

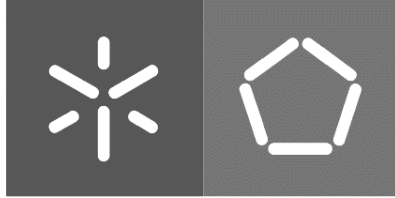


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Patrícia Isabel Martins Veiga

**Caracterização de bacteriófagos de
Proteus mirabilis e avaliação da sua
eficácia em biofilmes**

Outubro 2014



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Patrícia Isabel Martins Veiga

**Caracterização de bacteriófagos de
Proteus mirabilis e avaliação da sua
eficácia em biofilmes**

Tese de Mestrado
Mestrado em Bioengenharia

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Sanna Sillankorva
Coorientadora: Doutora Carina Almeida

Outubro 2014

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO
DE QUALQUER PARTE DESTA TESE

Universidade do Minho, ___ / ___ / _____

Assinatura: _____

Agradecimientos

Agradecimentos

Gostava de agradecer a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desta dissertação. Gostaria de agradecer em particular:

Às minhas orientadora e coorientadora Sanna e Carina por todo o apoio, incentivo, dedicação, simpatia e disponibilidade prestados ao longo da realização deste trabalho. Obrigada por serem sempre tão prestáveis e por tudo o que fizeram por mim!

A todos os colegas e ex-colegas de trabalho do Laboratório de microbiologia Aplicada II da Universidade do Minho, pela ajuda quando necessitei e pelo extraordinário ambiente de trabalho. Ao Zé, Catarina, Priscila, Hugo e principalmente Graça e Diana por toda a ajuda, disponibilidade e apoio. Ao Veloso não só pelos momentos hilariantes que proporcionaste, mas também pela tua ajuda e incentivo.

Às “minhas” meninas, Marta, Márcia, Maria João e Tânia pelo apoio, incentivo, ajuda, simpatia e pelos bons momentos passados a trabalhar. Um obrigado especial à Marta e à Márcia pela ajuda prestada ao longo de todo este tempo, pelos “serões” vividos no laboratório, sempre com boa disposição. Sem vocês não era a mesma coisa!

Aos meus “famigos” pelo incentivo e compreensão pela minha falta de tempo para eles e por rejeitar os seus convites.

À minha família (Pai, Mãe, Irmão, Tio Nando e Tia Mila) um enorme obrigado por todo o apoio, compreensão, carinho, amor e dedicação.

Ao meu namorado um obrigado do tamanho do mundo, pela sua preocupação, dedicação, disponibilidade, companheirismo e acima de tudo pela sua compreensão e paciência nos momentos mais difíceis e também pelo incentivo para não desistir. Sem o teu apoio não chegaria ao fim desta jornada.

Ao meu co-co-orientador, o Luís, por todo o apoio, amizade, dedicação, paciência e disponibilidade prestados ao longo deste trabalho.

E para terminar, obrigada à Soninha, à Ana Oliveira, ao Silvío e mais uma vez à Carina e à Sanna por todos os momentos de verdadeira galhofa e risota que proporcionaram ao longo deste ano, mostrando que a vida tem sempre um lado alegre. Adorei conviver com vocês.

A todos o meu mais sincero e enorme obrigada!!! Foi um prazer!!!

Resumo/ Abstract

Resumo

As infecções urinárias associadas a cateteres são bastante comuns em pacientes com longos períodos de cateterização urinária. Estas ocorrem devido a incrustações e obstruções dos cateteres por cristais e biofilmes microbianos, sendo a bactéria *Proteus mirabilis* uma das mais problemáticas. A utilização de bacteriófagos no combate a infecções bacterianas é vantajosa devido à sua especificidade, não destruindo bactérias da flora natural do hospedeiro.

Este trabalho descreve a caracterização de dois novos fagos de *P. mirabilis*, vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, e a avaliação da sua capacidade de adsorção ao silicone, uma superfície polimérica recorrentemente utilizada na cateterização. Posteriormente, foi avaliado o efeito das superfícies revestidas com fago na prevenção da formação de biofilmes pela espécie *P. mirabilis*.

Os fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 apresentam características morfológicas diferentes e mostraram-se específicos para esta espécie. Os dois fagos possuem um espectro lítico alargado sendo o do fago vB_PmiM_CEB5461 ligeiramente superior. Verificou-se que o revestimento de superfícies de silicone com partículas fágicas não compromete a viabilidade dos fagos. A não funcionalização prévia da superfície resultou numa maior concentração de fagos na superfície, em particular do fago vB_PmiP_CEB5460, e também num revestimento mais estável.

Estirpes de *P. mirabilis* com elevada capacidade de formação de biofilme foram usadas em ensaios de prevenção da formação de biofilme, tendo-se avaliado a eficácia dos fagos utilizando dois modelos diferentes (estático e contínuo). Em modelo estático foi observada uma ligeira redução, em especial após 48 horas de formação de biofilme. Já em modelo contínuo, apesar de ser visível uma tendência para a redução da população viável do biofilme, não foram observadas reduções estatisticamente significativas.

Os resultados desta tese mostram que o revestimento de superfícies com fagos pode ter algum efeito preventivo na formação de biofilme; no entanto, novos estudos devem ser feitos em condições dinâmicas para aferir o verdadeiro potencial desta abordagem.

Abstract

Catheter-associated urinary tract infections are common complications in patients with long periods of urinary catheterization. These infections occur due to the adhesion of pathogenic microorganism that can form crystalline biofilms eventually lead to the catheter obstruction. *Proteus mirabilis* is one of the most problematic bacteria. The use of bacteriophages to fight bacterial infections has shown some advantages, mostly due to their specificity, which allow a precise attack of the target bacteria, leaving the natural flora unharmed.

This work describes the characterization of two recently isolated *P. mirabilis* phages, vB_PmiP_CEB5460 and vB_PmiM_CEB5461, in terms of their adsorption capacity to silicone, a polymeric surface commonly used in catheterization. Afterwards, the effect of phage-coated surfaces in the prevention of biofilm formation was evaluated.

The phages vB_PmiP_CEB5460 and vB_PmiM_CEB5461 presented different plaque morphologies and were specific for this species. Although both phages presented good lytic spectrums, vB_PmiM_CEB5461 has shown a broader one. The coating of silicone surfaces with phage particles was possible without compromising the viability of the phages. The adsorption of phages to non-functionalized surfaces led to higher concentrations of particles on the surfaces and to a more stable coating, in particular for the phage vB_PmiP_CEB5460.

Biofilm prevention assays on silicon surfaces coated with phages were carried out with *P. mirabilis* strains showing high ability to form biofilms. The efficacy of phage-coated surfaces was tested using a static and a dynamic model. In the static model a slight reduction was observed, especially after 48 hours of biofilm formation. In the continuous model, a slight effect was visible in the biofilm viable population, but no significant reductions were observed.

These results have provided some evidences on the value of phage-coated surfaces for the control of biofilm formation, but further studies might be done on dynamic conditions to prove the true potential of this approach.

Índice

Índice Geral

<i>Agradecimentos</i>	iii
<i>Resumo/ Abstract</i>	vii
<i>Lista de abreviaturas, figuras e tabelas</i>	xvii
<i>Lista de abreviaturas</i>	xix
<i>Lista de figuras</i>	xx
<i>Lista de tabelas</i>	xxiii
<i>Estrutura de tese</i>	xxv
Capítulo 1 - Introdução Geral	1
1.1. Infecções Urinárias	3
1.1.1. As infecções do trato urinário	3
1.1.2. Infecções urinárias associadas a cateteres	4
1.2. Biofilmes	5
1.2.1. Formação de biofilmes	6
1.2.2. Tolerância a antibióticos	8
1.3. <i>Proteus mirabilis</i>	10
1.4. Bacteriófagos.....	13
1.4.1. Classificação e replicação dos fagos <i>Caudovirales</i>	14
1.4.2. Terapia fágica.....	15
1.4.3. O desafio da ação dos fagos nos biofilmes.....	16
1.5. Referências.....	17
Capítulo 2 - Caracterização dos bacteriófagos	23
2.1. Materiais e métodos	25
2.1.1. Microrganismos e fagos.....	25
2.1.2. Curva de calibração densidade ótica vs células viáveis.....	25

