

Recebido em 02/2018. Aceito para publicação em 06/2018.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE BIOFILME DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, IN VITRO, EM LÚMEN DE CATETERES DE POLIURETANO

EVALUATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILM GROWTH, IN VITRO, IN THE LUMEN OF POLYURETHANE CATHETERS.

Amanda Cristina de Oliveira¹

Rayra Reithiele do Nascimento Ribeiro da Cruz²

Camilla Abud de Carvalho³

Anelise Cristina Ozório Cesar Dória⁴

Jhonatan S. Brandão de Lima⁵

Rodrigo Savio Pessoa⁶

Sonia Khouri⁷

Resumo: Os Cateteres Venosos Centrais (CVC's) são os dispositivos hospitalares que podem desenvolver biofilme bacteriano em sua superfície e na região intraluminal, horas após a sua instalação, devido às infecções que podem ser acometidas pelo cateter, sendo necessário o tratamento endoluminal do dispositivo por meio de métodos antimicrobianos eficazes. O estudo teve como objetivo induzir, "in vitro", a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922), utilizando um sistema que simulasse a circulação sanguínea e avaliar o efeito do plasma no tratamento do biofilme. Na metodologia foi utilizado um inóculo bacteriano, em caldo TSB, que permaneceu circulando em cateteres de poliuretano, ligados a uma bomba peristáltica, durante 24 h. O material de poliuretano é retirado do sistema, fragmentado e tratado com plasma de 6 L/min de argônio e 4 L/min de ar nos tempos: 150, 300 e 600 segundos. Após tratamento, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias e análise morfológica da superfície do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura. Após a incubação e leitura, observou-se redução de UFC/mL, de 99%, 99% e 100%, nos tempos de 150, 300 e 600 segundos, respectivamente. Conclui-se, portanto, que o tratamento à plasma provocou efeitos bacteriostático e bactericida sob o microrganismo estudado.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; cateter de poliuretano; biofilme; plasma elétrico.

Abstract: Central venous catheters (CVCs) are the hospital devices that can develop bacterial biofilm on their surface and in the intraluminal region, hours after their installation, due to the infections that can be transmitted by the catheter, being necessary the endoluminal treatment of the device by means of efficient antimicrobial methods. The aim of the study was to induce *in vitro* the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) using a system that simulates blood circulation and to evaluate the effect of plasma in the treatment of the biofilm. In the methodology, a bacterial inoculum was used in TSB broth, which

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: amandacristina756@hotmail.com.

² Especialista Multiprofissional em Nefrologia, Centro de hemodialise em Pedreiras-MA, Brasil. E-mail: reithielecx@hotmail.com.

³ Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: camilla_abud@hotmail.com.

⁴ Mestre em Engenharia Biomédica, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: ane.doria@gmail.com.

⁵ Graduado em Engenharia Aeronáutica e Espaço, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: jhonatan_lma@hotmail.com.

⁶ Doutor em Ciências na área de Física de Plasmas, Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: rodrigospessoa@gmail.com.

⁷ Professora Titular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Paraíba, Brasil. E-mail: soniak@univap.br.

remained circulating in polyurethane catheters connected to a peristaltic pump for 24 h. The polyurethane material is removed from the system, fragmented and treated with plasma of 6 L/min of argon and 4 L/min of air at the times: 150, 300 and 600 seconds. After treatment, the counting of the Colony Forming Units and morphological analysis of the biofilm surface were performed by Scanning Electron Microscopy. After incubation and reading, a reduction of CFU / mL of 99%, 99% and 100% was observed in the times of 150, 300 and 600 seconds, respectively. It is concluded, therefore, that the plasma treatment provoked bacteriostatic and bactericidal effects on the microorganism studied.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; polyurethane catheter; biofilm; electric plasma.

1. INTRODUÇÃO

Em procedimentos hospitalares, os dispositivos médicos são muito utilizados para o cuidado da saúde; porém, também estão relacionados com constantes infecções bacterianas e possível desenvolvimento de biofilme microbiano, tanto na superfície quanto no interior desses equipamentos. (HOGAN et al., 2016; SHAH et al., 2013).

