

FORMAÇÃO DE BIOFILME MICROBIANO EM CATETER DE LÁTEX SILICONIZADO

G. S. Bettio¹, A. C. Pizzolitto², E. L. Pizzolitto^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC - USP, São Carlos, Brasil

²Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus de Araraquara, Brasil

E-mail: gbettio@sc.usp.br

Abstract: Catheter-associated urinary tract infection is the most common nosocomial infection and can be associated with adherent microorganisms. The aim of the present research was to study the attachment and biofilm formation of *E. faecalis* and *C. albicans* onto a Foley catheter. Microbial suspensions containing segments of catheter were incubated at 37°C under constant agitation during 24, 48 and 120 hours. The samples were used for the count of viable cells and for SEM. The colonies formation units were quantified. For statistical analysis the ANOVA test was used. There were not statistically significant differences between the means of cells quantification ($p > 0.05$).

Key Words: Foley Catheter, Biofilm, Adherence.

Introdução

O cateter urinário é o dispositivo médico mais comumente utilizado em pacientes hospitalizados. O risco de infecção associada ao cateter é maior quando o período de cateterização ultrapassa quatro semanas, permitindo o estabelecimento de comunidades de microrganismos e formação de biofilme, porque bactérias do meio externo podem atingir e infectar a bexiga [1, 2].

Há evidências que a natureza química do material a partir do qual o cateter é manufaturado desempenha um importante papel na patogenicidade de infecções relacionadas ao dispositivo [3, 4]. Os cateteres urinários são fabricados principalmente de silicone ou látex e revestidos de silicone ou hidrogel [5].

O biofilme é uma comunidade microbiana caracterizada por células que estão irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface e embebidas em uma matrix extracelular de substâncias poliméricas que as próprias células produzem e exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes [1]. Os microrganismos que aderem ao cateter e desenvolvem o biofilme podem originar-se de vários sítios e ganhar o acesso à bexiga de pacientes cateterizados através de duas vias: extraluminal e intraluminal. A contaminação extraluminal pode ocorrer em um período de tempo mais curto, por meio de inoculação direta quando o cateter é inserido, ou quando os microrganismos ganham a entrada pela superfície externa do cateter. Os microrganismos ascendem pelo períneo por ação de capilaridade usando o filme mucoso fino contínuo à

superfície externa do cateter. A contaminação intraluminal ocorre através de refluxo de microrganismos que ganham acesso ao lúmen do cateter quando ocorre falha no fechamento do sistema de drenagem ou por contaminação de urina da bolsa coletora [6, 1].

Este trabalho teve por objetivo estudar a aderência de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* sobre cateter de Foley por métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Materiais e Métodos

Microrganismos – *Enterococcus faecalis* (cepa de campo); *Candida albicans* (cepa ATCC – nº 18804).

Material – Sonda de Foley 2 vias – Free-Bac®, látex siliconizado, tamanho 14 – 30mL/cc, lote nº 20040403, adquirida no comércio.

Método

Preparo das Suspensões Microbianas – Foram preparadas individualmente suspensões microbianas de *E. faecalis* e *C. albicans* da ordem de 10^9 UFC.

Teste de Aderência à Sonda de Foley [7, 8] – Uma alíquota de 200µL de cada suspensão microbiana foi transferida individualmente para tubos cônicos (tipo Falcon) contendo 15mL de caldo Mueller-Hinton. O cateter urinário foi seccionado em segmentos de 1,0cm de comprimento sob condições de esterilidade. As amostras foram introduzidas nos tubos cônicos e incubadas a 37°C sob agitação constante de 100rpm em agitador orbital por 24, 48 e 120 horas. Após este período, as amostras foram removidas dos tubos, lavadas em solução salina tamponada para a remoção dos microrganismos não-aderentes e transferidas para tubos de vidro contendo 5mL de salina fisiológica. Os tubos foram sonicados em banho ultra-sônico durante 8 minutos a 40Khz e homogeneizados em vortex. O experimento foi realizado em triplicata.

Contagem de Células Viáveis pelo Método do Espalhamento [9] – Realizou-se uma diluição seriada (até 10^5) da solução sonicada. Foram semeados 100µL de cada diluição em placas de Petri contendo ágar Tryptic Soy (TSA) pelo método de espalhamento.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. Efetuou-se a contagem das unidades formadoras de colônia. Para validade estatística, estimou-se o número de colônias das placas que apresentavam entre 30 e 300 colônias.

