial, pois em alguns casos, pode haver uma simbiose, excluindo a possibilidade de alguma doença (21).

Na área médica o biofilme vem demonstrando grande relevância clínica, tornando-se o responsável pelo aumento no número de infecções em ambientes hospitalares (22). Os micro-organismos aderem-se às superfícies de equipamentos e instrumentos médico-hospitalares formando grandes comunidades estruturalmente organizadas (23).

No entanto, a patogenia das infecções atribuídas ao uso de catéteres tem sido relacionada com a permanência destas bactérias nas superfícies desses dispositivos médicos, favorecendo a transferência dos fatores de resistência a agentes antimicrobianos, causando assim um enorme problema no controle das infecções hospitalares. Em geral sabe-se que os biofilmes são comunidades altamente dinâmicas que se renovam constantemente, incorporando novas partículas, novos micro-organismos que se encontram circundantes a eles, o que pode conferir maior cronicidade às infecções (24, 3).

2.2 O Biofilme

Os biofilmes são uma forma de vida em comunidade, formados por micro-organismos envolvidos em uma matriz de polímeros orgânicos aderidos a uma superfície abiótica ou biótica. As células bacterianas interagem entre si e com o ambiente externo. Sabe-se que as células em suspensão têm uma forte tendência pela adesão a alguma superfície, como estratégia de sobrevivência básica e proteção de qualquer estresse ambiental (25, 2).

A adesão e formação do biofilme são divididas em três etapas: fixação, adesão e agregação, levando a uma ligação irreversível das partes envolvidas em um estágio final de amadurecimento da comunidade microbiana instalada. Etapas essas que dependem de um ambiente apropriado, que incluem presença de nutrientes, pH, temperatura, concentrações de oxigênios, bem como as características da superfície, que podem causar um efeito significativo na ligação. Superfícies mais ásperas e hidrofóbicas tendem a formar biofilmes rapidamente (23, 26, 22).

As características do material a ser aderido, bem como as estruturas presentes na superfície das células bacterianas, influenciam no processo de adesão, tais como, flagelos, pili, fímbrias e glicocálice, e podem ter um impacto significativo na adesão, ao passo que

as células bacterianas ultrapassam as forças de repulsão comuns a todos os materiais, esses mecanismos ajudam a manter a célula ligada à superfície até que o processo de fixação esteja completo (22).

O biofilme forma um ciclo de dispersão que abrange três fases. O descolamento das células bacterianas a partir das colônias dispostas em biofilme, a migração dessas células para um novo local e a fixação a um novo substrato ou local, encerrando assim o ciclo e iniciando um possível processo infeccioso. Esse mecanismo de dispersão pode ainda ser dividido em duas categorias, dispersão ativa e passiva, considerando que a dispersão ativa refere-se ao processo que o próprio biofilme faz para o desprendimento e colonização de outros sítios, já a dispersão passiva, refere-se ao mesmo processo de desprendimento mediado por forças externas ao biofilme, como colisões de partículas externas, abrasões, corte de fluídos e processos mecânicos de retirada do dispositivo médico (27).

O biofilme pode ser constituído por um ou mais tipos de micro-organismos, o seu funcionamento é mais coordenado e eficaz quando constituído por uma única espécie, o que pode estar relacionado ao modo de crescimento por meio de estratégias multicelulares, conferindo maior cronicidade e agressividade às infecções e consequente resistência (28, 3).

Após a adesão os biofilmes formam uma ligação irreversível, uma vez que as células planctônicas, ou células de micro-organismos em suspensão, se unem para a formação de uma comunidade. Podem ser encontrados em superfícies de tecidos vivos, dispositivos médicos, como inox, silicone, látex, entre outros. Porém o látex devido a sua conformação estrutural, com superfície irregular e porosa tem demonstrado maior facilidade para a adesão do que os demais materiais (22, 13).

2.3 Formação do Biofilme

2.3.1 Matriz Extracelular

Estruturalmente os biofilmes são agregados de células e produtos bacterianos, ligados a uma superfície ou substrato e envoltos em uma matriz extracelular, responsável pela união, desenvolvimento e proteção dessas células (21). Embora o biofilme seja idealizado como sendo, uma camada fina e homogênea não é isso que ocorre, eles são

estruturalmente heterogêneos com camadas e espessuras irregulares que facilitam a circulação de oxigênio e o transporte de nutrientes (29).

A matriz extracelular é composta de água, células microbianas, nutrientes, metabólitos, produtos de lise celular, partículas do ambiente circundantes, além de material genético, proteínas, polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídios, no entanto a composição da matriz extracelular depende muito das condições de crescimento que o meio proporciona, e da variabilidade de espécies formadoras de biofilme, de modo que os mecanismos que regulam a formação variam de acordo com as espécies de micro-organismos (29, 21).

Portanto, o biofilme é um aglomerado de células bacterianas envoltos em uma matriz extracelular e separados por canais que servem como um sistema circulatório primitivo por onde passam os nutrientes e os resíduos metabólicos (30, 31).

2.3.2 Etapas da Adesão e Formação do Biofilme

A sequência do desenvolvimento do biofilme é regulada por cinco etapas que no geral compreendem três fases, a fixação, adesão e agregação (maturação). Inicialmente, nas etapas I, II ocorre a fixação seguida da adesão, nas etapas III e IV as células se agregam formando microcolônias encerrando o desenvolvimento com a maturação, e finalmente na etapa V as células são liberadas para a colonização de outras superfícies (31).

Na etapa I, as células bacterianas se encontram no estado planctônico, em suspensão e através da motilidade ou de fluidos do ambiente externo tendem a se aproximar da superfície. Algumas forças de interação eletrostáticas e forças hidrofóbicas formam uma barreira entre as células e a superfície, que precisam ser vencidas. Durante esse processo as forças de interação Van der Waals podem influenciar na reversão da adesão, o que confere a fase reversível em que o biofilme pode ser removido. Na etapa II a ligação da célula à superfície, passa a ser irreversível, a partir da produção de adesinas e polímeros extracelulares, que interagem formando uma ligação fixa (32, 33, 34).

As etapas III e IV marcam o início da arquitetura do biofilme, resultando na formação de microcolônias envolvidas em substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que servem de matriz unindo as células e possibilitando o acesso aos nutrientes. Nessa

etapa formam-se os canais que transportam o oxigênio, água e os nutrientes para o interior do biofilme, bem como permitem que os resíduos metabólicos sejam eliminados (35).

Na etapa V ocorre a liberação ou a dispersão das bactérias que estavam dispostas na superfície do biofilme, para o meio externo, a fim de reiniciar o ciclo de formação e adesão como apresentado na figura 1 (29, 36, 37).

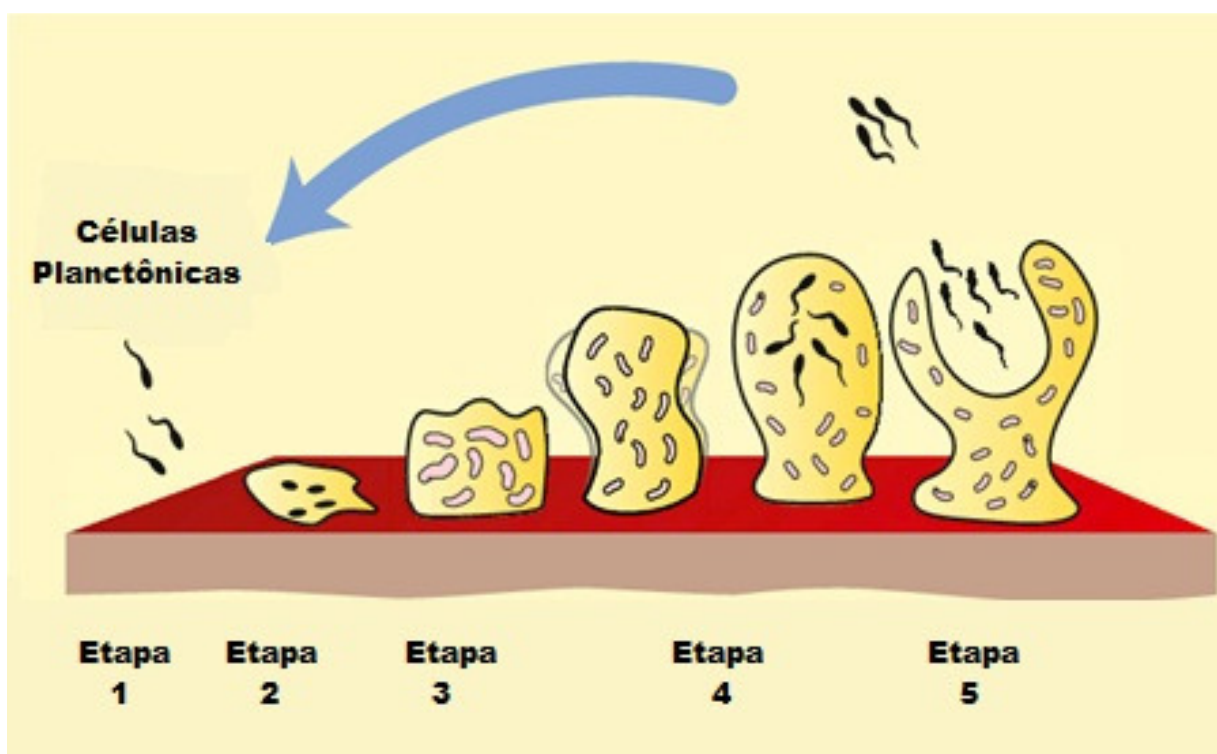


Figura 1: Representação das Etapas da Adesão e Formação de Biofilme Bacteriano
Fonte: Adaptado de GALANAKOS, 2009.