2.1.3.	Produção de fagos	26
2.1.3.1.	Título dos fagos – Unidades formadoras de placas	26
2.1.3.2.	Purificação e concentração dos fagos.....	27
2.1.4.	Espectro lítico dos fagos.....	27
2.1.5.	Curva de crescimento dos fagos.....	28
2.1.6.	Proteínas estruturais dos fagos	28
2.1.6.1.	Extração das proteínas estruturais dos fagos.....	28
2.1.6.2.	Determinação da concentração de proteínas nos fagos.....	29
2.1.6.3.	Eletroforese de proteínas – SDS PAGE e coloração dos géis.....	29
2.1.7.	Resistência dos fagos à sonicação.....	30
2.1.8.	Adsorção dos fagos a superfícies de silicone não funcionalizadas	30
2.1.9.	Adsorção dos fagos a superfícies de silicone funcionalizadas.....	31
2.1.10.	Libertação dos fagos em urina a 37°C ao longo do tempo em superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas	31
2.2.	Resultados e discussão.....	32
2.2.1.	Espectros lítico dos fagos	32
2.2.2.	Curva de crescimento dos fagos – OSGC.....	34
2.2.3.	Análise das proteínas estruturais dos fagos.....	36
2.2.4.	Resistência fágica à sonicação	38
2.2.5.	Quantificação dos fagos adsorvidos aos diferentes cupões	40
2.2.6.	Quantificação da libertação dos fagos em urina.....	43
2.2.7.	Conclusão	45
2.3.	Referências.....	45
Capítulo 3 - Caracterização da formação de biofilme em superfícies de silicone revestidas com bacteriófagos: modelo estático e contínuo.....		49
3.1.	Materiais e métodos	51

3.1.1. <i>Screening</i> para a capacidade de formação de biofilme.....	51
3.1.2. Resistência da bactéria à sonicação	52
3.1.3. Concentração inibitória mínima (MIC).....	53
3.1.4. Formação de biofilme em cupões de silicone	53
3.1.5. Formação de biofilme em modelo contínuo.....	54
3.2. Resultados e discussão.....	56
3.2.1. <i>Screening</i> para a capacidade de formação de biofilme.....	56
3.2.2. Concentração inibitória mínima.....	58
3.2.3. Resistência bacteriana à sonicação	60
3.2.4. Formação de biofilme em superfícies revestidas com fagos.....	62
3.2.5. Biofilme em modelo contínuo.....	67
3.2.6. Conclusão	70
3.3. Referências.....	71
Capítulo 4 - Conclusão final e sugestão de trabalho futuro.....	75
Conclusão final e sugestão de trabalho futuro	77
Anexos	79

Lista de abreviaturas, figuras e tabelas

Lista de abreviaturas

AHL	N-acyl-L-homoserina lactones
APTS	(3-aminopropyl) triethoxysilane
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
CAUTI	Infeção urinária associada a cateteres
CETC	Coleção Espanhola de Cultivos Tipo
CFU's	Unidade formadoras de colónias
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Violeta de cristal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
DO	Densidade Ótica
EPS	Exopolissacarídeos
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
ICTV	Comité Internacional de Taxonomia de Vírus
MBC	Concentração bactericida mínima
MBEC	Concentração mínima de erradicação do biofilme
MIC	Concentração mínima inibitória
MOI	Multiplicidade de Infeção
OSGC	One Step Growth Curve
PBS	Tampão fosfato-salino
PEG	Polietilenoglicol
PES	Polietersulfona
PFU's	Unidades formadoras de Placas
QS	Quorum sensing
Rpm	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Sulfato Dodecil de Sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SGSC	Salmonella genetic stock centre
TSA	Agar de soja tríptica
TSB	Caldo de soja tríptica

Lista de figuras

Capítulo 1 - Introdução Geral

Figura 1.1 - Etapas de desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de Molin e Tolker-Nielsen (2003).....	7
Figura 1.2 - Alguns dos mecanismos descritos para o aumento da resistência aos antibióticos em biofilme maduro (adaptado de Drenkard (2003)).....	9
Figura 1.3 - Mecanismo proposto da formação de biofilme em infecções urinárias associadas a cateteres com a bactéria <i>P. mirabilis</i> . Adaptado de Jacobsen e Shirtliff (2011).	12
Figura 1.4 - Representação dos ciclos lítico e lisogénico (adaptado de García <i>et al.</i> (2010))...	14
Figura 1.5 - Representação de um bacteriófago (retirado de García <i>et al.</i> (2010)).....	15
Figura 1.6 - Representação das três diferentes famílias da ordem <i>Caudovirales</i> . Adaptado de Krupovic et al. (2011)).....	15

Capítulo 2 - Caracterização dos bacteriófagos

Figura 2.1 - Placas fágicas dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, respetivamente.....	33
Figura 2.2 - Curva <i>One Step Growth</i> para o fago vB_PmiP_CEB5460.	35
Figura 2.3 - Curva <i>One Step Growth</i> para o fago vB_PmiM_CEB5461.	36
Figura 2.4 - Análise das proteínas estruturais dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 por SDS-PAGE.....	37
Figura 2.5 - Resistência do fago vB_PmiP_CEB5460 à sonicação. * amostras com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	39
Figura 2.6 - Resistência do fago vB_PmiM_CEB5461 à sonicação. * amostras com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).....	39
Figura 2.7 - Adsorção do fago vB_PmiP_CEB5460 a superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.....	41
Figura 2.8 - Adsorção do fago vB_PmiM_CEB5461 a superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.....	41

Figura 2.9 - Ligação fágica à superfície funcionalizada com APTS (adaptado de Cademartiri <i>et al.</i> (2010)).	42
Figura 2.10 - Ligação fágica numa superfície saturada de APTS (adaptado de Cademartiri <i>et al.</i> (2010)).	42
Figura 2.11 - Libertação ao longo do tempo do fago vB_PmiP_CEB5460 em superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.	43
Figura 2.12 - Libertação ao longo do tempo do fago vB_PmiM_CEB5461 em superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.	44

Capítulo 3 - Caracterização da formação de biofilme em superfícies de silicone revestidas com bacteriófagos: modelo estático e contínuo

Figura 3.1 - Imagens do sistema contínuo montado no laboratório, com pormenor das diferentes posições dos reguladores das cassetes.	55
Figura 3.2 - Quantificação da formação de biofilme por violeta de cristal.	57
Figura 3.3 - Resistência da estirpe de <i>P. mirabilis</i> SGSC 5449 à sonicação. * representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).	61
Figura 3.4 - Formação de biofilme da bactéria <i>P. mirabilis</i> SGSC 5449 em superfícies de silicone revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B). * amostras com resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).	62
Figura 3.5 - Formação de biofilme da bactéria <i>P. mirabilis</i> SGSC 5449 em superfícies de silicone funcionalizadas e revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B). * representa $p < 0,05$.	64
Figura 3.6 - Formação de biofilme da bactéria <i>P. mirabilis</i> SGSC 5446 em superfícies de silicone revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B).	65
Figura 3.7 - Formação de biofilme da bactéria <i>P. mirabilis</i> SGSC 5446 em superfícies de silicone funcionalizadas e revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B).	66
Figura 3.8 - Quantificação da formação de biofilme em cateter de Foley normal e revestido com fagos por CFU's (A) e por violeta de cristal (B).	68

Figura 3.9 - Incrustações cristalinas/biofilme observados no ponto 96 horas. (A) cateter de Foley normal; (B) cateter de Foley não revestido após formação de biofilme; (C) cateter de Foley revestido com fagos após formação de biofilme. 69

Lista de tabelas

Capítulo 1 - Introdução Geral

Tabela 1.1 - Classificação ICTV dos fagos (adaptado de Mc Grath e van Sideren (2007)). 14

Capítulo 2 - Caracterização dos bacteriófagos

Tabela 2.1 - Espectro lítico dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461. 32

Tabela 2.2 - Espectro de atividade dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 em bactérias da família *Enterobacteriaceae*. 34

Tabela 2.3 - Proteínas putativas do fagos vB_PmiP_CEB5460. 37

Tabela 2.4 - Proteínas putativas do fagos vB_PmiM_CEB5461. 38

Capítulo 3 - Caracterização da formação de biofilme em superfícies de silicone revestidas com bacteriófagos: modelo estático e contínuo

Tabela 3.1 - Classificação das várias estirpes de *P. mirabilis* quanto à capacidade de formação de biofilme. 58

Tabela 3.2 - Resistências aos antibióticos das várias estirpes de *P. mirabilis*. 59

Estrutura de tese

Estrutura da Tese

A tese apresentada é constituída por 4 capítulos.