Cateteres Venosos Centrais (CVC's) são um dos dispositivos utilizados em procedimentos clínicos, podendo ser empregados na administração de medicamentos e substâncias nutritivas, via parenteral. A estrutura que compõe esses materiais deve possuir uma rigidez moderada, seguida de uma flexibilidade, além de haver uma resistência para evitar dobras e algum tipo de ruptura, para que, no decorrer da terapia, a substância que trafega no interior do cateter esteja livre de qualquer bloqueio no transporte interno. Dispositivos contendo partículas de politetrafluoretileno (PTFE), o povidone, e o poliuretano, em sua composição, são os mais encontrados, sendo este último o substrato que está contido em dispositivos como o Cateter Venoso Central. (HEILMAN, 2015).

Apesar da grande influência nos procedimentos clínicos, CVC's são alvos constantes de Infecções de Corrente Sanguínea Relacionadas ao Cateter (ICSRC), que podem ser desenvolvidas por erros de inserção do dispositivo intravenoso ou falha na antisepsia local, motivos pelos quais, um indivíduo em estado clínico crítico é exposto a ocorrências de complicações mais graves, como sepse. (HEILMAN, 2015).

Nas Infecções de Corrente Sanguínea Relacionadas ao Cateter, um fator relevante, que pode agravar esse quadro, é a antisepsia realizada pelo profissional na área de inserção do cateter. Problemas na antisepsia local fazem com que haja colonização de bactérias no cubo dos dispositivos, ocasionando uma contaminação intraluminal de microorganismos oportunistas. (SHAH et al., 2013).

O estado imunológico do paciente, a composição do material do cateter e os procedimentos realizados para a inserção do dispositivo, são também fatores que colaboram para o início de infecções.

Ao longo dos anos, o estudo sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* tem se tornado essencial para a medicina, em razão da sua resistência aos tratamentos, ocasionando aumentos significativos na morbidade de pacientes. *Staphylococcus*

aureus são bactérias gram positivas produtoras de coagulase, imóveis e não esporuladas, que possuem caráter comensal. A maioria dessas espécies são aeróbias ou anaeróbias facultativas, com afinidade para multiplicação favorável em ambientes a 37°C (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011). É, também, descrita como responsável pelo alto índice de virulência, pois embora faça parte da microbiota da pele humana, trata-se de uma bactéria causadora de infecções superficiais ou também invasivas, quando em contato com a corrente sanguínea, desenvolvendo uma dispersão hematogênica.

Devido ao seu alto índice de disseminação em ambientes hospitalares, existe também a possibilidade de desenvolvimento de complicações, como a bacteremia, a endocardite infecciosa e outras infecções relacionadas ao uso de cateteres intravasculares ou vesicais. Aproximadamente 30% da população sofre por colonização de *S. aureus*. Além dessas características, essa espécie de microrganismo é formadora de biofilme. (FOSTER et al., 2014; TONG et al., 2015).

O termo “biofilme” faz referência a conglomerações de bactérias integradas a uma matriz polimérica, composta, principalmente, por exopolissacarídeos formados por filamentos proteicos e material extracelular dos próprios microrganismos, além de componentes sanguíneos advindos do hospedeiro, que facilitam a adesão microbiana e dificultam a sua remoção por substâncias antimicrobianas. Biofilmes podem estar presentes tanto em superfícies naturais (como a pele) quanto artificiais (como dispositivos hospitalares); no entanto, para que ocorra a adesão de microrganismos e posterior formação de biofilme em uma superfície, é necessário que haja uma interação iônica entre a bactéria e o substrato do dispositivo em questão, na qual as cargas negativas do material atraem as bactérias ao seu contato. (HØIBY et al., 2015; PESSOA et al., 2017; RICHARDS et al., 2014).

O tempo para formação de biofilme bacteriano em superfície de cateteres varia conforme a associação do microrganismo com o material do dispositivo. As espécies bacterianas formadoras de biofilmes mais associadas com infecções de cateter são: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. O desenvolvimento de biofilme bacteriano tem algumas peculiaridades, conforme a diferença de metabolismo de cada microrganismo, mas, em geral, são divididos em três estágios principais: adesão, colonização e maturação. A espécie de *Staphylococcus aureus*, por sua vez, foi estudada mais profundamente quanto à sua formação de biofilme e verificou-se a presença de cinco estágios: adesão, multiplicação, êxodo, maturação e dispersão (MOORMEIER; BAYLES, 2017; OLIVEIRA, 2017).