2.4 Patogenicidade do Biofilme

Os fatores de virulência são responsáveis pela patogenia dos micro-organismos, fatores relacionados com a constituição bacteriana, tais como: I) flagelos que facilitam a adesão e fixação das células nas superfícies, II) pili, responsável pela motilidade dos micro-organismos facilitando assim a disseminação de novas células a outros nichos de proliferação e colonização, III) lipolissacarídeos constituintes importantes da membrana das bactérias gram-negativas, os quais são importantes na adesão, por exemplo, na superfície de sílica, e IV) *quorum sensing*, que faz a comunicação entre os micro-

organismos, permitindo que os mesmos atuem de forma coordenada, alguns estudos sugerem que esse mecanismo é o responsável pela transferência da resistência bacteriana em relação aos antibióticos (28).

A expressão de fatores genéticos exerce um papel significativo para a formação do biofilme, alguns genes estão relacionados com a estruturação da arquitetura das células bacterianas e a caracterização da sobrevivência nessa condição. Podem estar expressos ou suprimidos, por exemplo, os genes responsáveis pela síntese dos flagelos, podem estar expressos nas células planctônicas, mas suprimidos quando em biofilme (38).

Alguns genes são determinantes genéticos considerados marcadores de virulência, pois podem expressar proteínas de membrana que sintetizam moléculas de adesão responsáveis pela fixação intercelular ou enzimas que inativam os antimicrobianos, porém a expressão desses genes é restrita a cada espécie (39, 40).

Vários genes estão envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antibióticos, na resposta ao estresse ambiental, na produção de enzimas e proteínas, apresentando características que não estariam expostas na condição de células planctônicas (41). Muitos desses genes estão associados a diferentes fenótipos e expressos em níveis mais elevados no biofilme (42).

A capacidade de evadir as defesas do hospedeiro, o aumento na eficiência metabólica através de organização funcional, o aumento na produção de toxinas, a proteção contra os agentes antimicrobianos, o desprendimento das células da superfície do biofilme, permitindo a instalação dos micro-organismos em outros sítios, e a interação e troca de genes resultando em cepas mais virulentas e mais resistentes relacionados com o *quorum sensing*, são considerados mecanismos patogênicos (23, 19, 25).

2.4.1 *Quorum sensing*

A formação do biofilme é mediada por um mecanismo de comunicação célula a célula através de múltiplas vias de sinalização, esse processo é denominado *quorum sensing* (43).

O *quorum sensing* tem sido um dos responsáveis pela patogenicidade dos biofilmes, conferindo o aumento da resistência aos antibióticos e a proteção das células bacterianas contra as defesas do hospedeiro (43). Esse processo de comunicação ocorre por meio de moléculas de sinalização, ou moléculas indutoras, que estão presentes nas células

do biofilme, que se diferenciam de acordo com as espécies de micro-organismos. As células bacterianas se comunicam para que possam expressar genes específicos de resistência a antimicrobianos, para a produção de toxinas e enzimas, bem como outros fatores de virulência responsáveis pela interação com o sistema imune, dificultando, por exemplo, a fagocitose (37, 44).

A comunicação intercelular pode ser classificada em dois tipos: a intra-específica essa comunicação é importante na expressão fenotípica das células, e regulação do crescimento e comportamento frente ao ambiente, e a interspecífica a qual tem a capacidade de reconhecer uma linguagem “universal” entre as bactérias, permitindo assim a interação das bactérias e as moléculas de sinalização (43).

O *quorum sensing*, desempenha um papel bastante complexo e importante na condição de biofilme bacteriano, na sua formação e na manutenção de uma arquitetura funcional, na sobrevivência e na disseminação das células bacterianas, aumentando assim o grau de patogenicidade das infecções (44, 43).

2.5 Micro-organismos

Os micro-organismos comumente encontrados em infecções nosocomiais relacionadas à formação do biofilme são os da família *Enterobacteriaceae*, destacando *Escherichia coli*, além do gênero *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas* sp. essa última geralmente relacionadas a infecções do trato respiratório, podendo ser encontrada também em outros sítios de infecção (23, 9). *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* também estão presentes nas infecções urinárias relacionadas ao uso de cateteres (11).

Especificamente os micro-organismos isolados em cateteres vesicais, ou sondas vesicais, são *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis*, sendo a maioria deles gram-negativos (22).

A maioria dos micro-organismos causadores das infecções urinárias são contaminantes fecais, habitantes da microbiota normal do indivíduo ou dos profissionais de saúde que entram em contato com o paciente imunodeprimido e com o tempo prolongado de cateterização (8).

2.5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é a espécie predominante do trato gastrointestinal e um dos principais patógenos responsáveis pelas infecções do trato urinário (ITU), considerada de grande importância pela sua alta versatilidade, pois facilmente passa de uma simples colonizadora comensal para um patógeno oportunista extremamente ofensivo, podendo causar inúmeras infecções extra intestinais. É uma espécie bacteriana gram-negativa, anaeróbica facultativa e atualmente existem mais de 250 sorotipos conhecidos (45)

Contudo, a *E. coli* possui diferenciais genéticos que tem se demonstrado essenciais para a formação do biofilme. Estudos moleculares apresentaram um repertório amplo de adesinas, genes de resistência e fatores de virulência, envolvidos na formação do estilo de vida em comunidade, conferindo maior competitividade com relação ao potencial patogênico das demais espécies uropatogênicas (46, 47).

Diante disso, a capacidade de cepas comensais colonizadoras do trato gastrointestinal, tornarem-se patogênicas e serem capazes de colonizarem as superfícies de sondas vesicais proporcionando a formação de biofilmes, a presença de padrões genéticos que possibilitam a aderência e a expressão de fatores de virulência e resistência credenciam as cepas de *E. coli* como micro-organismo modelo para o estudo da adesão e formação de biofilme (47, 45).

2.6. Biofilmes e as Infecções do Trato Urinário

Estima-se que as infecções nosocomiais relacionadas a biofilmes correspondem a 65% das infecções no âmbito hospitalar, que pode estar diretamente relacionado à formação dos biofilmes desde fios de sutura a diversos tipos de cateteres e outros dispositivos médicos direcionados a manutenção do bem estar do paciente (23, 48).

No entanto, cerca de 40% dos casos de infecções hospitalares, correspondem a infecções do sistema urinário. Embora não sejam de natureza muito séria, elas podem gerar complicações graves, sequelas, aumento no tempo de internação e, conseqüentemente, aumento nos custos com o tratamento do paciente (7). Cerca de 20 a 50 % dos pacientes internados fazem uso de cateteres ou sondas urinárias, procedimento muitas vezes desnecessário o que eleva o risco de complicações durante o período de hospitalização (8, 48).

O desenvolvimento de infecções urinárias depende de fatores intrínsecos ao paciente, como a microbiota colonizadora, sexo, pH urinário, disfunções anatômicas, doenças subjacentes como diabetes, fatores genéticos, entre outros, e extrínsecos, como virulência e capacidade de aderência do micro-organismo, uso prolongado de sondas e técnicas de assepsia utilizadas em procedimentos de sondagem (49).

Embora as defesas inatas do trato urinário humano contra infecções microbianas, estejam ativadas, alguns micro-organismos são capazes de colonizar e sobreviver nesse ambiente inóspito, os agentes patogênicos desenvolvem estratégias específicas que contribuem para a evasão das defesas do hospedeiro causando dano às células do paciente e com conseqüente colonização de materiais (8).

As infecções do trato urinário, causadas por biofilmes, estão diretamente relacionadas ao uso de cateteres ou sondas vesicais, dispositivos que são necessários para o alívio de retenção urinária ou gestão da incontinência. O risco de infecção está associado ao tempo de permanência do dispositivo no paciente, pois raramente as infecções provocadas por biofilme se desenvolvem em pacientes submetidos à cateterização por um curto período, o que não se descarta tal possibilidade, principalmente quando os pacientes são idosos ou imunodeprimidos, ou seja, quanto maior o tempo de sondagem, maiores e mais graves serão as complicações (7, 13, 2).

As sondas urinárias são comercializadas em diferentes tipos de materiais e formas, elas podem ser impregnadas com antibióticos ou anti-sépticos, sendo a prata o agente bactericida mais comum. Os materiais mais encontrados na composição da sonda são: politetrafluoretileno (PTFE), policloreto de vinila (PVC), látex puro, hidrogel, elastômero de silicone, e silicone puro, em casos de sondagem prolongada as variadas composições infelizmente não previnem a infecção (50, 12, 2).

Duas vias de iniciação de colonização da superfície do cateter são consideradas importantes, a contaminação no ato da inserção do dispositivo, por um procedimento incorreto de assepsia, já que os micro-organismos responsáveis pela infecção geralmente são os da microbiota do paciente ou do profissional; em outra via possível os micro-organismos ganham o acesso para a colonização através da falha no sistema de drenagem da sonda (51).

Estratégias simples podem ser usadas para amenizar o risco de infecções urinárias causadas por biofilmes em pacientes com sondas vesicais, incluindo procedimentos como, a correta higienização das mãos, o uso de luvas no contato direto com o paciente ou urina

contaminada, bem como procedimentos específicos de inserção asséptica do equipamento e manutenção de um sistema de drenagem estéril (10, 12).

Vários pontos contam para uma boa prática do procedimento, minimizando assim a possível formação do biofilme e conseqüente infecção. Portanto, deve se considerar o uso desnecessário das sondas, a escolha do tipo de drenagem, dimensão do cateter, e o mais importante, o tipo de cateter utilizado. Procedimentos simples como esses podem diminuir as incidências de infecções do trato urinário relacionadas ao biofilme e a resistência à terapia antimicrobiana (13).