No capítulo 1 encontra-se uma introdução teórica sobre a problemática das infecções urinárias, dando realce às infecções urinárias associadas a cateteres, sobretudo as causadas pela bactéria *Proteus mirabilis*. Encontra-se também descrito o papel dos biofilmes, assim como as potencialidades dos bacteriófagos como agentes terapêuticos.

O capítulo 2 descreve todo o processo de caracterização de dois novos bacteriófagos de *P. mirabilis*, vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, desde a sua produção, especificidade e resistência à sonicação, bem como caracterização da sua replicação no hospedeiro bacteriano e capacidade de adsorção a superfícies de silicone.

O terceiro capítulo descreve a caracterização das estirpes de *P. mirabilis* quanto à capacidade de formação de biofilme, perfil de resistência bacteriana aos antibióticos e resistência à sonicação. Para além disso neste capítulo é também descrito o efeito do revestimento de superfície com partículas fágicas na formação de biofilme, quer em modelo estático como em modelo contínuo.

Por fim, no último capítulo são descritas as conclusões principais do trabalho realizado e são colocadas algumas sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 1

Introdução Geral

Capítulo 1 – Introdução Geral

1.1. Infecções Urinárias

1.1.1. As infecções do trato urinário

As infecções do trato urinário são bastante comuns nas práticas médicas (Brooks e Keevil, 1997), sendo as infecções nosocomiais mais comuns no ser humano (Klevens *et al.*, 2007, Rodrigues e Barroso, 2011). O trato urinário é composto por vários tecidos e órgãos, entre eles rins, ureteres, bexiga e uretra, (Moura *et al.*, 2009). As infecções urinárias são patologias que afetam o trato urinário (Sheerin, 2011), e são caracterizadas pela presença de bactérias na urina – bacteriúria (Lee e Neild, 2007). Porém, só é considerada uma infecção do trato urinário quando existem pelo menos 10^5 bactérias/ml de urina fresca, podendo ocorrer uma infecção sintomática com valor ligeiramente abaixo, normalmente acompanha por outra afeção (Lee e Neild, 2007). A origem mais comum das infecções do trato urinário é a bacteriana, contudo também podem ocorrer infecções causadas por fungos, vírus e parasitas (Sheerin, 2011).

As infecções urinárias podem adquirir várias designações, consoante o órgão que é afetado. Assim sendo, infecções na uretra são designadas por uretrites, infecções da bexiga por cistites e infecções nos rins por pielonefrites (Rodrigues e Barroso, 2011). Quanto à sua classificação, estas podem ser classificadas como infecções do trato urinário não complicadas, quando não se verifica nenhum tipo de irregularidade, quer a nível anatómico como funcional; e infecções do trato urinário complicadas, ocorrendo nestas anomalias ou irregularidades que aumentam a suscetibilidade para a infecção (Sheerin, 2011).

Os patogénicos podem entrar no trato urinário por duas vias distintas: via ascendente, da uretra para a bexiga (havendo possibilidade de afetar o rim - pielonefrite), sendo os flagelos e as pili um fator de grande importância no que se refere à mobilidade dos microrganismos (Lane *et al.*, 2007); via hematogénica, onde a bactéria infeta inicialmente o sangue e posteriormente o aparelho urinário, nomeadamente os rins (Rodrigues e Barroso, 2011). Mesmo existindo duas vias de infecção, as infecções através da via ascendente, quer da bexiga como dos rins, são as mais comuns (Lee e Neild, 2007).

Existem vários fatores de risco para o desenvolvimento de uma infecção urinária, tais como: fatores genéticos, relações sexuais, cremes espermicidas, uso de diafragma, esvaziamento incompleto da bexiga, alterações na flora bacteriana normal, infecção urinária anterior (Sheerin, 2011, Scholes *et al.*, 2000). O sexo feminino apresenta uma maior predisposição para as infecções urinárias. Tal acontecimento é devido à proximidade da uretra com o ânus, mas também devido ao facto de o canal uretral ser mais curto que o do sexo masculino (Lee e Neild, 2007).

Em condições normais o sistema urinário, isto é, os rins, ureteres e bexiga são estéreis. Já a uretra pode ser facilmente colonizada por bactérias da flora vaginal ou retal, e, dependendo da virulência da bactéria, poderá ultrapassar as defesas do hospedeiro, causando infecção (Lee e Neild, 2007, Sheerin, 2011, Rodrigues e Barroso, 2011). Infecção esta que posteriormente poderá alastrar-se aos outros órgãos.

De acordo com a literatura, o agente etiológico mais frequentemente associado às infecções do trato urinário é a *Escherichia coli*, havendo contudo referência a outros microrganismos como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus saprofiticus* (Sheerin, 2011).

No que concerne à resistência das bactérias aos antibióticos, esta tem aumentado substancialmente nos últimos anos (Junquera *et al.*, 2005), sendo que este acontecimento pode ser devido ao uso constante e irrefletido de antibióticos que são normalmente empregues no combate das infecções urinárias (Rodrigues e Barroso, 2011).

1.1.2. Infecções urinárias associadas a cateteres

Nas infecções nosocomiais mais comuns estão incluídas as infecções do trato urinário associadas a cateteres, conhecidas como CAUTIs – *catheter-associated urinary tract infections* (Sedor e Mulholland, 1999). A definição de CAUTIs segundo Leone *et al.* (2004) é a presença de microrganismos na bexiga de um paciente cateterizado. Esta é uma complicação bastante comum em pacientes com longos períodos de cateterização urinária, ocorrendo devido a incrustações e obstruções do cateter por cristais e biofilme (Stickler e Zimakoff, 1994).

Os cateteres urinários são dispositivos médicos utilizados para aliviar a retenção e incontinência urinária, podendo estes serem utilizados quer em ambiente hospitalar como domiciliário, através dos cuidados de enfermagem. O cateter normalmente utilizado em cateterizações urinárias é o cateter de Foley. Este é um sistema fechado, que já se encontra

estéril, pois terá que entrar pela uretra até à bexiga, na qual permanece devido ao facto de possuir um balão, que é posteriormente insuflado, para assim poder escoar a bexiga sem correr o risco de deslocação (Jacobsen *et al.*, 2008). A introdução do cateter pode levar à inflamação da uretra, abrindo assim uma porta de entrada às bactérias, ocorrendo mais facilmente no sexo feminino devido ao curto comprimento da uretra e a fácil contaminação por flora vaginal e anal (Leone *et al.*, 2004, Ha e Cho, 2006). Para além disso, uma infeção urinária associada a cateter pode ser adquirida devido ao método e tempo da cateterização, à suscetibilidade do paciente e qualidade do cateter (Ha e Cho, 2006, Newman e Willson, 2011). Na realidade, inicialmente estes dispositivos foram desenhados para serem utilizados nos pacientes por curtos períodos de tempo, sendo agora utilizados por longos prazos, como por exemplo em pacientes que perderam o controlo da bexiga (Jacobsen *et al.*, 2008, Kohler-Ockmore e Feneley, 1996).

Este dispositivo médico é largamente utilizado em ambiente hospitalar, sendo que em alguns casos o seu uso seria evitável (Jain *et al.*, 1995), como por exemplo na incontinência urinária sem feridas perineais, para a prevenção de úlceras, entre outros (Jansen *et al.*, 2012). Esta prática coloca alguns pacientes em risco de desenvolver uma infeção urinária associada a cateter (Jacobsen *et al.*, 2008), pois o cateter é um meio atrativo para a colonização bacteriana e também formação de biofilme (Stickler, 2008). De facto, a cateterização pode acarretar diversas complicações clínicas para o paciente, como febre, uretrites e cistites, nos casos mais simples; ou pielonefrites agudas, cicatrizes renais e bacteremias, em casos com mais gravidade (Jacobsen *et al.*, 2008). Posto isto, algumas das formas de prevenção deste tipo de infeções passam por reduzir a sua utilização, serem utilizados apenas em casos de real necessidade, removê-los assim que não sejam necessários, manter o sistema de drenagem fechado, isto é, da bexiga para o saco de recolha sem que haja contacto exterior para não contaminar a urina ou o interior do próprio saco (Hooton *et al.*, 2010, Stamm, 1991).

Segundo Ha e Cho (2006) a formação de biofilme no cateter urinário tem sido descrita como um ponto importante na patogenicidade dos microrganismos associados a CAUTIs, surgindo assim interesse na superfície do cateter, isto é, interesse na modificação da superfície deste de forma a impedir a formação de biofilme.

1.2. Biofilmes

Na natureza, os microrganismos podem apresentar-se sob duas formas, sendo estas a forma planctónica e a forma séssil. A diferença entre estas formas é que na primeira os

microrganismos estão dispersos no meio, circulando livremente, e na segunda encontram-se aderidos às superfícies sólidas, na forma de biofilmes (Pasternak, 2009).