Com a finalidade de descontaminação de bactérias e biofilmes em dispositivos hospitalares, estes são submetidos à esterilização antes de seu uso. Em cateteres, é utilizado o óxido de etileno, um gás inflamável de poder carcinogênico e explosivo. O tempo de exposição dos materiais ao gás tem uma duração aproximada de 5 horas. (TRINDADE et al., 2008). Em busca de uma nova alternativa para esterilizações desses dispositivos, a medicina tem estudado o plasma atmosférico não térmico, que tem sido

empregado em várias áreas da saúde, podendo, assim, gerar melhorias para o controle de infecções.

A tecnologia do plasma atmosférico vem sendo utilizada para fins medicinais, sendo aplicada visando à melhoria da qualidade e da biocompatibilidade de implantes. O plasma tem sido considerado promissor nessa tarefa, pois combina a redução de microrganismos patogênicos com a utilização de um agente não cancerígeno (gás nobre) como esterilizante (VON WOEDTKE; METELMANN; WELTMANN, 2014). O estudo tem por finalidade avaliar a ação do plasma no controle de biofilme de *Staphylococcus aureus*, induzido *in vitro*, por meio de um sistema que simule a circulação sanguínea.

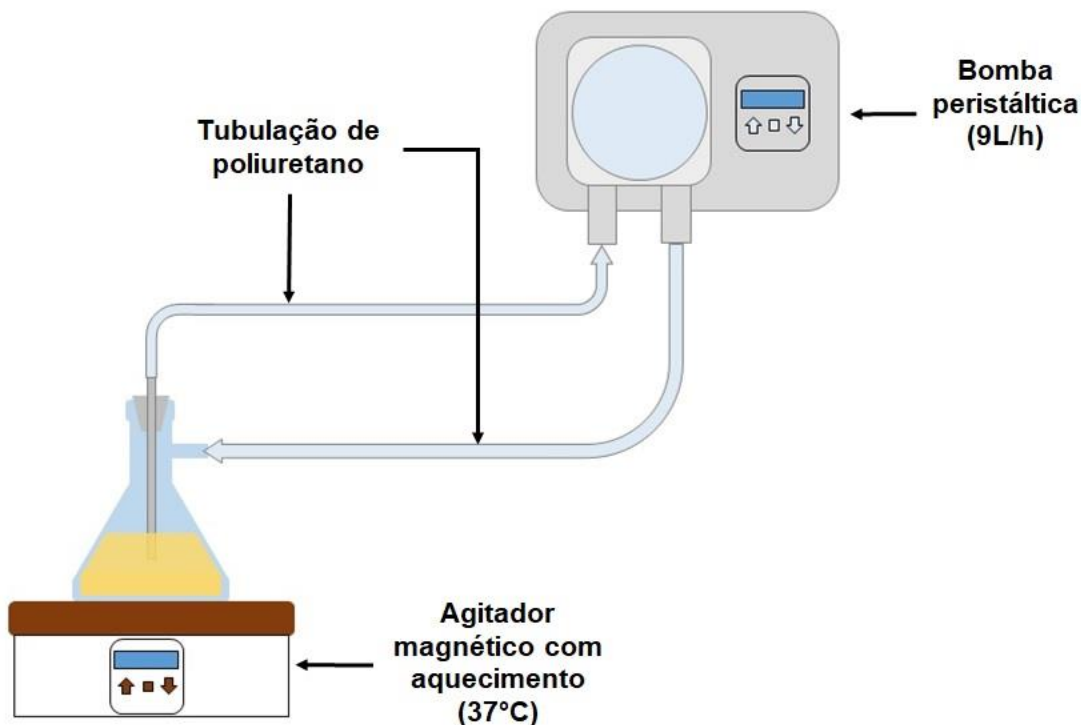
2. METODOLOGIA

Para a padronização da formação de biofilme em cateter de poliuretano e aplicação do plasma elétrico, foi utilizada a cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 de *Staphylococcus aureus*, e preparado o inóculo bacteriano, de acordo com a escala 0,5 de Mac Farland. A cultura bacteriana foi dissolvida em 300 ml de caldo TBS (*Tryptic Soy Broth*). Esse inóculo foi colocado em um kitassato ligado a uma bomba peristáltica por duas tubulações de poliuretano (13 cm cada), com o intuito de simular a circulação sanguínea. O frasco contendo o inóculo foi posicionado sobre um agitador magnético e aquecedor de moléculas, para que permanecesse em agitação constante (1.500 rpm) e aquecido a 37 °C.

Preparo do Sistema de Bomba Peristáltica: O aparelho possui um orifício de entrada e outro de saída, nos quais foram conectadas as tubulações de poliuretano, fazendo a ligação com os orifícios do kitassato, localizados na sua parte superior e lateral. Feito isso, a bomba peristáltica foi ligada numa vazão de 6,5 L/h. O sistema permaneceu em funcionamento durante 24 horas. Após esse período, o sistema foi desligado e removidas as tubulações, em condições de esterilidade, para, posteriormente, serem depositados em uma placa de Petri. No fluxo laminar, os tubos foram lavados com solução fisiológica 0,9% para a remoção de células não aderidas, e fragmentados em 12 segmentos de 1 cm cada, para tratamento, conforme figura 1.