2.7 Perfil de resistência a agentes antimicrobianos em adesão e biofilme

A presença de biofilmes em dispositivos médicos pode levar a resistência bacteriana aos antibióticos, e a condição de formação do biofilme é um mecanismo adaptado dos micro-organismos contra a sua erradicação (52).

As alterações no metabolismo bacteriano podem impedir a entrada ou ação dos agentes antimicrobianos na matriz extracelular. Uma hipótese é de que, em camadas profundas dos biofilmes a hipóxia seja considerável, afetando a atividade antimicrobiana; a outra é de que algumas das bactérias dispostas em biofilmes possuem diferenciação fenotípica que conferem resistência à erradicação, já que algumas proteínas superficiais de ligação com os agentes antimicrobianos podem não serem ou estarem expressas em baixos níveis (52, 53).

Contudo, a ineficácia dos antibióticos no tratamento contra os biofilmes tem sido associada a uma variedade de mecanismos; como a resistência extrínseca da matriz extracelular e a resistência intrínseca onde características fenotípicas estão presentes na condição de biofilme, o que não ocorre com os homólogos na condição de células planctônicas, as bactérias ativam alguns genes responsáveis pela alteração da estrutura celular, bem como conseqüentemente alguns alvos moleculares de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos e por fim, o sistema organizado de comunicação entre as células do biofilme, sistema que tem demonstrado ser o responsável pela transferência de informações genéticas de resistência bacteriana (51).

A ação da terapêutica antimicrobiana convencional é direcionada a célula individual, no estado planctônico, com o objetivo de erradicar ou estacionar o

desenvolvimento microbiano. Com a evolução nos mecanismos de defesas dos microorganismos através da formação de biofilme bacteriano, a atividade antimicrobiana fica prejudicada, embora haja uma ação contras as células planctônicas liberadas pelos biofilmes, a erradicação ou o extermínio do biofilme em si e o controle da infecção muitas vezes não é eficaz (23).

Estudos relacionados à resistência sugerem que a produção de enzimas que inativam as moléculas dos antibióticos são os responsáveis pela não efetividade do antibiótico. Porém, o mecanismo de resistência é multifatorial e pode variar de um microorganismo para outro. Esta combinação de fatores torna difícil a erradicação do biofilme e em muitos casos a remoção do dispositivo é imprescindível para que o tratamento da infecção seja possível (52, 53).

Alguns antibióticos da classe dos aminoglicosídeos e beta-lactâmicos tem se mostrado efetivo no combate da formação de biofilmes e até em biofilmes jovens, ao passo que as fluoroquinolonas, como a ofloxacina, a ciprofloxacina e a levofloxacina têm apresentado resultados positivos contra biofilmes jovens e maduros, isso por conta da capacidade de penetrar na matriz extracelular; mas vale ressaltar que o processo estudado sugere que esses antibióticos atuam retardando o processo de adesão e formação do biofilme, atacando as células planctônicas, parando ou reduzindo as atividades metabólicas das bactérias impedindo assim a proliferação e o reinício do ciclo do biofilme (51, 54).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a dinâmica de adesão e formação de biofilme em superfícies de sondas vesicais constituídas de látex siliconizado, utilizando *Escherichia coli* ATCC 25922, e cepa homóloga isolada de ambiente hospitalar, selvagem.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir a adesão e formação de biofilme em superfície de látex siliconizado, com a cepa ATCC de *Escherichia coli*, e cepa Selvagem oriunda de ambiente hospitalar e relacionada a infecções do trato urinário.
- Avaliar o tempo de formação do biofilme, utilizando técnicas microbiológicas de avaliação do crescimento bacteriano.
- Avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos.
- Comparar a capacidade de adesão e formação de biofilme e o perfil de resistência bacteriana da cepa ATCC e selvagem de *Escherichia coli*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Apr;7(2):277-81.
2. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol.* 2008 Nov;5(11):598-608.
3. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 2001 Jul 14;358(9276):135-8.
4. Tiba MR, Nogueira GP, Leite DdS. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2009;42:58-62.
5. Souza ACS, Tipple AFV, Barbosa JM, Pereira MS, Barreto RASS. Cateterismo urinário: conhecimento e adesão ao controle de infecções pelos profissionais de enfermagem. *Revista Eletrônica de Enfermagem [serial on the Internet].* 2007; 9(3): Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n3/v9n3a12.htm>.
6. Souza Neto JLe, Oliveira FVd, Kobaz AK, Silva MNP, Lima AR, Maciel LC. Infecção do trato urinário relacionada com a utilização do cateter vesical de demora: resultados da bacteriúria e da microbiota estudadas. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* 2008;35:28-33.
7. Fernandes MVL, Lacerda RB, Hallage NM. Construção e validação de indicadores de avaliação de práticas de controle e prevenção de infecção do trato urinário associada a cateter. *Acta Paulista de Enfermagem.* 2006;19(2):174-89.
8. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.* 2008 Jan;21(1):26-59.

9. Blatt JM, Miranda MC. Profile of the microorganisms which cause of urinary tract infections in interned patients. *Revista Panamericana de Infectologia*. 2005;7(4):10-4.
10. Kowalczyk D, Ginalska G, Piersiak T, Miazga-Karska M. Prevention of biofilm formation on urinary catheters: Comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Oct;100B(7):1874-82.
11. Stamm AMNdF, Coutinho MSSdA. Infecção do trato urinário relacionada ao cateter vesical de demora: incidência e fatores de risco. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 1999;45:27-33.
12. Nicolle LE. The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 May;22(5):316-21.
13. Rzeznik C, Camargo IC, Machado JC, Gerloff KR, Marques MRB, Heidtmann STMB. Protocolo: Prevenção da Infecção do Trato Urinário Relacionado ao Cateter Vesical. *Mom & Perspec Porto Alegre*. 2004 Jul/Dez 2004;17(2):22-5.
14. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):95-108.
15. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999 May;11(3-4):217-21; discussion 37-9.
16. Steven L. Percival SM, Helena Cruz, and David W. Williams. *Introduction to Biofilms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2011.
17. Zobell CE. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol*. 1943 Jul;46(1):39-56.
18. Characklis W. Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res* 1973(7):1249-58.

19. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):881-90.
20. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am.* 1978 Jan;238(1):86-95.
21. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jul;2(7):a000398.
22. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 15;33(8):1387-92.
23. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* 2008 Dec;12(6):526-30.
24. Stephens C. Microbiology: breaking down biofilms. *Curr Biol.* 2002 Feb 19;12(4):R132-4.
25. Sawhney R, Berry V. Bacterial biofilm formation, pathogenicity, diagnostics and control: An overview. *Indian J Med Sci.* 2009 Jul;63(7):313-21.
26. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5427-33.
27. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res.* 2010 Mar;89(3):205-18.
28. Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection.* [doi: DOI: 10.1016/j.jhin.2006.06.028]. 2006;64(4):313-25.
29. Galanakos SP, Papadakis SA, Kateros K, Papakostas I, Macheras G. Biofilm and orthopaedic practice: the world of microbes in a world of implants. *Orthopaedics and Trauma.* [doi: 10.1016/j.mporth.2009.02.002]. 2009;23(3):175-9.

30. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Feb;2(2):114-22.
31. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Micro.* [10.1038/nrmicro821]. 2004;2(2):95-108.
32. Abee T, Kovacs AT, Kuipers OP, van der Veen S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Apr;22(2):172-9.
33. Kumar CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 1998 Jun 30;42(1-2):9-27.
34. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology.* [doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008]. 2010;43(4):573-83.
35. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Apr;15(2):167-93.
36. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Jun;13(3):228-33.
37. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* 2011 Apr;3(2):55-65.
38. Ogasawara H, Yamamoto K, Ishihama A. Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J Bacteriol.* 2011 May;193(10):2587-97.
39. Cue D, Lei MG, Lee CY. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:38.

40. Liduma I, Tracevska T, Bers U, Zilevica A. Phenotypic and genetic analysis of biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(6):305-9.
41. Lynch SV, Dixon L, Benoit MR, Brodie EL, Keyhan M, Hu P, et al. Role of the *rapA* gene in controlling antibiotic resistance of *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Oct;51(10):3650-8.
42. Weber MM, French CL, Barnes MB, Siegele DA, McLean RJ. A previously uncharacterized gene, *yjfO* (*bsmA*), influences *Escherichia coli* biofilm formation and stress response. *Microbiology*. 2010 Jan;156(Pt 1):139-47.
43. Lazar V. Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*. 2011 Dec;17(6):280-5.
44. Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*. 2006 Apr;296(2-3):133-9.
45. Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. In vitro biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *J Bacteriol*. 2006 May;188(10):3572-81.
46. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;322:249-89.
47. Ferrieres L, Hancock V, Klemm P. Biofilm exclusion of uropathogenic bacteria by selected asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains. *Microbiology*. 2007 Jun;153(Pt 6):1711-9.
48. Storti A, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from Intensive care Unit Patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005;36:275-80.
49. Lucchetti G, Silva AJ, Ueda SMY, Perez MCD, Mimica LMJ. Analysis of the frequency and antimicrobial susceptibilities to urinary tract infections agents in chronic catheterized patients. *J Bras de Patol Med Lab*. 2005 Dez 2005;41(6):383-9.