Os biofilmes são compostos essencialmente por água (Stewart, 2002) e são definidos como sendo um denso agregado de microrganismos, aderidos a uma superfície, estando este agregado rodeado por uma matriz de exopolissacarídeos (Drenkard, 2003). Estes podem ser formados por uma só espécie microbiana ou então serem compostos por múltiplas espécies microbianas (O'Toole *et al.*, 2000). Quanto à superfície à qual o biofilme adere, esta é bastante variável, podendo ser uma superfície inerte, tecidos vivos ou material morto (Donlan, 2001). Contudo, pode ocorrer a formação de biofilme sem a presença de uma superfície sólida, podendo o microrganismo em questão formar uma densa matriz anexada às células agregadas a um muco viscoso (Romling e Balsalobre, 2012).

A matriz de exopolissacarídeos (EPS) mantém o biofilme unido e funciona como barreira protetora, resistindo à penetração de vários agentes (Drenkard, 2003, Stewart e Costerton, 2001). Esta é muito provavelmente responsável pela elevada persistência das infeções associadas a biofilmes (Costerton *et al.*, 1999).

A resistência bacteriana nos biofilmes leva a que as doenças envolvendo estas estruturas sejam de difícil tratamento, podendo muitas vezes serem impossíveis de tratar com agentes antimicrobianos (Drenkard, 2003, Donlan, 2001). Já vários tipos de antibióticos foram testados contra biofilmes, contudo na maior parte dos casos as bactérias presentes nestas estruturas conseguem alterar o seu modo de crescimento de forma a serem menos sensíveis à presença destes agentes do que quando se encontram na forma sua forma livre, planctónica (Stewart, 2002).

1.2.1. Formação de biofilmes

A formação, bem como a acumulação dos biofilmes resulta de vários processos químicos, físicos e biológicos, os quais trabalham em simultâneo. O desenvolvimento de biofilmes passa por várias etapas (Figura 1.1).

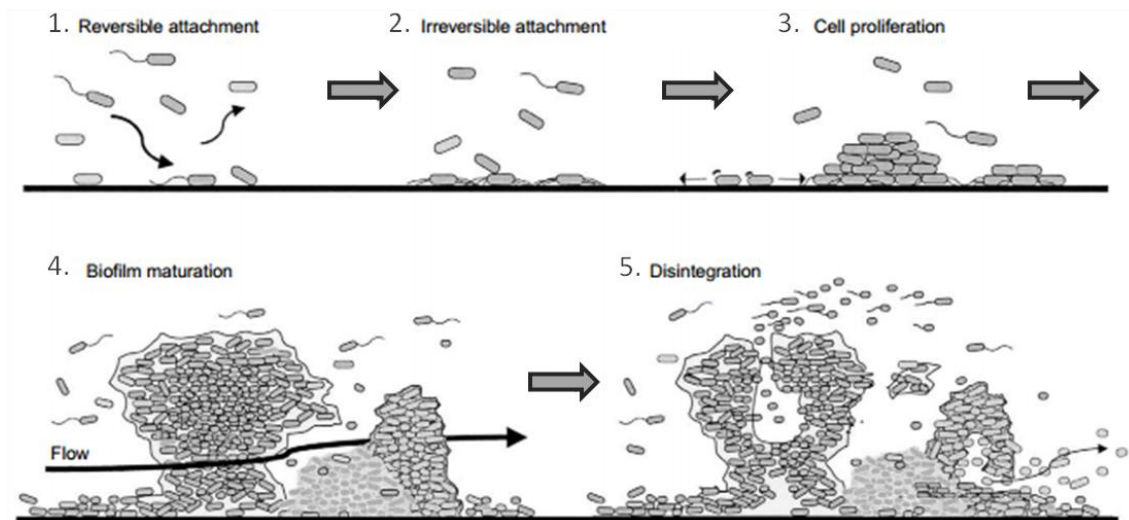


Figura 1.1 - Etapas de desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de Molin e Tolker-Nielsen (2003).

Estas diferentes etapas podem ser resumidas da seguinte forma:

1. As células livres (forma planctónica) com motilidade aproximam-se da superfície sólida e aderem a esta. Nesta fase a adesão ainda pode ser reversível;
2. As células planctónicas chegam à superfície sólida e aderem. Aqui a adesão já é irreversível. Começa a produção de EPS;
3. Crescimento e divisão das células aderidas, à custa de nutrientes presentes na superfície à qual aderiram, ou originários do líquido envolvente;
4. Maturação do biofilme com a adesão das células livres, bem como de outras partículas, ajudando à acumulação do biofilme. Aqui a estabilidade do biofilme é assegurada pelas interações célula-célula e pela matriz de EPS;
5. Libertação do material celular por:
 - a. Erosão, onde ocorre a perda de células individuais;
 - b. Descolamento, onde ocorre perda de agregados.

A composição dos biofilmes depende de várias condições, como o microrganismo, o seu estado fisiológico, ambiente onde se encontra (temperatura, pH, composição do meio) e a superfície onde as células estão aderidas (Davey e O'Toole G, 2000). Um dos processos mais importantes na formação de biofilmes é o transporte de células livres e sua posterior fixação à superfície sólida, pois é assim que se começa a formar um biofilme. Outro mecanismo importante na formação de biofilmes é o *quorum sensing* (QS). Este é um mecanismo intercelular de sinalização, ou seja, um mecanismo de “comunicação” entre células, capaz de

regular determinadas atividades (Parsek e Greenberg, 2005). O QS permite que as bactérias detetem concentrações de outras bactérias que estejam presentes num microambiente limitado, ativando posteriormente determinados genes como resposta. Esta ativação pode levar à produção de fatores de virulência, como enzimas ou toxinas (Hoiby *et al.*, 2011). Em muitas bactérias Gram-positivas, as moléculas de QS podem ser péptidos, já em bactérias Gram negativas, as moléculas QS mais bem descritas são N-acyl-L-homoserina lactones (AHL) (Fuqua *et al.*, 2001).

1.2.2. Tolerância a antibióticos

Em termos médicos, a característica mais importante das bactérias em biofilme é a sua elevada resistência quer a mecanismos de defesa do próprio hospedeiro, quer a terapia antimicrobiana (Ehrlich *et al.*, 2005). Os biofilmes bacterianos são difíceis de detetar através de diagnósticos de rotina, e por isso facilitam a propagação das resistências aos antibióticos, a qual acontece devido à promoção da transferência horizontal de genes (Fux *et al.*, 2005). Assim sendo, os biofilmes são a origem de muitas infeções bacterianas persistentes, as quais possuem uma enorme importância clínica (Fux *et al.*, 2003, Hall-Stoodley e Stoodley, 2009).

Segundo vários autores, as células bacterianas quando presentes em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos. Existem duas concentrações que são valores padrão nos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e são referências importantes no tratamento de infeções, sendo elas a concentração inibitória mínima (do inglês *minimum inhibitory concentrations* - MIC) e a concentração bactericida mínima (do inglês *minimum bactericidal concentration* - MBC), ambas expressas em µg/mL ou mg/L (Fux *et al.*, 2003). A concentração inibitória mínima é a concentração mais baixa de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Por sua vez, a concentração bactericida mínima é a concentração mais baixa de antimicrobiano capaz de matar células bacterianas (Andrews, 2001). Para além destas duas concentrações, em biofilmes existe também a concentração mínima de erradicação do biofilme (do inglês *minimum biofilme eradication concentration* – MBEC), que não é mais que a concentração mais baixa capaz de erradicar o biofilme (Ceri *et al.*, 1999). Na forma de biofilmes, a mesma bactéria pode apresentar uma MBC (ou, considerando a forma de biofilme, MBEC) três a quatro logs superior à observada na sua forma planctónica (Fux *et al.*, 2003). Da mesma forma, outros autores mostraram que uma bactéria em biofilme pode apresentar uma MIC 1000 vezes superiores à suportada na forma planctónica (Behlau e Gilmore, 2008, Stewart e Costerton, 2001). Quanto

mais elevado for o valor da concentração inibitória mínima e quanto mais próxima do limite superior de sensibilidade, maior é a probabilidade de acontecerem falhas na terapêutica, isto é, maior é o risco de o antimicrobiano ser ineficaz, sobretudo quando este penetra mal o local de infecção (Ramos *et al.*, 2006).