As amostras foram divididas em grupos: Controle negativo (salina, tubulação e meios de cultura), controle positivo (tubulação contaminada com biofilme e sem tratamento), e grupos tratados, variando entre 150, 300 e 600 segundos, com plasma de Argônio e Ar Comprimido.

Figura 1 - Esquema da montagem experimental.



Fonte: Os autores.

As amostras de controle positivo foram introduzidas em tubos Falcon, contendo 10 mL de salina e agitadas em vórtex, durante 120 segundos, para desprendimento do biofilme, extraindo 100 µL de cada amostra para semeadura em placas com meio TSA (*Trypticase Soy Ágar* – DIFCO).

As amostras de cateteres citadas foram expostas ao plasma gerado em um reator do tipo arco deslizante, configurado nas condições a seguir: Fluxo de gás Argônio e Ar Comprimido na razão 6/4 (L/min), com tensão aproximada de 2,4 kV, potência de 28 W, frequência de 60 Hz e altura do plasma em relação à amostra de 3,0 cm nos diferentes tempos de exposição. Após o tratamento, as amostras passaram pela etapa de desprendimento do biofilme, já descrita anteriormente. As placas de cultura foram colocadas em estufa a 37 °C, durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada análise quantitativa para avaliar o percentual de redução de unidades formadoras de colônias (UFC's), utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de redução de UFC/mL} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de colônias inicial} - \text{N}^\circ \text{ de colônias final}) \times 100}{(\text{N}^\circ \text{ de colônias inicial})}$$

Um fragmento do substrato, de cada grupo, foi utilizado para análise qualitativa em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), da marca HITASHI, modelo TM 3000. Essas amostras foram secas em temperatura ambiente e metalizadas com ouro (Au),

uma vez que o poliuretano não é condutor elétrico, sendo essa uma característica necessária para observação por intermédio do MEV.

Figura 2 - Etapas das amostras para realização da microscopia eletrônica de varredura e do aparelho utilizado.