50. Jahn P, Preuss M, Kernig A, Seifert-Huhmer A, Langer G. Types of indwelling urinary catheters for long-term bladder drainage in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007(3):CD004997.
51. Tenke P, Kovacs B, Jackel M, Nagy E. The role of biofilm infection in urology. *World J Urol.* 2006 Feb;24(1):13-20.
52. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. *Am J Infect Control.* 2008 Dec;36(10):S175 e9-11.
53. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews.* [doi: DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.007]. 2005;57(10):1539-50.
54. Tenke P, Koves B, Nagy K, Hultgren SJ, Mendling W, Wullt B, et al. Update on biofilm infections in the urinary tract. *World J Urol.* 2012 Feb;30(1):51-7.

5. ANEXOS

5.1 Anexo I – Artigo Científico

Título: CINÉTICA E RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SONDAS VESICAIS

Lujan Nunes Sanabria Aliatti ¹, Fábio Juliano Negrão ², Kelly Cristina da Silva Brabes ³

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil

² Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil

³ Faculdade de Engenharia, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil

Autor Correspondente: Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão – Universidade Federal da Grande Dourados-Rodovia Dourados-Ithaum KM 12-CEP: 79804-970-Fone: 55 67 4310-2334. E-mail: fabionegrão@ufgd.edu.br .Dourados-MS, Brasil.

CINÉTICA E RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli* NA ADESÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM SONDAS VESICAIS

Resumo

A patogenia das infecções atribuídas ao uso de cateteres tem sido relacionada com a formação de comunidades microbianas, conhecidas como biofilme. A permanência dessas bactérias em superfícies de dispositivos médicos favorece a resistência aos agentes antimicrobianos, a manutenção das infecções e a dispersão dos micro-organismos. As infecções do Trato Urinário estão frequentemente relacionadas à formação de biofilme, tendo *Escherichia coli* como agente prevalente. Com o objetivo de avaliar a dinâmica de crescimento e resistência em biofilme microbiano, foi induzida a adesão e a formação de biofilme de *Escherichia coli* ATCC 25922 e selvagem, avaliou-se o perfil de resistência no modo de vida planctônico e aderido em sondas vesicais de látex, pela técnica de disco-difusão frente a treze antibióticos e o teste de concentração inibitória mínima em placa, frente a quatro antibióticos. Foi possível observar a dinâmica do desenvolvimento bacteriano gradativo e constante, até o tempo de 256 horas. O tempo de 32 horas de indução de adesão apresentou quantidade de células aderidas suficientes que caracterizam um biofilme estabelecido. Ambas as cepas apresentaram resistência aos antimicrobianos na condição de biofilme, no entanto a bactéria selvagem, mesmo com o número populacional menor, apresentou maior resistência quando comparada a ATCC, diferença não observada quando na forma planctônica. Desta forma, a análise da dinâmica de adesão e resistência bacteriana, associados aos dispositivos médicos, possibilitou a visualização do padrão de resistência frente aos antibióticos, quando em condição de biofilme, mesmo tendo apresentado sensibilidade na forma planctônica.

INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais relacionadas a biofilmes correspondam a 65% das infecções no âmbito hospitalar (1, 2). A contaminação e colonização de superfícies de equipamentos e dispositivos médico-hospitalares direcionados a manutenção do bem estar do paciente são os responsáveis pelo aumento no número dessas infecções (3, 4, 5).

Cerca de 40% dos casos de infecções hospitalares, correspondem a infecções do sistema urinário (ITU), que podem levar a complicações graves, sequelas, aumento no tempo de internação e custos com medicação (6, 7).

As ITUs, causadas por biofilmes, são atribuídos à sondagem vesical por tempo prolongado e podem estar diretamente relacionados à instrumentação e ao manuseio do trato urinário, além da própria microbiota do paciente (8, 9).

As sondas urinárias são comercializadas em diferentes tipos de materiais e formas, elas podem ser impregnadas com antibióticos ou anti-sépticos, sendo a prata o agente bactericida mais comum. Os materiais mais encontrados na composição da sonda são: politetrafluoretileno (PTFE), policloreto de vinila (PVC), látex puro, hidrogel, elastômero de silicone e silicone puro, em casos de sondagem prolongada as variadas composições não previnem a infecção (10, 11, 5).

O risco de infecção está associado ao tempo de permanência desse dispositivo no paciente, pois raramente as infecções provocadas por biofilme se desenvolvem quando submetidos à cateterização por um curto período de tempo. Porém, não se descarta tal possibilidade, principalmente quando os pacientes são idosos ou imunodeprimidos (6, 12, 5).

O biofilme confere resistência aos micro-organismos aos agentes antimicrobianos e a análise da dinâmica de adesão e os mecanismos de resistência bacteriana, associados aos

dispositivos médicos, são importantes na adoção de medidas de controle, erradicação microbiana ou interrupção da evolução dos biofilmes (13, 6).

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa de *Escherichia coli*

Foram utilizadas na colonização das sondas vesicais as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e isolado selvagem de infecção urinária cedida pelo Laboratório Clínico do Hospital Universitário.

Cupom de Prova - Sondas Vesicais

Para o preparo dos cupons de prova, as sondas vesicais comerciais de látex siliconizado estéreis, serviram de suporte para a indução da adesão das células bacterianas e a formação de biofilme. Os cupons com tamanho aproximado de 1 cm² foram cortados em condições assépticas com o auxílio de uma tesoura esterilizada e expostos a luz UV no comprimento de onda de 260 nm, por 15 minutos (14).

Suspensão Bacteriana

Para obtenção da suspensão bacteriana de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, as cepas foram reativadas a partir da cultura estoque, utilizando alça de platina calibrada de 10 µL e inoculado em 9 mL de caldo BHI (Caldo de Infuso de Cérebro e Coração) e incubada a 37 °C por 24 horas. O caldo foi adaptado para dupla concentração, ou seja, duas vezes a quantidade de meio de cultura necessário em relação à quantidade de água destilada utilizada, com a finalidade de fornecer nutrientes suficientes para a reativação da cepa. Após o primeiro ciclo de ativação, 1 mL dessa suspensão foi transferida para outro tubo

contendo 9 mL de caldo BHI e incubado novamente nas mesmas condições do primeiro ciclo, totalizando 10 mL de suspensão bacteriana com dois ciclos de ativação (15).

Indução do Biofilme

Os cupons de prova foram imersos em 400 mL de meio de cultura enriquecido (BHI) em concentração dupla, com 10 mL de suspensão bacteriana ressuspensa e incubadas a 37°C por 256 horas, sem troca do meio de cultura durante o período de incubação (16, 15, 17). A avaliação do desenvolvimento do biofilme foi realizada em onze tempos de contato, sendo eles, tempos 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 32h, 64h, 128h e 256h, simulando o tempo de permanência da sonda no paciente. O tempo 0 (zero) correspondeu à análise logo após a imersão dos cupons de prova no meio de cultura juntamente com a suspensão bacteriana, afim de avaliar a possível interação do micro-organismo com a superfície neste primeiro momento (18, 19). Foi estabelecido o tempo de incubação de 32h para os demais testes, pois foi caracterizado como o tempo necessário para a obtenção de um do biofilme bacteriano bem estabelecido, após análises dos resultados obtidos da adesão.

Avaliação da adesão das células vegetativas

A cada tempo analisado, os cupons foram retirados com o auxílio de uma pinça dispostos em placas de petri esterilizadas e forradas com papel filtro para a retirada do excesso de células planctônicas, em seguida adicionados em tubos contendo 10 mL de solução tampão fosfato e rinsados 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 em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada tamponada, plaqueados

pela técnica de incorporação em Plate Count Agar (PCA) e incubados 37 °C/24 horas. Os resultados da contagem de células viáveis foram expressos na unidade de Log UFC/cm² por cupom de sonda avaliada (15, 17). Valores acima de 5 Log UFC/cm² e 6 Log UFC/cm², foram consideradas positivas para biofilme estabelecido (20, 21). A mesma técnica de diluição e contagem de células viáveis foram realizadas para a determinação da população planctônica.

Perfil de Resistência a Antibióticos

A avaliação do perfil de resistência a antibióticos foi realizado para as bactérias em estado planctônico e aderido. O perfil antimicrobiano das células planctônicas foi traçado por meio das técnicas de sensibilidade ou susceptibilidade aos antimicrobianos, disco difusão (Antibiograma) e Concentração Inibitória Mínima (MIC), de acordo com a metodologia preconizada pelo Clinical and Standards Institute (CLSI) (22). E, para testar a eficiência dos antibióticos mediante a condição de biofilme estabelecido, o teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC), foi adaptado para o mesmo protocolo de concentrações estabelecidas pela CLSI, e em substituição da suspensão bacteriana ajustada para a escala de MacFarland 1,5 x10⁸ usado como inóculo, os cupons aderidos com o biofilme estabelecido de 32h foram adicionados a 2 mL de caldo Muller Hinton diluído com antibióticos e incubados a 37 °C/24 horas. Os antibióticos testados foram Gentamicina, Tetraciclina, Cloranfenicol e Ciprofloxacina (22). Após o período de incubação os cupons foram retirados, adicionados a 10 mL de solução tampão fosfato e rinsados por 5 minutos no vórtex, a mesma técnica de diluição e plaqueamento foi realizada para a obtenção do número de células viáveis.

RESULTADOS

Cinética do desenvolvimento de *Escherichia coli* planctônica e em biofilme

Observou-se a dinâmica do desenvolvimento bacteriano em ambas as situações de células planctônicas e aderidas, diferindo apenas no número de ciclos realizados. Portanto, as duas cepas, tanto ATCC quanto a selvagem, demonstraram um comportamento celular esperado, com tendência de repetibilidade, apresentando todas as fases do desenvolvimento bacteriano.