A resistência das bactérias quando presentes em biofilmes pode-se dever a diferentes fatores, os quais se encontram resumidos na Figura 1.2. Alguns dos mecanismos mais descritos envolvem a redução das taxas de crescimento, a produção de bombas para expelir os antibióticos, a produção da matriz do biofilme, o desenvolvimento de células *persisters* especializadas, e também a elevada diversidade da população. As células *persisters* são uma população de células que persistem no biofilme, isto é, são células altamente especializadas que resistem aos agentes antimicrobianos e a desinfetantes químicos (Stewart, 2002, Fux *et al.*, 2003). Estas células estão presentes em maior quantidade nos biofilmes (Stewart, 2002).

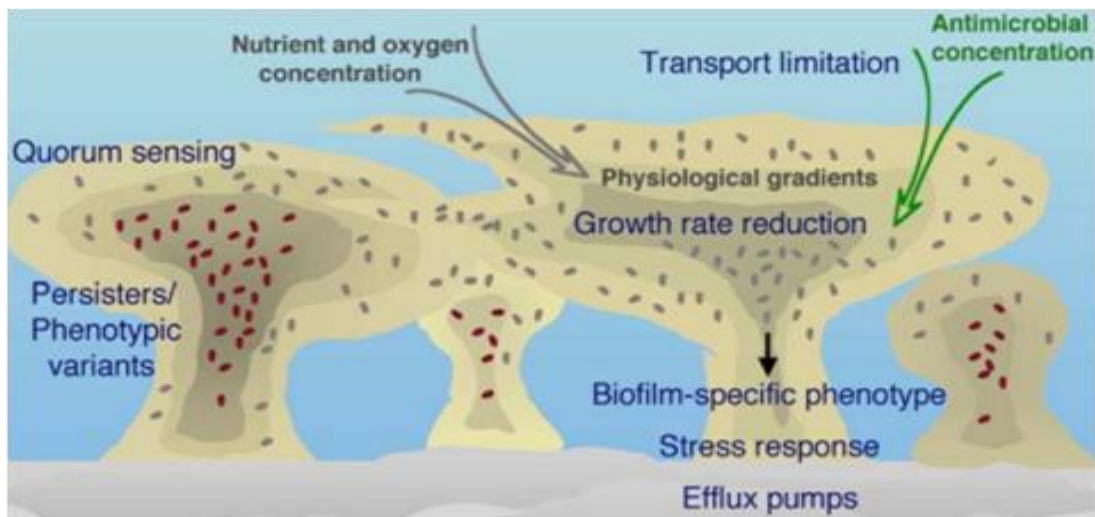


Figura 1.2 - Alguns dos mecanismos descritos para o aumento da resistência aos antibióticos em biofilme maduro (adaptado de Drenkard (2003)).

Segundo Prakash *et al.* (2003), a presença de EPS pode atuar como uma barreira físico-química, dificultando ou impedindo a penetração de agentes, tais como os antibióticos. A matriz também limita o acesso a nutrientes a algumas das células do biofilme, o que leva a um crescimento lento ou estagnação. Isto pode contribuir para a tolerância a antibióticos através da diminuição da absorção da droga. Além disso, as enzimas como as beta-lactamases, que degradam os antibióticos, podem ser imobilizadas na matriz de EPS, de modo que a entrada de moléculas de antibiótico pode ser inativado de forma eficaz. Sabe-se também que a composição de proteínas da parede celular de bactérias é significativamente modificada (até 40%) em

comparação com as bactérias que estão na forma planctónica. Isto significa que as membranas das bactérias do biofilme podem ser melhor equipadas para bombear os antibióticos, caso as barreiras primárias falhem.

É também na camada exterior dos biofilmes que são desativados os agentes antimicrobianos, como por exemplo o hipoclorito e o peróxido de hidrogénio, sendo esta mais rápida do que a sua difusão. Estes oxidantes antimicrobianos resultam do metabolismo oxidativo das células fagocíticas. Por sua vez, a fraca penetração destes agentes pode explicar parcialmente a incapacidade das células fagocíticas em destruir microrganismos no biofilme.

Finalmente, devido à elevada proximidade entre as células, os biofilmes proporcionam um nicho perfeito para a troca de DNA extracromossomal, que é responsável pela transferência de fatores de virulência e resistência a antibióticos.

Todos estes factos mostram que os biofilmes representam o ambiente ideal para o surgimento e proteção de patogénicos altamente especializados. A bactéria de *P. mirabilis* é um bom exemplo de um microrganismo altamente adaptado quando em biofilme. Esta bactéria é capaz de aderir rapidamente à superfície de cateteres, formar biofilme e incrustações cristalinas que bloqueiam o fluxo do cateter, e ainda induzir fenótipos de elevada motilidade e aderência, capazes de reverter o fluxo e colonizar o trato urinário humano (Stickler e Morgan, 2008, Mobley e Warren, 1987, Stickler *et al.*, 1993).

1.3. *Proteus mirabilis*

As bactérias do género *Proteus* são bacilos Gram-negativos (Jacobsen e Shirliff, 2011) que pertencem à família das *Enterobacteriaceae* (Coker *et al.*, 2000). Estas bactérias são encontradas nos mais diversos ambientes, como águas poluídas, solo e intestino de mamíferos (Rozalski *et al.*, 1997, Jacobsen e Shirliff, 2011), e possuem uma enorme motilidade (geralmente designada de *swarming*) (Rozalski *et al.*, 1997). Devido a esta característica, estas bactérias são capazes de se mover de forma coordenada aquando da presença de superfícies sólidas ou semi-sólidas (Jacobsen e Shirliff, 2011). As infeções urinárias associadas a *Proteus* podem ser de difícil tratamento (Jacobsen *et al.*, 2008) devido, entre outras características, ao facto de esta bactéria se fixar a vários tipos de polímeros do cateter, como o silicone, o propileno, poliestireno, entre outros (Jacobsen e Shirliff, 2011, Stickler e Hughes, 1999, Jacobsen *et al.*, 2008). A espécie de *Proteus* que mais frequentemente causa doenças nos humanos é a *Proteus mirabilis* (Jacobsen e Shirliff, 2011), sendo esta bactéria a causa de várias

infecções nosocomiais oportunistas (Rozalski *et al.*, 1997). Esta espécie bacteriana é descrita por vários autores como causadora comum de infecções do trato urinário, principalmente CAUTIs (Coker *et al.*, 2000, Stickler e Morgan, 2008, Jacobsen *et al.*, 2008). Porém, geralmente *P. mirabilis* não é um colonizador primário do trato urinário, não sendo vulgarmente encontrada em cateterizações curtas, acontecendo o contrário em cateterizações longas, onde normalmente aparece na urina (Stickler, 2008).

P. mirabilis é um microrganismo com vários fatores de virulência, entre os mais comuns estão a motilidade, devida aos flagelos, e a presença de fimbrias que causam a invasão dos tecidos do hospedeiro e adesão às mucosas deste, provocando danos (Coker *et al.*, 2000, Jacobsen e Shirliff, 2011, Jacobsen *et al.*, 2008). Por sua vez, os flagelos, para além de permitirem a reversão do fluxo e colonização do trato urinário, também parecem possuir um papel importante na perceção da superfície, e como consequência na formação de biofilme (Coker *et al.*, 2000).

Para além disso, esta bactéria possui enzimas de degradação, entre elas ureases, proteases, hemolisinas; tem uma enorme capacidade para captar ferro e consegue formar vários cristais, como por exemplo os de estruvite (Rozalski *et al.*, 1997, Sosa *et al.*, 2006). É a urease que leva à geração de cristais, pois hidrolisa a ureia levando à formação de iões de amónio e carbonato, o que provoca um aumento do pH urinário, e consequentemente do biofilme. À medida que a urina fica alcalina precipitam-se cristais de fosfato de magnésio e cálcio, desempenhando estes um papel importante na formação do biofilme. Por sua vez, agregados destes acumulam-se na urina, mas também nas células aderidas à superfície do cateter. Por conseguinte, a contínua acumulação de cristais e células leva à formação de biofilmes cristalinos (Stickler, 2008) e pode conduzir ao entupimento do cateter, impossibilitando o fluxo de urina. A retenção urinária pode depois levar a consequências mais graves como pielonefrites (McLean *et al.*, 1991, Stickler *et al.*, 2006, Stickler e Morgan, 2008, Coker *et al.*, 2000). A urease produzida por esta estirpe é considerada uma enzima potente, devido ao facto de hidrolisar a ureia mais rapidamente que as enzimas produzidas por outras espécies (Jones e Mobley, 1987). Na figura 1.3 encontra-se um esquema resumindo os acontecimentos que podem ocorrer durante a formação de biofilme por esta espécie bacteriana.