Preparação das Amostras para Análise por Meio de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) [7, 10, 11, 12] – As amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M com pH 7,1 por 15 minutos, submetidas à desidratação em séries de álcoois e secas em centrífuga a vácuo com baixa velocidade por 5 minutos, a temperatura de 40°C e pressão negativa de 100mbar. Os segmentos foram submetidos à metalização da superfície com ouro e observados em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSTM-T330A).

Análise Estatística – Para avaliação estatística dos dados obtidos com a quantificação do número de células viáveis, após remoção de biofilme foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

Resultados

As médias da quantificação de células viáveis de *E. faecalis* e *C. albicans* após remoção de biofilme de 24, 48 e 120 horas estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Contagem de células viáveis do biofilme de *E. faecalis* removido de sonda de Foley após 24, 48 e 120 horas de contato.

Biomaterial	UFC/cm ² (média ± desvio padrão)		
	24 horas	48 horas	120 horas
Látex siliconizado	14,8±8,9x10 ⁴	18,0±18,9x10 ⁴	2,5±2,2x10 ⁴

Tabela 2: Contagem de células viáveis do biofilme de *C. albicans* removido de sonda de Foley após 24, 48 e 120 horas de contato.

Biomaterial	UFC/cm ² (média ± desvio padrão)		
	24 horas	48 horas	120 horas
Látex siliconizado	4,1±1,3x10 ⁴	4,8±2,3x10 ⁴	13,3±12,4x10 ⁴

Para $p < 0,05\%$ a contagem de células viáveis do biofilme de *E. faecalis* e *C. albicans* não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os microrganismos nos tempos estudados.

Os resultados das eletromicrografias de varredura das características morfológicas dos biofilmes de *E. faecalis* e *C. albicans* formados sobre a superfície do látex siliconizado estão apresentados na Figura 1.

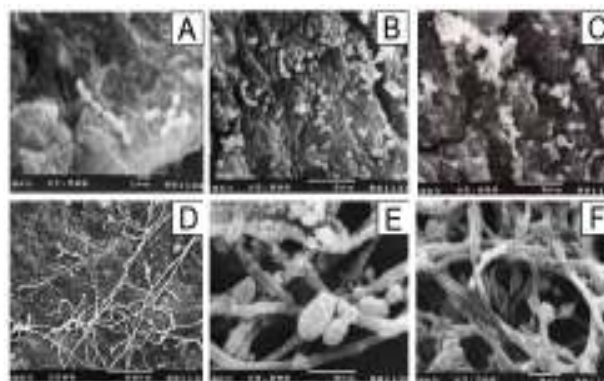


Figura 1: Imagens A, B, C da superfície do látex siliconizado mostrando, por meio de microscopia eletrônica de varredura, células de *E. faecalis* aderidas formando biofilme de 24, 48 e 120 horas, respectivamente. Imagens D, E, F da superfície do látex siliconizado mostrando, por meio de microscopia eletrônica de varredura, células de *C. albicans* aderidas formando biofilme de 24, 48 e 120 horas, respectivamente. (Microscópio eletrônico de varredura, JEOL-JSM, modelo T330A).

Discussão

A habilidade de formar biofilme em dispositivos médicos é um potencial fator de virulência que pode levar os enterococos a causar infecções em pacientes com estes dispositivos [13].

Estudos de [8] da aderência *in vitro* de *E. faecalis* ao cateter urinário de látex siliconizado mostraram que a aderência bacteriana ocorre muito rapidamente, atingindo picos máximos após 20 – 24 horas de incubação ($18,9 \pm 9,8 \times 10^5$ UFC/cm²).

No presente trabalho, em 24 horas de incubação já se observou a presença de células aderidas ao corpo-de-prova ($14,8 \pm 8,9 \times 10^4$ UFC/cm²) usando a microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostram as imagens A, B e C na Figura 1.

O pico máximo de aderência foi alcançado após 48 horas de incubação ($18,0 \pm 16,9 \times 10^4$ UFC/cm²), declinando em 120 horas ($2,3 \pm 2,2 \times 10^4$ UFC/cm²).

As taxas de colonização do cateter urinário associado à *Candida* sp. ultrapassam 30% [14, 15]. *Candida* sp. é o patógeno mais frequentemente isolado de amostras de urina de pacientes em unidades de tratamento intensivo cirúrgico [16].