Como apresentado nas figuras 1 e 2, nas duas condições não houve diferença estatística ($p < 0,05$) no comportamento entre elas, pois as duas apresentaram o mesmo perfil de crescimento. Porém, houve diferença ($p < 0,05$) no comportamento delas em relação ao tempo de cultivo.

Nos resultados apresentados na figura 1, observa-se que no tempo inicial de 0 h (zero), *E. coli* ATCC 25922 apresentou 10,37 Log UFC/mL e a selvagem com 10,3 Log UFC/mL, população suficiente para iniciar o processo de adesão. A quantidade de população ativa de *E. coli* ATCC 25922 e selvagem, foi de 13,5 Log UFC/mL e 14,4 Log UFC/mL, 18,7 Log UFC/mL e 17,3 Log UFC/mL para os tempos de 4h e 16h, respectivamente.

O desenvolvimento microbiano em biofilme pode ser observado e apresentado na figura 2, exibindo períodos de crescimento exponencial caracterizando a etapa de fixação e adesão com a disponibilização de células planctônicas para o processo de dispersão, bem como células aderidas à superfície como biofilme maduro.

No entanto, mesmo que a quantidade de células no tempo 0h (zero) tenha sido menor, 5,8 Log UFC/cm² e 7,1 Log UFC/cm² para *E. coli* ATCC 25922 e selvagem respectivamente (Fig. 2), em relação à quantidade disponível na forma livre (Fig. 1), os

valores encontrados nos demais tempos estudados corresponderam a formação do biofilme, e completaram quatro ciclos de desenvolvimento bacteriano distintos.

As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e selvagem, nas condições de adesão, apresentaram crescimento em todos os períodos avaliados com um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação à população inicial, confirmando que o tempo influencia no aumento populacional de células e na formação de um biofilme estável. Contudo, a cepa selvagem apresentou uma fase de adaptação mais longa do que a ATCC.

Na avaliação da cinética do crescimento bacteriano, representada nas figuras 1 e 2, optou-se pelo tempo de 32h de indução de adesão de biofilme, como controle, pois o mesmo apresentou a quantidade de células bacterianas suficientes que caracterizam um biofilme estabelecido, mas não grande o bastante para dificultar a contagem populacional, possibilitando uma resistência esperada aos antibióticos.

Teste de sensibilidade aos antibióticos em células planctônicas.

A condição de formação do biofilme confere resistência aos agentes antibacterianos. Embora essa resistência envolva uma variedade de mecanismos, observou-se que nos testes de suscetibilidade realizados a condição de adesão bacteriana ao dispositivo médico conferiu a *E. coli* em biofilme maior resistência aos antibióticos testados, quando comparada a mesma *E. coli* em estado planctônico.

Os resultados do teste de sensibilidade aos antibióticos pelo método de disco difusão, apresentados na tabela 1 demonstraram que a *E. coli* ATCC 25922 e a selvagem planctônicas, foram sensíveis a todos os antibióticos testados, de acordo com os padrões estabelecidos pela CLSI (2012).

De acordo com os dados da tabela 2 para o MIC, os antibióticos ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CLO), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET), testados para as

condições de células planctônicas, também demonstraram eficácia. A ciprofloxacina e gentamicina, apresentaram atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas, ao passo que o cloranfenicol e a tetraciclina, apresentaram MIC de 2 µg/mL e 0,25 µg/mL, respectivamente. Todos os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os valores de referência da CLSI (2012), resultando em sensibilidade das células bacterianas frente aos agentes testados. O mesmo resultado foi observado para a espécie ATCC 25922 e selvagem.

Teste de sensibilidade aos antibióticos na condição de biofilme.

Durante a avaliação do MIC de células em biofilme, visualmente, houve turbidez do meio em todas as concentrações, indicando um possível crescimento bacteriano e resistência aos agentes.

Contudo, para avaliar a presença de células viáveis e a eliminação de um possível resultado falso positivo, para a presença de resistência, a técnica de plaqueamento em incorporação em ágar foi utilizada, para a confirmação do crescimento bacteriano, ou para presença de resíduos de material celular provenientes da morte bacteriana pela ação do agente antimicrobiano, caracterizando a concentração bactericida mínima.

A cepa de *E. coli* ATCC 25922 exibiu maior número de células nas contagens, demonstrando menor resistência quando comparada com a selvagem, pois quando exposta ao antibiótico gentamicina (Fig. 3) apresentou inibição de crescimento em uma concentração menor do antibiótico. O crescimento foi inibido na concentração 2 µg/mL na ATCC e 8 µg/mL na selvagem, em relação ao biofilme controle de 32h, apresentando uma redução de população quando exposta as concentrações menores de antibióticos. De acordo com os dados apresentados na figura 3, para a cepa ATCC, houve o crescimento até a concentração de 1 µg/mL, indicando resistência, já que na condição planctônica a bactéria

foi sensível a todas as concentrações. A cepa selvagem, apresentou crescimento até a concentração de 4 µg/mL, tornando-se sensível a partir da concentração de 8 µg/mL, confirmando a maior resistência.

As duas cepas foram resistentes à tetraciclina e ao cloranfenicol (figura 4 e 5). Quando comparada a quantidade de células do biofilme controle, a ação do agente antimicrobiano levou a redução na população bacteriana, mas não a eliminação, mesmo nas maiores concentrações, sugerindo que o biofilme atua como proteção física impedindo a penetração dos antibióticos. Porém, na concentração de 2 µg/mL (Fig. 4), a cepa selvagem apresentou um crescimento maior que o biofilme controle de 32 horas, quando exposto a ação da tetraciclina. Este fato deve-se a possível resistência inerente à cepa, bem como, uma quantidade maior de população bacteriana presente na alíquota, em relação à quantidade de antibiótico contido na diluição.

A ciprofloxacina causou a eliminação total do biofilme para ambas as cepas de *E. coli*, como demonstrado na figura 6. Contudo, na análise visual foi possível observar a turbidez do meio indicativo de uma possível resistência bacteriana, porém ao avaliar, pela técnica de contagem padrão em placa, foi possível descartar a presença de células viáveis, sendo a fonte da turbidez do meio atribuída à presença de resíduos provenientes da morte celular e do desprendimento do biofilme da superfície da sonda vesical.

A condição de adesão a uma superfície pela bactéria confere resistência aos antimicrobianos, já quando testadas em condições de células planctônicas, as mesmas cepas não apresentaram resistência aos agentes (Tabela 2), ao passo que quando em condições de células aderidas, observou-se a presença do desenvolvimento bacteriano nas concentrações testadas, resultando na redução da população do biofilme (Fig. 3, 4 e 5).

DISCUSSÃO

O modo de vida em biofilme é uma estratégia de sobrevivência básica do desenvolvimento bacteriano, levando a graves infecções de difícil controle e erradicação, e com um considerável aumento na resistência aos antimicrobianos (23).

Estudos que visam à prevenção da formação do biofilme são realizados com compostos que inibem a adesão das bactérias. Segundo Kowalczyk et al (24), as sondas de látex siliconado tem apresentado 93,47% de biofilme estabelecido de *E. coli*, quando confirmado por um método qualitativo para a presença de biofilme. Neste estudo, a confirmação da adesão e da presença de biofilme estabelecido resultou do método quantitativo de contagem de células viáveis expressa em Log UFC/cm² de cupom de sonda de látex siliconado, confirmando a interação da bactéria com o material testado (24).

Segundo Tunney (25), nenhum material é eficaz na prevenção da adesão. Portanto, a dinâmica do desenvolvimento do biofilme se resume a característica do material a ser aderido, pois alguns materiais facilitam a adesão por causa das características físicas da superfície e a estrutura celular bacteriana, combinação que causa um impacto significativo no processo de fixação e adesão (26).

De acordo com Andrade (20) e Wirtaten (21), a diferenciação entre adesão e biofilme está na quantidade de células aderidas por cm². Valores acima de 5 Log UFC/cm² e 6 Log UFC/cm² são necessárias para a confirmação da formação do biofilme. Os resultados obtidos demonstraram uma interação do material com o micro-organismo, confirmando o processo de adesão do biofilme, pois ambas as cepas apresentaram crescimento satisfatório com quantidade de células suficientes, indicando a formação do biofilme. A cepa *E. coli* ATCC 25922 apresentou 5,8 Log UFC/cm² e Selvagem com 7,12 Log UFC/cm², indicando a adesão inicial nos cupons de prova no tempo 0h (zero hora), além da presença de população ativa e aumentada nos demais tempos avaliados.

A resistência aos antimicrobianos testados foi constatada com a instalação do biofilme. O rearranjo estrutural das bactérias na condição de adesão (13) caracterizou uma resistência (Fig. 3, 4 e 5). Agarwal (27), constatou que a concentração inibitória mínima para erradicação do biofilme de gentamicina e ciprofloxacina, foi quatro vezes mais elevada do que o MIC das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* nas condições de células planctônicas (27). Portanto, os agentes antimicrobianos são eficazes nas células planctônicas, ao passo que em biofilme essa resistência pode aumentar de 100 a 1000 vezes o MIC, causando dificuldades na erradicação e na resolução do processo infeccioso (4).

Os mecanismos responsáveis pela resistência dos biofilmes são um conjunto de fatores que as células planctônicas já expressavam mais as propriedades específicas que os biofilmes têm de aumentarem a tolerância aos agentes físicos e químicos, tais como a capacidade de impedir a penetração e a presença de estruturas que inativam a ação dos antimicrobianos, como ressaltados por Hoiby (4) e Smith (28). Esses podem ser responsáveis pela resistência constatada neste estudo, pois a resistência a antibiótico convencional, além de outros mecanismos não foi detectada quando as células nas condições planctônicas foram testadas.