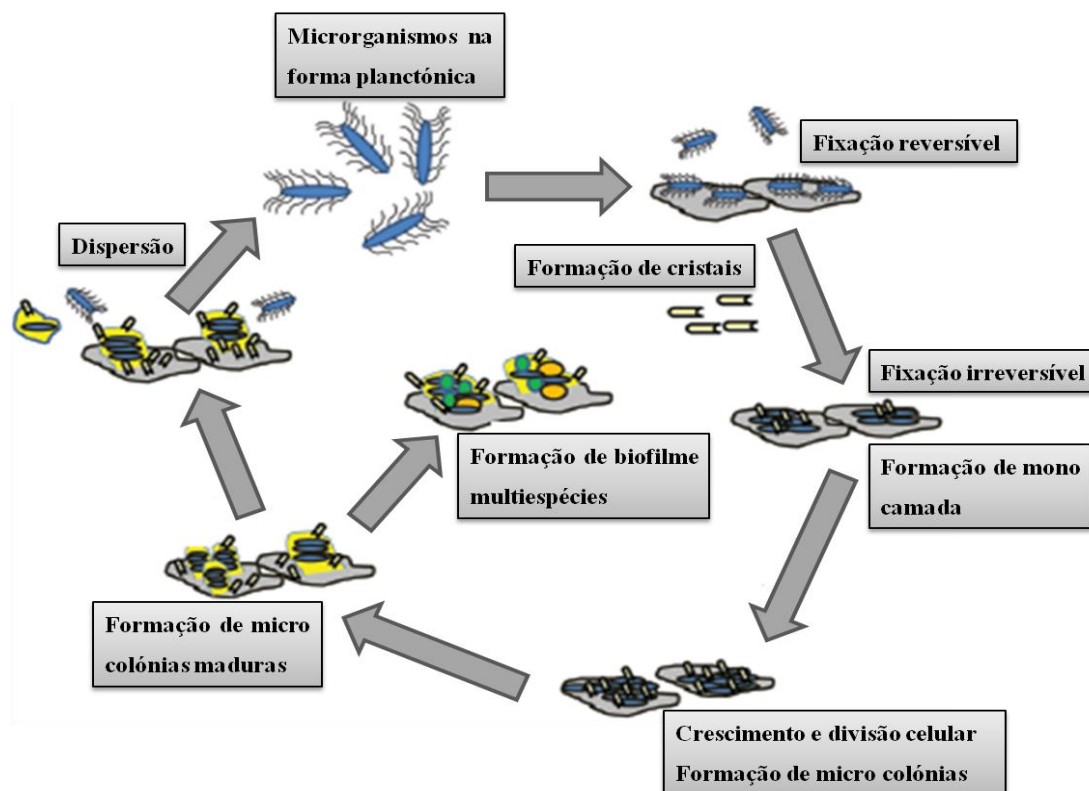


Figura 1.3 - Mecanismo proposto da formação de biofilme em infecções urinárias associadas a cateteres com a bactéria *P. mirabilis*. Adaptado de Jacobsen e Shirtliff (2011).

A resistência bacteriana pode ser dividida em dois tipos, a resistência bacteriana intrínseca ou natural e a resistência bacteriana adquirida. O primeiro tipo de resistência bacteriana é uma resistência espécie-específica, isto é, depende do género/espécie da bactéria, sendo todas as estirpes pertencentes a esse género resistentes a determinado antimicrobiano. O segundo tipo, a adquirida, pode apenas manifestar-se em algumas estirpes da mesma espécie bacteriana, podendo esta resultar de alguma mutação num gene cromossómico ou então da aquisição de novo material genético pela bactéria (Tenover, 2006). No que se refere à sua suscetibilidade a antibióticos, a espécie *P. mirabilis* é geralmente suscetível a vários antibióticos, entre eles as penicilinas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, cefalosporinas ou β -lactâmicos (O'Hara *et al.*, 2000, Luzzaro *et al.*, 2001). Contudo, nos últimos anos tem sido descrita a aquisição de resistência a alguns destes antibióticos, nomeadamente aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Aragon *et al.*, 2008, Wachino *et al.*, 2006, Saito *et al.*, 2006). Quanto a resistências intrínsecas a antimicrobianos, o *P. mirabilis* possui resistência à nitrofurantoína e a tetraciclina, podendo a resistência à tetraciclina servir como marcador deste microrganismo (O'Hara *et al.*, 2000). As terapias antimicrobianas indicadas para as infeções urinárias dependem da gravidade da doença, sendo os antibióticos mais vulgarmente prescritos

as quinolonas e trimetoprim/sulfametoxazol (Franz e Horl, 1999). Porém, em biofilme as espécies bacterianas são mais resistentes aos agentes antimicrobianos, bem como a componentes do sistema imune do hospedeiro (Drenkard, 2003). Por conseguinte, a elevada resistência dos biofilmes tem levado à investigação de estratégias antibacterianas alternativas. A terapia fágica tem sido sugerida como alternativa aos tratamentos químicos, sendo já testada em alguns biofilmes, com resultados promissores (Tait *et al.*, 2002).

1.4. Bacteriófagos

A descoberta dos bacteriófagos gera alguma controvérsia no que respeita a reivindicações da prioridade. Em 1896, Ernest Hanking, bacteriologista britânico, reportou a existência de uma elevada atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* em dois rios da Índia, limitando assim a expansão das epidemias de cólera. Devido a isto, o bacteriologista sugeriu que este fenómeno se devia à presença de uma substância não identificada. Observações similares foram feitas por outros bacteriologistas, porém nenhum deles explorou tal acontecimento. Passados cerca de 20 anos do primeiro relato deste fenómeno, um bacteriologista de Inglaterra, Frederick Twort, reintroduziu o tema devido à observação de um fenómeno similar e lançou a hipótese de este fenómeno ser devido a um vírus. Contudo, devido a dificuldades financeiras não prosseguiu esta descoberta, e só em 1917 Felix d'Herelle, microbiologista do Instituto Pasteur em Paris, descobriu oficialmente os bacteriófagos (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Os bacteriófagos (fagos) são vírus que infetam bactérias sendo específicos para estas, e inofensivos para seres humanos, animais e plantas. Estes são organismos simples e estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, na água e até mesmo no ar (Yele *et al.*, 2012). Segundo vários autores, estima-se que existam cerca de 10 fagos diferentes para cada célula bacteriana (Azeredo e Sutherland, 2008, Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004).

Os fagos podem ser divididos em dois tipos, os fagos virulentos e os fagos temperados, que apresentam ciclos lítico e lisogénico (Figura 1.4). Os fagos virulentos causam a lise das células para libertar as partículas de vírus recentemente formadas. Por sua vez, os fagos temperados integram o seu ácido nucleico no genoma da bactéria ou formam um replicão circular no citoplasma da bactéria, sem que ocorra morte celular. O material genético do fago (conhecido como profago) pode ser transmitido para as células filhas em cada divisão celular subsequente (Sillankorva *et al.*, 2012).

Como todos os vírus, os fagos não têm metabolismo próprio, logo necessitam do metabolismo do hospedeiro, bem como dos recursos energéticos e materiais para se replicarem (Withey *et al.*, 2005). Devido a estas características, os fagos com ciclo lítico são candidatos para utilização em terapia antibacteriana (Azeredo e Sutherland, 2008).