Um estudo realizado por [4] demonstrou a aderência de *C. albicans* ao látex ($27,2 \times 10^2$ UFC/mL) após 1 hora de incubação sob agitação contínua.

Na presente pesquisa, a média dos resultados da quantificação de células viáveis do biofilme demonstrou a aderência de *C. albicans* ao látex siliconizado após 24, 48 e 120 horas de incubação sob agitação contínua (média corresponde a $7,3 \times 10^4$ UFC/cm²).

Conclusão

A formação de biofilme foi demonstrada por métodos microbiológicos e microscopia eletrônica de varredura nas condições estudadas.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias da quantificação de células viáveis de *E. faecalis* e *C. albicans*, portanto pode-se concluir que, apesar de serem microrganismos diferentes, a dinâmica de formação do biofilme microbiano ocorre de maneira semelhante para ambos nos tempos estudados.

Devido à emergência de *E. faecalis* e *C. albicans* como agentes de infecções nosocomiais, a sua patogenicidade e ao aumento da resistência aos agentes antimicrobianos ou antifúngicos, dificultando a erradicação da infecção, os estudos sobre a aderência desses microrganismos ao cateter urinário devem continuar.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Microbiologia da Coordenadoria de Análises Clínicas e Hemoterapia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Araraquara e ao Departamento Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – USP, Campus de São Carlos.

Referências

- [1] Donlan, R. M.; Costerton, J. W. (2002) “Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms” *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 167-193.
- [2] Darouiche, R. O. (2002) “Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence” *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, p. 1567–1572.
- [3] Hawser, S. P.; Douglas, L. J. (1994) “Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro” *Infect. Immun.*, v. 62, p. 915–921.
- [4] Tamura, N. K.; Gasparetto, A.; Svidzinski, T. I. E. (2003) “Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters” *Mycopathologia*, v. 156, p. 269–272.
- [5] Stickler, D.; Young, R.; Jones, G.; et al. (2003) “Why are Foley catheters so vulnerable to encrustation and blockage by crystalline bacterial biofilm?” *Urol. Res.*, v. 31, p. 306–311.
- [6] Tambyah, P. A.; Halvorson, K.; Maki, D. G. (1999) “A prospective study of the pathogenesis of catheter-associated urinary tract infection” *Mayo Clin. Proc.*, v. 74, p. 131-136.
- [7] Pizzolitto, E. L. (1997), *Contribuição ao estudo in vitro da corrosão induzida por microrganismos sobre liga metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – Modelo experimental com as cepas cariogênicas Streptococcus mutans e Streptococcus sobrinus*, Tese de Doutorado, Departamento de Biotecnologia. IQ/UNESP, Araraquara, 117p.
- [8] Joyanes, P.; Pascual, A.; Martinez-Martinez, L.; Hevia, A.; Perea, E. J. (2000) “In Vitro Adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to Urinary Catheters” *Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.*, v. 19, p. 124-127.
- [9] Brock, T. D.; Madigan, M. T. (1991), *Biology of microorganisms*, USA: Prentice Hall Internacional Editions.
- [10] Sabatini, D. D.; Bensch, K.; Barnett, R. J. (1963) “Cytochemistry and electron microscopy” *J. Cell Biol.*, v. 17, p. 19-58.
- [11] Santos, J. M. (1992) “Microscopia eletrônica de varredura aplicada às Ciências Biológicas” Jabcicabal: FUNEP/CAVJ/UNESP, 27p. (Apostila).
- [12] Videla, H. A.; Vieira, M. R.; Guiamet, P. S.; Mele, M. F. L.; Alais, J. C. S. (1995) “Biocidal activity of dissolved ozone on sessile and planktonic bacteria: effects on the corrosion behavior of cooling water systems structural materials” *Nace International*, p. 62/1-62/12.
- [13] Sandoc, J. A. T.; Witherden, I. R.; Cove, J. H.; Heritage, J.; Wilcox, M. H. (2003) “Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*” *J. Med. Microbiol.*, v. 52, p. 547-550.
- [14] Kojic, E.; Darouiche, R. O. (2004) “*Candida* infections of medical devices” v. 17, p. 255–267.
- [15] Pierce, G. E. (2005) “*Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, and device-related nosocomial infections: implications, trends, and potential approaches for control” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 32, p. 309-318.
- [16] Lundstrom, T.; Sobel, J. (2001) “Nosocomial candiduria: a review” *Clin. Infect. Dis.*, v. 32, p. 1602–1607.