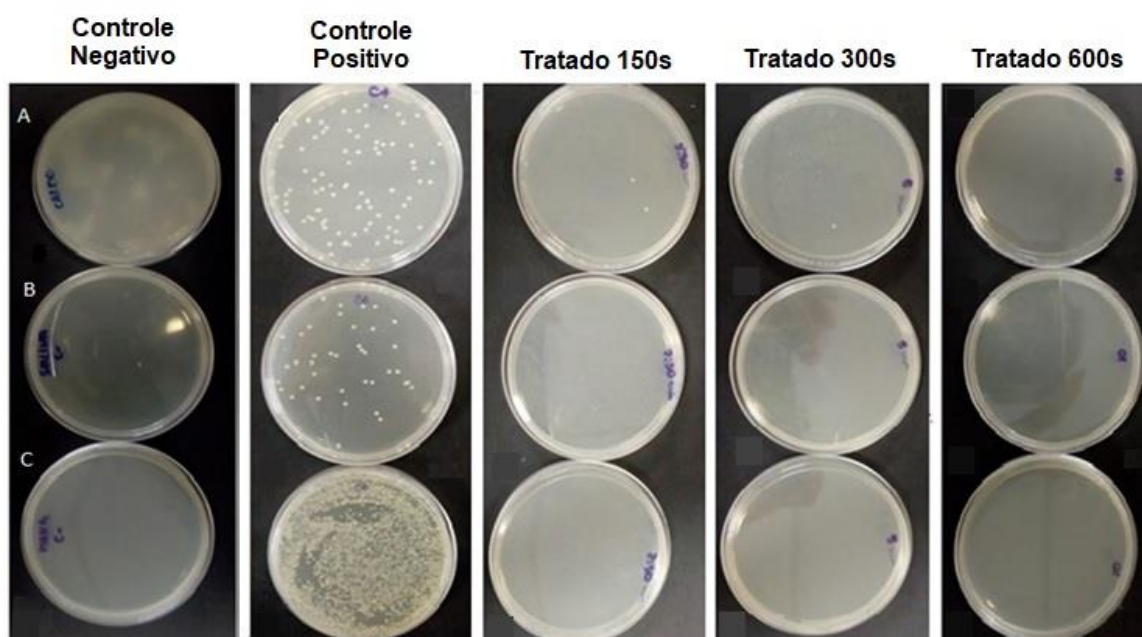


Fonte: Os autores.

2. RESULTADOS

A figura 3 mostra imagens das placas de meio de cultura, após 24 horas de incubação a 37 ° C.

Figura 3 - Placas de cultura de *S. aureus* em ágar TSA após incubação.



A - Controle Negativo (tubo sem biofilme); B - Salina utilizada; C - Caldo BHI puro, sem contaminação por *S. aureus*; Controle Positivo e os grupos tratados com 150, 300 e 600 segundos, respectivamente.

Fonte: Os autores.

É possível observar que, nos grupos tratados, a redução da contagem de UFC/mL foi de quase 100% para todos os tempos, enquanto no grupo controle, houve um crescimento substancial (acima de 100.000 colônias). A tabela 1 mostra o percentual de redução após os tratamentos.

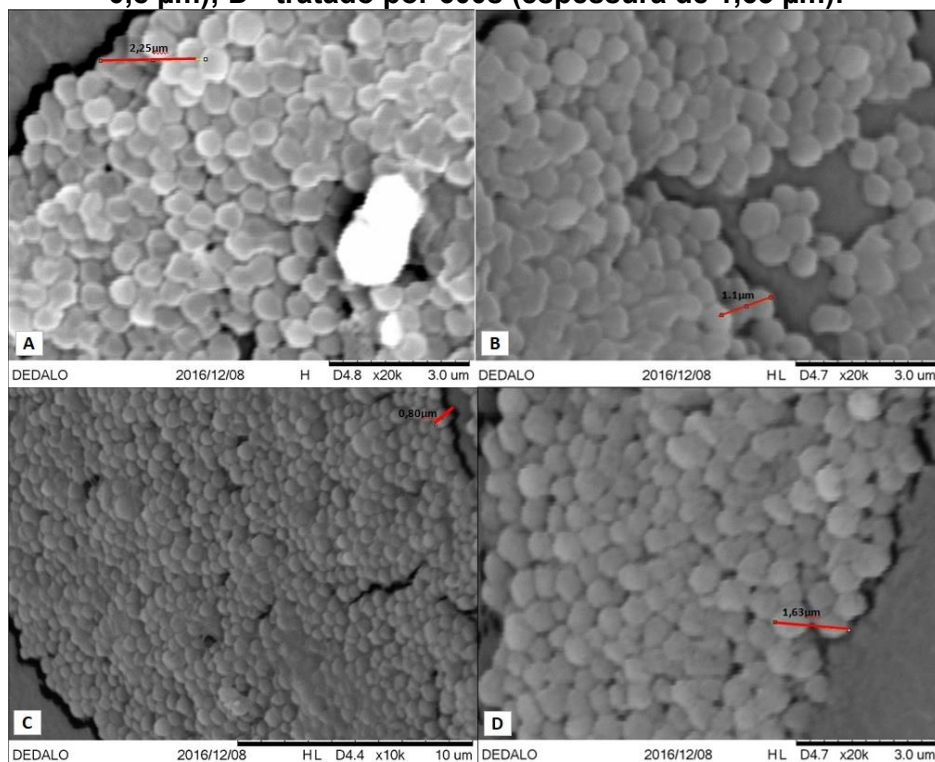
Tabela 1 - Porcentagem de redução de UFC/mL de *S. aureus* após tratamento com plasma