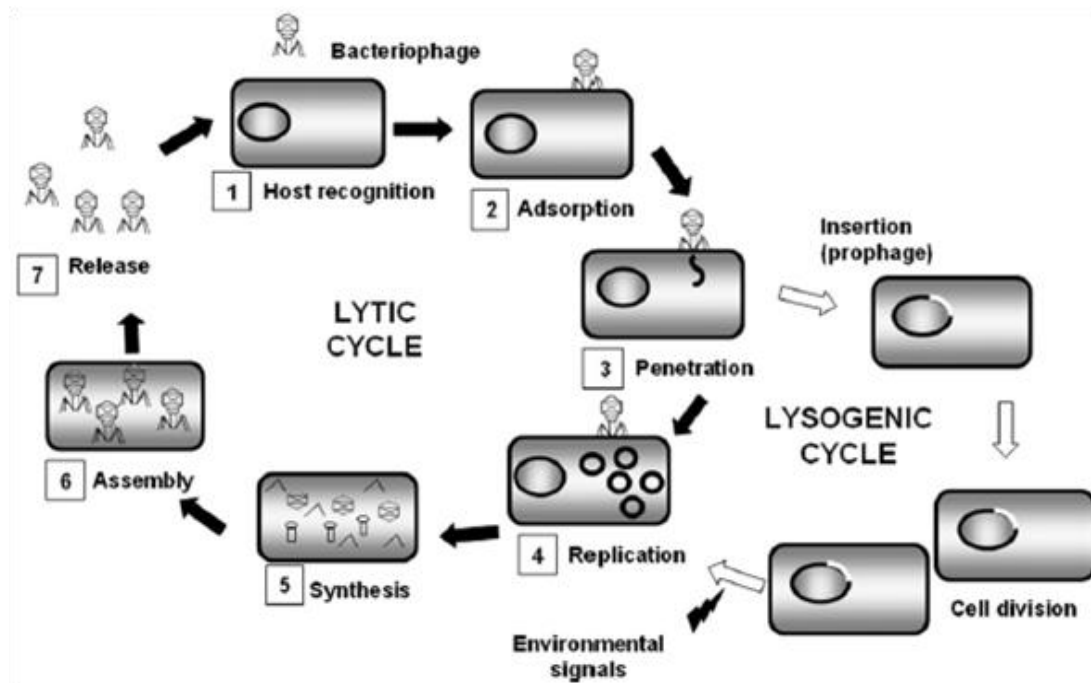


Figura 1.4 - Representação dos ciclos lítico e lisogénico (adaptado de García *et al.* (2010)).

1.4.1. Classificação e replicação dos fagos *Caudovirales*

Os fagos são classificados pelo Comité Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV – segundo a sua morfologia e o tipo de ácido nucleico que possuem, podendo este ser dsDNA, ssDNA, dsRNA e ssRNA. Atualmente este comité reconhece 7 ordens diferentes de vírus. De acordo com a literatura, 96% de todos os fagos isolados pertencem à ordem *Caudovirales* que possui 3 famílias com morfologias distintas (Tabela 1.1), 5 subfamílias e 38 géneros de fagos.

Tabela 1.1- Classificação ICTV dos fagos (adaptado de Mc Grath e van Sideren (2007)).

Família	Morfologia	Ácido Nucleico
<i>Myoviridae</i>	Sem envelope, cauda contrátil	dsDNA linear
<i>Siphoviridae</i>	Sem envelope, cauda longa não contrátil	dsDNA linear
<i>Podoviridae</i>	Sem envelope, cauda curta não contrátil	dsDNA linear

Os fagos da ordem *Caudovirales* são constituídos por uma cápside icosaédrica, no interior da qual se encontra o material genético (DNA de cadeia dupla), e uma cauda (Figura 1.5).

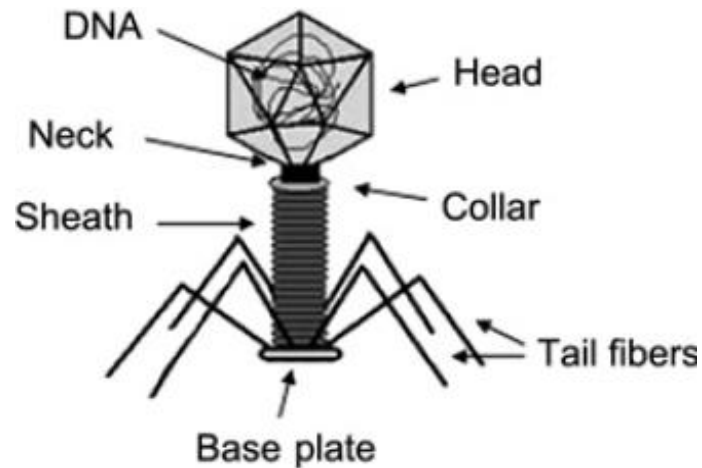


Figura 1.5 - Representação de um fago (retirado de García *et al.* (2010)).

Estas três famílias de fagos devem-se ao tipo de cauda que apresentam, podendo ter: cauda longa não contrátil (*Siphoviridae*), cauda extremamente curta (*Podoviridae*) e cauda contrátil (*Myoviridae*) (Figura 1.6) (Azeredo e Sutherland, 2008).

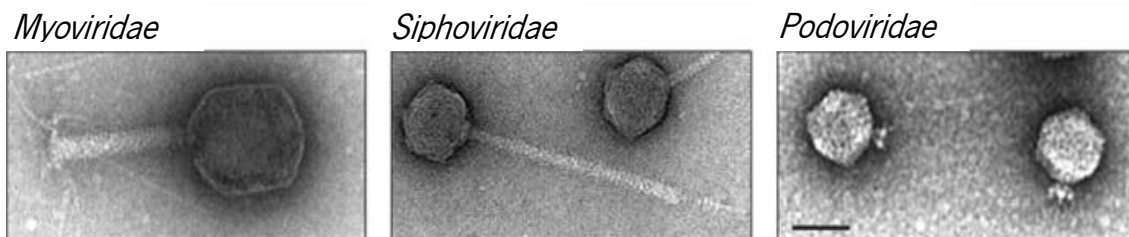


Figura 1.6 - Representação das três diferentes famílias da ordem *Caudovirales*. Adaptado de Krupovic *et al.* (2011)).

1.4.2. Terapia fágica

A resistência dos microrganismos patogênicos à maioria dos agentes antimicrobianos é um problema crescente e crítico na medicina em todo o mundo (Sulakvelidze *et al.*, 2001), tendo talvez a prescrição indiscriminada de antibióticos contribuído para isto. Os antibióticos são usados para combater infecções, contudo quando o número de microrganismos resistentes é elevado o suficiente para manter a infecção ativa, esta vai persistir. O uso de antibióticos pode-se

tornar dispendioso e infrutífero devido ao crescente número de bactérias multirresistentes (e consequentemente diminuição na descoberta de novos antibióticos), bem como à elevada resistência das células quando presentes em biofilmes. Posto isto, é necessário o desenvolvimento de um método alternativo para combater a resistência bacteriana. A terapia fágica tem gerado interesse como alternativa aos agentes químicos no combate de infeções causadas por microrganismos patogénicos (Tait *et al.*, 2002, Santos *et al.*, 2010).

As características dos fagos como: elevada especificidade, inócuos para humanos e animais, fácil produção e manipulação, e rápida modificação para combater a manifestação de novas ameaças bacterianas, contribuíram para o interesse terapêutico sobre estas partículas. Outra característica importante dos fagos é o facto de estes apenas se replicarem nos locais onde há infeção, sendo que só existem enquanto o seu hospedeiro permanecer no local (Azeredo e Sutherland, 2008). Adicionalmente, bactérias que adquirem resistência a determinados fagos, são ainda suscetíveis a outros fagos.

Perepanova *et al.* (1995) investigaram a eficácia da terapia fágica em casos de infeção urinária, e aplicaram preparados de fagos em 46 pacientes, com inflamação urogenital aguda e crónica, por via tópica ou por via oral. Em 84% a terapia teve sucesso, provando assim ser efetiva e segura no tratamento deste tipo de infeções.

1.4.3. O desafio da ação dos fagos nos biofilmes

A utilização de fagos virulentos no controlo de biofilmes pode ser uma alternativa eficaz (Sillankorva *et al.*, 2004, Sillankorva *et al.*, 2012, Hughes *et al.*, 1998, Tait *et al.*, 2002). Nos biofilmes as células encontram-se mais próximas umas das outras, quando comparadas com as células planctónicas, logo seria de esperar que a replicação do fago pudesse ser favorecida (Wiggins e Alexander, 1985). Contudo a estrutura e composição do biofilme, assim como a fisiologia das células do biofilme, podem impor algumas limitações à infeção fágica. Por exemplo, a matriz do biofilme pode ser um grande obstáculo à penetração do fago (Azeredo e Sutherland, 2008). No entanto, existe divergência quanto à redução de biomassa ser ou não dependente da barreira de difusão imposta pela matriz. Autores como Sillankorva *et al.* (2004) e Cerca *et al.* (2007), concluíram que a taxa de redução da biomassa não era dependente desta barreira, tendo observado reduções de biomassa equivalentes em biofilmes e culturas planctónicas em diferentes estados fisiológicos. Por outro lado, Melo (2014) mostrou no seu estudo que a matriz dificulta a interação entre o fago e o biofilme, limitando a eficácia fágica.