Os antibióticos testados que demonstraram menor eficácia na eliminação do biofilme, foram o cloranfenicol e a tetraciclina, apresentando uma redução na população do biofilme, mas não a eliminação, quando comparada ao número controle de células sésseis, confirmando que a terapia antibiótica padrão só é efetiva nas células em suspensão. No caso do biofilme, elas são capazes de eliminar somente as células dispostas na superfície do biofilme, que se desprendem para a colonização de novos sítios, iniciando um novo ciclo, enquanto que as células sésseis continuam protegidas dentro do biofilme, podendo se propagar ao término da terapia. A mesma situação foi observada por Gomes (29), quando

os antibióticos testados, incluindo a gentamicina e tetraciclina, não demonstraram eficácia contra o biofilme já formado, mas apresentaram uma redução da população aderida (29).

Tal situação levanta a hipótese de que mesmo que tenha ocorrido uma redução no número de células, não houve atuação do antibiótico no interior do biofilme, pois nas camadas mais profundas do biofilme, a hipóxia é considerável (13).

Embora apresentando uma rápida adaptação às condições avaliadas, a cepa *E. coli* ATCC 25922, demonstrou também um aumento populacional gradativo e constante, nos tempos avaliados. Já a cepa *E. coli* selvagem testada, , apresentou menor número de população bacteriana, tanto na contagem de células planctônicas quanto aderidas em formação de biofilme. Entretanto, quando testadas com os antibióticos observou-se maior resistência. Klausen (30), avaliando *Pseudomonas aeruginosa* selvagem, relacionou que as estruturas morfológicas celulares são responsáveis pelos processos de fixação do biofilme em estágio avançado, devido à presença das estruturas como o pili tipo IV e o flagelo. Além das estruturas morfológicas, os processos de adesão sofrem a ação das forças de interação Van der Waals, bem como a presença de genes expressos em espécies selvagens. O flagelo também está presente na estrutura celular de *E. coli*, podendo ser um dos fatores da estabilização do biofilme em estágio avançado (30).

A disponibilidade de algumas estratégias para evitar as infecções causadas por biofilmes tem sido estudada. Ações que dificultem a ligação das bactérias ao material, utilizando antimicrobianos que revestem os dispositivos, proposto por Kowalczyk (14), tem se mostrado promissora, evitando o início da colonização do material pelo micro-organismo. Outra estratégia apresentada por Gomes (29), a utilização da combinação de terapia de antibiótico se mostrou mais eficaz na eliminação do biofilme quando comparado com o uso de um antimicrobiano isoladamente.

A análise da dinâmica de adesão e os mecanismos de resistência bacteriana, associados aos dispositivos médicos são necessários. Essas informações servirão de base para encontrar novas maneiras de erradicação ou interrupção da evolução dos biofilmes frente às infecções crônicas que acometem pacientes hospitalizados e acarretam danos a saúde individual e pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis*. 2008 Dec;12(6):526-30.
2. Storti A, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL. Detection of mixed microbial biofilms on central venous catheters removed from Intensive care Unit Patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005;36:275-80.
3. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001 Mar-Apr;7(2):277-81.
4. Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen PO, et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*. 2011 Apr;3(2):55-65.
5. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol*. 2008 Nov;5(11):598-608.
6. Fernandes MVL, Lacerda RB, Hallage NM. Construção e validação de indicadores de avaliação de práticas de controle e prevenção de infecção do trato urinário associada a cateter. *Acta Paulista de Enfermagem*. 2006;19(2):174-89.
7. Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HL, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):26-59.
8. Souza ACS, Tipple AFV, Barbosa JM, Pereira MS, Barreto RASS. Cateterismo urinário: conhecimento e adesão ao controle de infecções pelos profissionais de enfermagem. *Revista Eletrônica de Enfermagem [serial on the Internet]*. 2007; 9(3): Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n3/v9n3a12.htm>.
9. Souza Neto JLe, Oliveira FVd, Kobaz AK, Silva MNP, Lima AR, Maciel LC. Infecção do trato urinário relacionada com a utilização do cateter vesical de demora: resultados da bacteriúria e da microbiota estudadas. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2008;35:28-33.

10. Jahn P, Preuss M, Kernig A, Seifert-Huhmer A, Langer G. Types of indwelling urinary catheters for long-term bladder drainage in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3):CD004997.
11. Nicolle LE. The chronic indwelling catheter and urinary infection in long-term-care facility residents. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 May;22(5):316-21.
12. Rzeznik C, Camargo IC, Machado JC, Gerloff KR, Marques MRB, Heidtmann STMB. Protocolo: Prevenção da Infecção do Trato Urinário Relacionado ao Cateter Vesical. *Mom & Perspec Porto Alegre*. 2004 Jul/Dez 2004;17(2):22-5.
13. Aslam S. Effect of antibacterials on biofilms. *Am J Infect Control*. 2008 Dec;36(10):S175 e9-11.
14. Kowalczyk D, Ginalska G, Golus J. Characterization of the developed antimicrobial urological catheters. *Int J Pharm*. 2010 Dec 15;402(1-2):175-83.
15. Lee MY, Ko KS, Song J-H, Peck KR. In vitro effectiveness of the antibiotic lock technique (ALT) for the treatment of catheter-related infections by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007 October 1, 2007;60(4):782-7.
16. Brito DVD, Von Dolinger EJO, Machado FL, Abdallah VOS, Gontijo Filho PP. Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepsis relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos. *Arq ciênc saúde*. 2007 abr.-jun. 2007;14(2):80-4.
17. Locatelli CI, Englert GE, Kwitko S, Simonetti AB. Aderência bacteriana in vitro a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2004;67:241-8.
18. Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas GJ, Giaouris E. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Apr;78(8):2586-95.
19. Marques SC, Rezende JdGOS, Alves LAdF, Silva BC, Alves E, Abreu LRd, et al. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38:538-43.
20. Andrade NJ, 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*. 1998;v. 61(n. 7):p. 833-8.
21. Wirtanen G, Husmark, U., Mattila-Sandholm, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *Journal of Food Protection*. 1996;v.59(n.7):p.727-33.
22. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Informational Supplement. M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute. []. 2012 Jan. 2012;32(3).

23. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001 Jul 14;358(9276):135-8.
24. Kowalczyk D, Ginalska G, Piersiak T, Miazga-Karska M. Prevention of biofilm formation on urinary catheters: Comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Oct;100B(7):1874-82.
25. Tunney MM, Jones DS, Gorman SP. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. *Methods Enzymol*. 1999;310:558-66.
26. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001 Oct 15;33(8):1387-92.
27. Agarwal G, Kapil A, Kabra SK, Das BK, Dwivedi SN. In vitro efficacy of ciprofloxacin and gentamicin against a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *Natl Med J India*. 2005 Jul-Aug;18(4):184-6.
28. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*. [doi: DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.007]. 2005;57(10):1539-50.
29. Gomes F, Teixeira P, Ceri H, Oliveira R. Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Indian J Med Res*. 2012 Apr;135(4):542-7.
30. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol*. 2003 Jun;48(6):1511-24.

Lista de Figuras

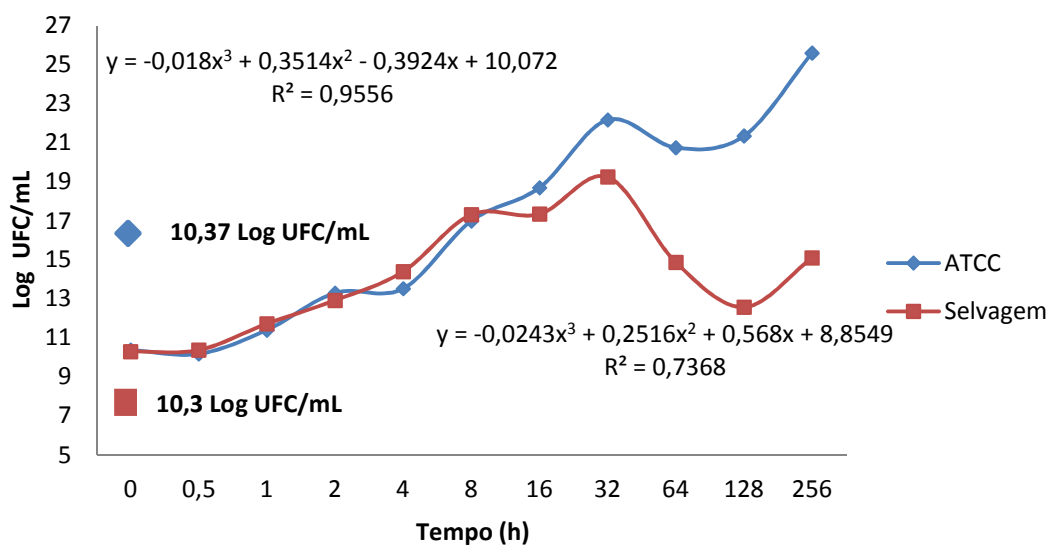


FIG 1. Cinética de Crescimento Bacteriano das células planctônicas em Log UFC/mL de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem em função do tempo.