Grupos	%Redução
Controle Positivo (+)	
Ar Comprimido +Argônio 150s	99%
Ar Comprimido +Argônio 300s	99%
Ar Comprimido +Argônio 600s	100%

Fonte: Os autores.

Na figura 4, podemos observar as micrografias obtidas por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Por meio dessa técnica, foi possível comprovar a presença de biofilme em todos os segmentos de poliuretano utilizados neste estudo. Quando comparadas à espessura de biofilme da amostra controle com os grupos tratados, observa-se que houve uma diminuição em todos os grupos. Esse fato pode ser atribuído à ação do plasma e suas espécies reativas sobre os microrganismos. Devemos ressaltar que pode haver variação das espessuras das diferentes amostras, já que são provenientes de diferentes regiões do material de poliuretano.

Figura 4 - Micrografias de Microscópio Eletrônico de Varredura de Biofilmes de *S. aureus* com aumento de 20.000x. A- Controle Positivo (espessura de 2,25 μm); B - tratado por 150s (espessura de 1,1 μm); C - tratado por 300s (espessura de 0,8 μm); D - tratado por 600s (espessura de 1,63 μm).



Fonte: Os autores.

3. DISCUSSÃO

A aderência microbiana é essencial para a formação do biofilme; entretanto essa aderência é dependente da interação iônica entre o microrganismo e a superfície. Estudo de Richards et al., (2014) demonstrou que uma carga negativa atrai bactérias, sugerindo que uma superfície positivamente carregada irá repelir as bactérias. E, desse modo, inibir a adesão.

O tempo de formação de biofilme bacteriano varia com o metabolismo de cada microrganismo envolvido e sua interação com o substrato. Em um estudo realizado por Ziuzina et al., (2015), observou-se a formação de biofilmes de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* após um período de 48 horas em substratos contendo membranas de tereftalato de polietileno. Nesse estudo, o desenvolvimento do biofilme intraluminal foi formado em período inferior a 24 horas. Comprovaram, ainda, a ação do plasma não térmico na redução das mesmas bactérias, demonstradas pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) (ZIUZINA et al., 2015). Esses resultados corroboram o presente estudo no sentido de que a ação do plasma foi efetiva na redução das UFC/mL (TOMAZINI; SOUZA; TEDESCO, 2007).

Em relação à análise da formação do biofilme pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), Ziuzina et al. (2015) observou uma desintegração celular nos fragmentos da matriz polimérica extracelular do biofilme de *E. coli* exposto por 5 minutos ao plasma atmosférico, enquanto as células bacterianas de *E. coli* permaneceram intactas. Comparando esses resultados com os do presente estudo, foi observada uma alteração morfológica, conforme o tempo de exposição, destacando a espessura do biofilme de *S. aureus* presente nos substratos submetidos ao plasma frente ao biofilme adquirido na amostra-controle. Essa alteração tende a ser atribuída à ação do plasma em contato com o microrganismo em tempos diversos. Deve ser considerado, também, que a variação de espessura no biofilme se deve às diferentes regiões do substrato analisado.