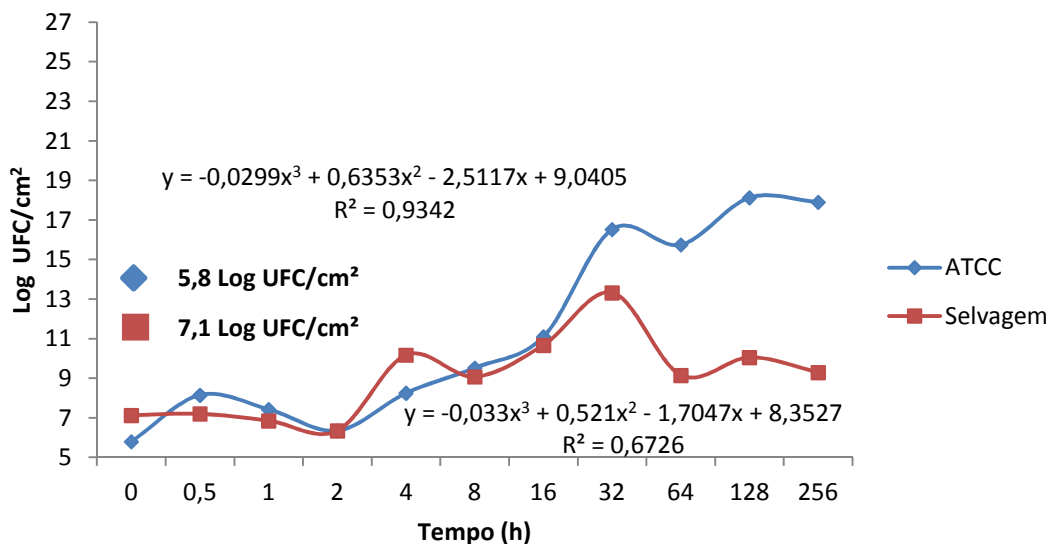


FIG 2. Cinética de Crescimento Bacteriano das células aderidas em Log UFC/ cm² de *E. coli* ATCC 25922 e Selvagem à superfície de sondas vesicais em função do tempo.

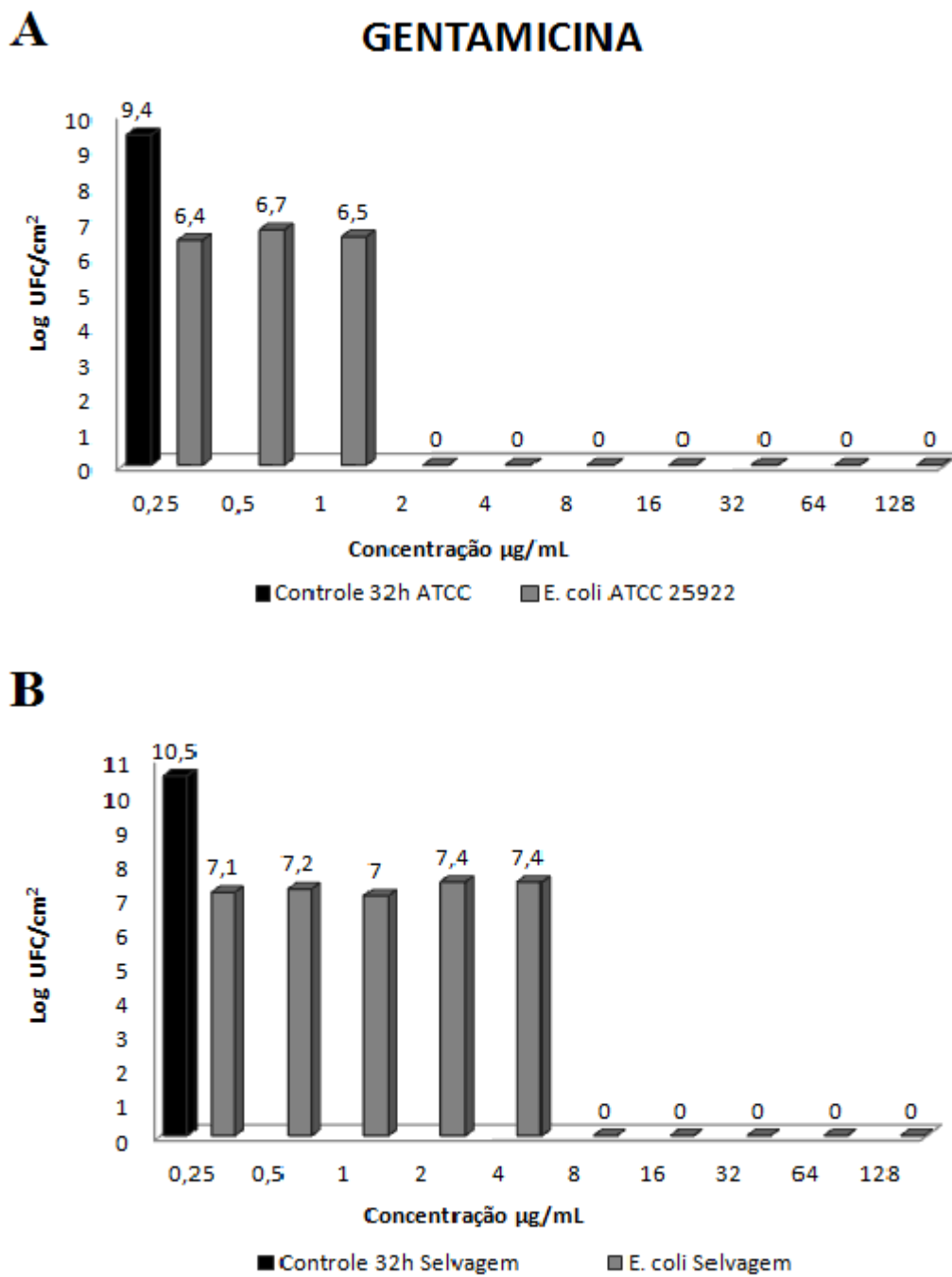


FIG 3. Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E. coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Gentamicina pelo método do MIC.

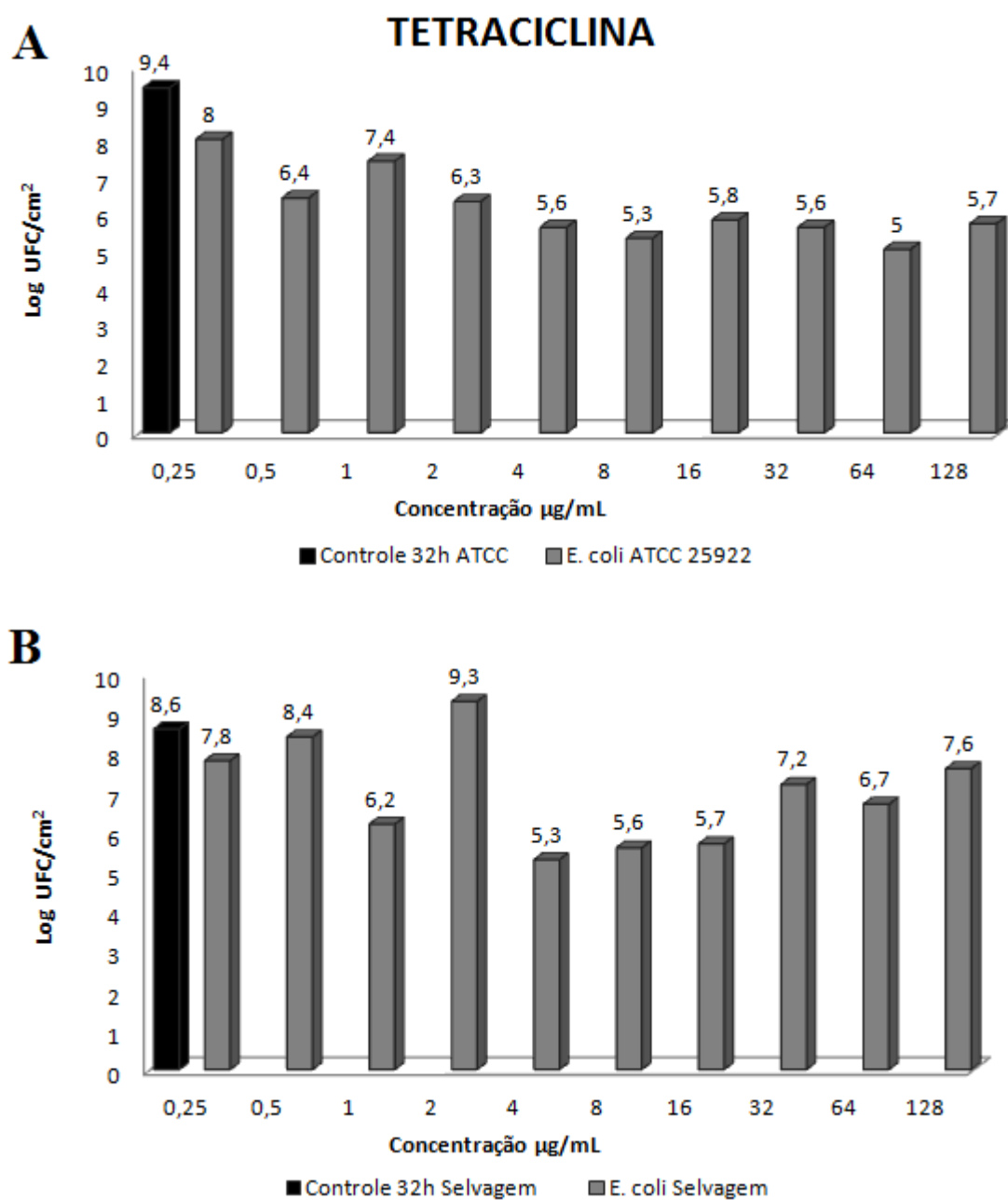


FIG 4. Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E.coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Tetraciclina pelo método do MIC.