Em relação aos procedimentos de esterilização em cateteres, muitas metodologias são utilizadas a fim de controlar a contaminação de microrganismos oportunistas que possam desencadear processos infecciosos. Os autores Trautner, Barbara W.; Darouiche (2010) pesquisaram substâncias utilizadas, tais como clorexidina, associadas a outros antimicrobianos, para esterilizar cateteres, demonstrando ser um tratamento viável para a prevenção e controle de bactérias; porém estas substâncias podem provocar reações alérgicas em alguns indivíduos submetidos ao uso desses cateteres.

A tecnologia do plasma composto por gás Argônio (Ar) comprovada em estudos, *in vitro*, por Hussain et al. (2015) mostrou-se eficaz na inativação de bactérias do grupo Staphylococcus em superfícies de dispositivos médicos. A qualidade desse método para esterilização de materiais e sua efetividade em microrganismos pode variar

de acordo com a composição dos gases com a qual é gerado o plasma, assim como sua frequência, voltagem, distância do alvo em questão e, também, do tempo de tratamento. Quando comparado a métodos tradicionais de esterilização, como radiações UV, óxido de etileno, uso de clorexidina, entre outros, a aplicação do plasma não térmico tem apresentado melhores resultados no controle microbiano (KOBAN et al., 2015).

Os autores acima também comprovaram a ação bactericida e bacteriostática do Argônio em tempo reduzido, em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, convergindo com os resultados obtidos em nosso estudo, porém em um tempo superior, em 600 segundos, apresentando efeito bactericida em biofilme de *Staphylococcus aureus*.

4. CONCLUSÃO

Após a incubação a 37 ° C e leitura, foi possível observar redução de UFC / mL, cerca de 99% em 150 segundos, 99% em 300 segundos, e 100% em 600 segundos, resultando em efeitos bacteriostático e bactericida no cateter tratado, exercido pela associação dos plasmas. A metodologia de esterilização de dispositivos envolvendo a aplicação de plasma elétrico não térmico é uma tecnologia promissora, ainda em estudo, que vem trazendo resultados alentadores no controle de biofilme bacteriano.

REFERÊNCIAS

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93-108, 2011.

FOSTER, T. J. et al. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 12, n. 1740–1534, p. 49–62, 2014.

HEILMAN, S. **Efeito da Radiação Ionizante nos Revesimentos de Cateteres de Poliuretano com Nanopartículas de Prata**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

HOGAN, S. et al. In Vitro Approach for Identification of the Most Effective Agents for Antimicrobial Lock Therapy in the Treatment of Intravascular Catheter-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2923–2931, 2016.

HØIBY, N. et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, p. S1–S25, 2015.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p. 365–376, 2017.

OLIVEIRA, A. C. Biofilme em cateter vesical de demora e a segurança do paciente : uma revisão da literatura Biofilm in indwelling urinary catheter and patient safety : a literature review. **Visa em debate**, v. 5, n. 3, p. 116–122, 2017.

PESSOA, R. S. et al. TiO₂ coatings via atomic layer deposition on polyurethane and polydimethylsiloxane substrates: Properties and effects on *C. albicans* growth and inactivation process. **Applied Surface Science**, v. 422, 2017.

RICHARDS, G. et al. Investigation of biofilm formation on a charged intravenous catheter relative to that on a similar but uncharged catheter. **Medical Devices: Evidence and Research**, p. 219, 2014.

SHAH, H. et al. Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection. **The Neurohospitalist**, v. 3, n. 3, p. 144–151, 2013.

TOMAZINI, M. V.; SOUZA, S.; TEDESCO, A. C. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência , absorção cutânea , alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal * **Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine**. v. 82, n. 6, p. 535–541, 2007.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TRAUTNER, BARBARA W.; DAROUICHE, R. O. Catheter-Associated Infections: Pathogenesis Affects Prevention. **Arch Intern Med.**, v. 164, n. 8, p. 842–850, 2010.

TRINDADE, E. et al. **Sineps - 2006**. p. 1–8, 2008.

VON WOEDTKE, T.; METELMANN, H.-R.; WELTMANN, K.-D. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. **Contributions to Plasma Physics**, v. 54, n. 2, p. 104–117, fev. 2014.

ZIUZINA, D. et al. Cold plasma inactivation of bacterial biofilms and reduction of quorum sensing regulated virulence factors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–21, 2015.