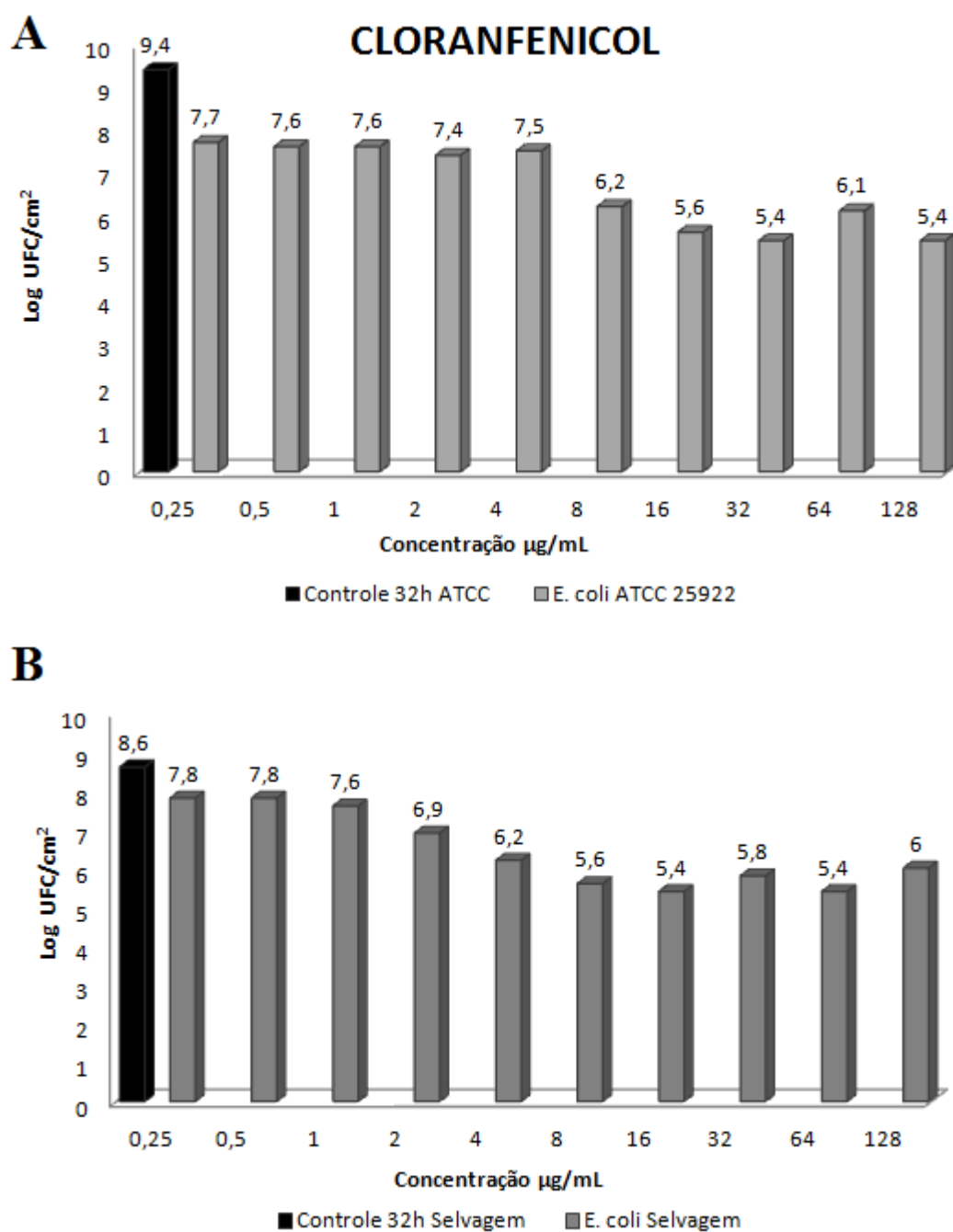


FIG 5. Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de (A) *E.coli* ATCC 25922 e (B) selvagem após a exposição ao antibiótico Cloranfenicol pelo método do MIC.

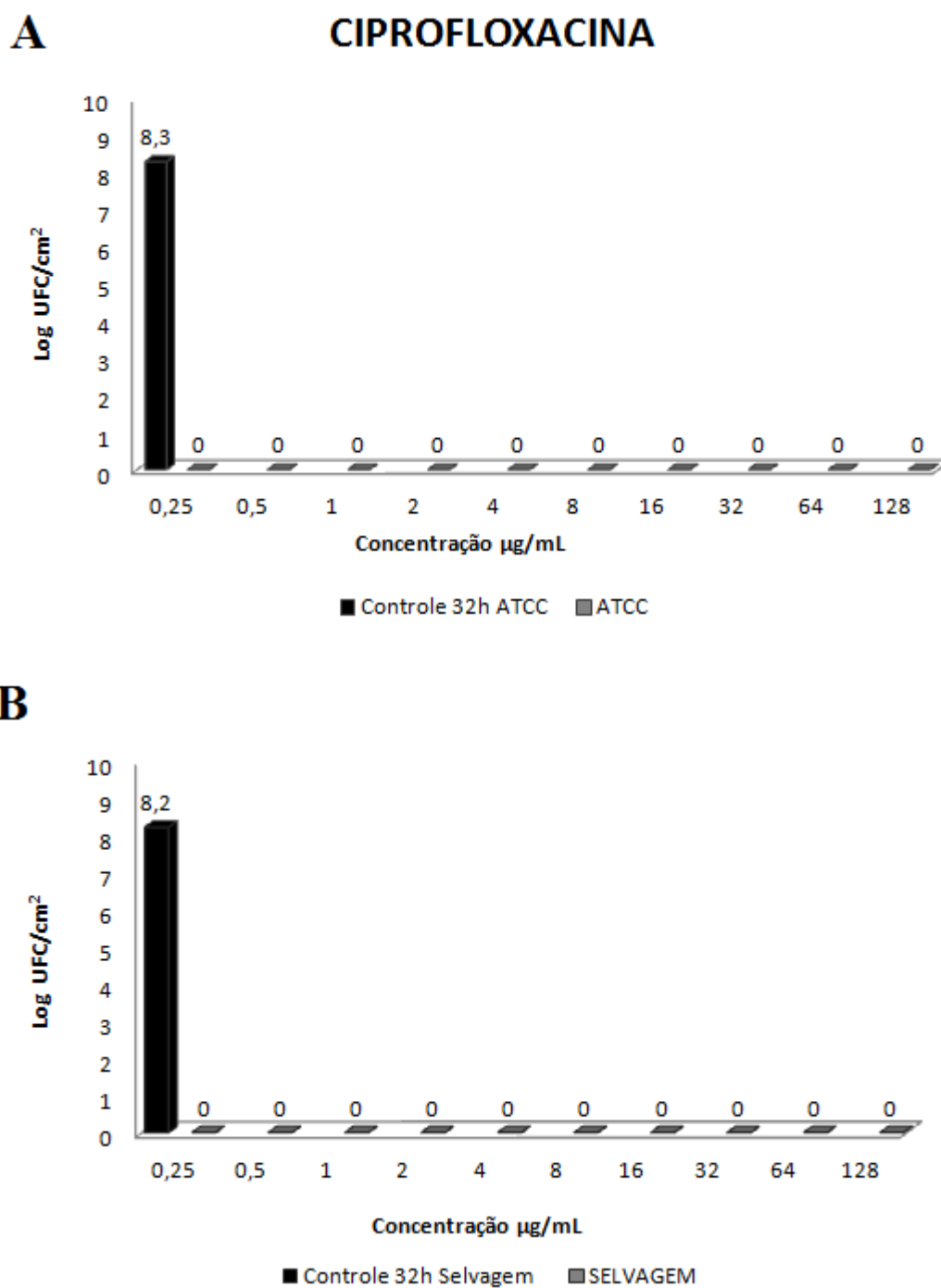


FIG 6. Contagem de células do biofilme em Log UFC/cm² comparadas à contagem inicial de biofilme no tempo de 32h de *E.coli* ATCC 25922 e selvagem após a exposição ao antibiótico Ciprofloxacina pelo método do MIC.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Perfil Antimicrobiano das cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e Selvagem pelo Método de Disco-Difusão.

Antibióticos	Halo de Inibição	Halo de Inibição	Interpretação
	(mm)	(mm)	
	Cepa Selvagem	<i>E. coli</i> ATCC 25922	
AMP (10µg)	22	24	S
AMO (30µg)	22	20	S
AMI (30µg)	22	24	S
CEF(30µg)	22	24	S
CIP (5µg)	34	32	S
CLO (30µg)	32	30	S
GEN (10µg)	20	20	S
IMI (10µg)	30	30	S
NOR (10µg)	34	34	S
NIT (300µg)	26	20	S
OFLO (5µg)	34	32	S
TET (30µg)	26	30	S
SXT (25µg)	28	24	S

AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina-Ác. Clavulônico; AMI: Amicacina; CFC: Cefaclor; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; IMI: Imipinem; NOR: Norfloxacina; NIT: Nitrofurantoina; OFX: Ofloxacina; TET: Tetraciclina; SUT: Sulfametoxazol-Trimetropim. S: Resultado de Sensibilidade ao Antibiótico.

Tabela 2. Perfil Antimicrobiano da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da *Escherichia coli* ATCC 25922 e Selvagem planctônica.

Antibiótico	Células Planctônicas			
	Selvagem		ATCC 25922	
	MIC (µg/mL)	Resultado	MIC (µg/mL)	Resultado
	-----	S	-----	S
CLO	2	S	2	S
GEN	-----	S	-----	S
TET	0,25	S	0,25	S

S: Resultado visual para sensibilidade ao antibiótico de acordo com os valores de referência da CLSI 2012.