Até à data a informação sobre fagos *P. mirabilis* é escassa, sendo encontradas referências a fagos de *Proteus* estudados na década de 70 (Hickman e Farmer, 1976, Schmidt e Jeffries, 1974, Coetzee e Smit, 1970). Na literatura recente é encontrada a referência a um fago, contudo este não é específico apenas para a espécie *P. mirabilis*, sendo também eficaz contra a bactéria *E. coli*, e daí ser denominado de fago coli-proteus. De facto esta é uma limitação importante para este fago, pois estirpes de *E. coli* comensais são muito comuns na flora intestinal humana. Segundo o autor, este fago coli-proteus foi isolado a partir de uma preparação comercial de fagos (Carson *et al.*, 2010).

1.5. Referências

- ANDREWS, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 48 Suppl 1, 5-16.
- ARAGON, L. M., MIRELIS, B., MIRO, E., MATA, C., GOMEZ, L., RIVERA, A., COLL, P. & NAVARRO, F. 2008. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 61, 1029-32.
- AZEREDO, J. & SUTHERLAND, I. W. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol*, 9, 261-6.
- BEHLAU, I. & GILMORE, M. S. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch Ophthalmol*, 126, 1572-81.
- BROOKS, T. & KEEVIL, C. W. 1997. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 24, 203-6.
- CARSON, L., GORMAN, S. P. & GILMORE, B. F. 2010. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 447-455.
- CERCA, N., OLIVEIRA, R. & AZEREDO, J. 2007. Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells and biofilms to the lytic action of *staphylococcus* bacteriophage K. *Lett Appl Microbiol*, 45, 313-7.
- CERI, H., OLSON, M. E., STREMICK, C., READ, R. R., MORCK, D. & BURET, A. 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37, 1771-6.
- CHIBANI-CHENNOUFI, S., BRUTTIN, A., DILLMANN, M. L. & BRUSSOW, H. 2004. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J Bacteriol*, 186, 3677-86.
- COETZEE, J. N. & SMIT, J. A. 1970. Properties of *Proteus mirabilis* phage 13vir. *J Gen Virol*, 9, 247-9.
- COKER, C., POORE, C. A., LI, X. & MOBLEY, H. L. 2000. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect*, 2, 1497-505.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.

- DAVEY, M. E. & O'TOOLE G, A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 847-67.
- DONLAN, R. M. 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*, 7, 277-81.
- DRENKARD, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 5, 1213-9.
- EHRlich, G. D., STOODLEY, P., KATHJU, S., ZHAO, Y., MCLEOD, B. R., BALABAN, N., HU, F. Z., SOTEREANOS, N. G., COSTERTON, J. W., STEWART, P. S., POST, J. C. & LIN, Q. 2005. Engineering approaches for the detection and control of orthopaedic biofilm infections. *Clin Orthop Relat Res*, 59-66.
- FRANZ, M. & HORL, W. H. 1999. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. II: clinical management. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 2754-62.
- FUQUA, C., PARSEK, M. R. & GREENBERG, E. P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet*, 35, 439-68.
- FUX, C. A., COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & STOODLEY, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13, 34-40.
- FUX, C. A., STOODLEY, P., HALL-STOODLEY, L. & COSTERTON, J. W. 2003. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1, 667-83.
- GARCÍA, P., RODRÍGUEZ, L., RODRÍGUEZ, A. & MARTÍNEZ, B. 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 373-382.
- HA, U. S. & CHO, Y.-H. 2006. Catheter-associated urinary tract infections: new aspects of novel urinary catheters. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 485-490.
- HALL-STOODLEY, L. & STOODLEY, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*, 11, 1034-43.
- HICKMAN, F. W. & FARMER, J. J., 3RD 1976. Differentiation of *Proteus mirabilis* by bacteriophage typing and the Dienes reaction. *J Clin Microbiol*, 3, 350-8.
- HOIBY, N., CIOFU, O., JOHANSEN, H. K., SONG, Z. J., MOSER, C., JENSEN, P. O., MOLIN, S., GIVSKOV, M., TOLKER-NIELSEN, T. & BJARNSHOLT, T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci*, 3, 55-65.
- HOOTON, T. M., BRADLEY, S. F., CARDENAS, D. D., COLGAN, R., GEERLINGS, S. E., RICE, J. C., SAINT, S., SCHAEFFER, A. J., TAMBAYH, P. A., TENKE, P. & NICOLLE, L. E. 2010. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 50, 625-63.
- HUGHES, K. A., SUTHERLAND, I. W., CLARK, J. & JONES, M. V. 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases—novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol*, 85, 583-90.
- JACOBSEN, S. M. & SHIRTLIFF, M. E. 2011. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*, 2, 460-5.

- JACOBSEN, S. M., STICKLER, D. J., MOBLEY, H. L. & SHIRTLIFF, M. E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*, 21, 26-59.
- JAIN, P., PARADA, J. P., DAVID, A. & SMITH, L. G. 1995. Overuse of the indwelling urinary tract catheter in hospitalized medical patients. *Arch Intern Med*, 155, 1425-9.
- JANSEN, I. A., HOPMANS, T. E., WILLE, J. C., VAN DEN BROEK, P. J., VAN DER KOOI, T. I. & VAN BENTHEM, B. H. 2012. Appropriate use of indwelling urethra catheters in hospitalized patients: results of a multicentre prevalence study. *BMC Urol*, 12, 25.
- JONES, B. D. & MOBLEY, H. L. 1987. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect Immun*, 55, 2198-203.
- JUNQUERA, S., LOZA, E. & BAQUERO, F. 2005. Evolución del patrón de sensibilidad de aislados de *Escherichia coli* en urocultivos procedentes del medio hospitalario y extrahospitalario. *TITLEREVISTA*, 23, 197-201.
- KLEVENS, R. M., EDWARDS, J. R., RICHARDS, C. L., JR., HORAN, T. C., GAYNES, R. P., POLLOCK, D. A. & CARDO, D. M. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep*, 122, 160-6.
- KOHLER-OCKMORE, J. & FENELEY, R. C. 1996. Long-term catheterization of the bladder: prevalence and morbidity. *Br J Urol*, 77, 347-51.
- KRUPOVIC, M., PRANGISHVILI, D., HENDRIX, R. W. & BAMFORD, D. H. 2011. Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75, 610-35.
- LANE, M. C., ALTERI, C. J., SMITH, S. N. & MOBLEY, H. L. 2007. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 16669-74.
- LEE, J. B. L. & NEILD, G. H. 2007. Urinary tract infection. *Medicine*, 35, 423-428.
- LEONE, M., GARNIER, F., AVIDAN, M. & MARTIN, C. 2004. Catheter-associated urinary tract infections in intensive care units. *Microbes and Infection*, 6, 1026-1032.
- LUZZARO, F., PERILLI, M., AMICOSANTE, G., LOMBARDI, G., BELLONI, R., ZOLLO, A., BIANCHI, C. & TONIOLO, A. 2001. Properties of multidrug-resistant, ESBL-producing *Proteus mirabilis* isolates and possible role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 131-135.
- MC GRATH, S. & VAN SIDEREN, D. 2007. Bacteriophage: genetics and molecular biology. *Caister Academic Press*, 3 - 343.
- MCLEAN, R. J., LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R. & CALDWELL, D. E. 1991. *Proteus mirabilis* biofilm protection against struvite crystal dissolution and its implications in struvite urolithiasis. *J Urol*, 146, 1138-42.
- MELO, L. D. 2014. *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages: New insights on endolysins and phage-biofilm interactions. Doctoral Dissertation, University of Minho.
- MOBLEY, H. L. & WARREN, J. W. 1987. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J Clin Microbiol*, 25, 2216-7.

- MOLIN, S. & TOLKER-NIELSEN, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol*, 14, 255-61.
- MOURA, A., NICOLAU, A., HOOTON, T. & AZEREDO, J. 2009. Antibiotherapy and pathogenesis of uncomplicated UTI: difficult relationships. *J Appl Microbiol*, 106, 1779-91.
- NEWMAN, D. K. & WILLSON, M. M. 2011. Review of intermittent catheterization and current best practices. *Urol Nurs*, 31, 12-28, 48; quiz 29.
- O'HARA, C. M., BRENNER, F. W. & MILLER, J. M. 2000. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev*, 13, 534-46.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.
- PARSEK, M. R. & GREENBERG, E. P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*, 13, 27-33.
- PASTERNAK, J. 2009. Biofilmes: um inimigo (in)visível. *SBCC*, 36-38.
- PEREPANOVA, T. S., DARBEEVA, O. S., KOTLIAROVA, G. A., KONDRAT'EVA, E. M., MAISKAIA, L. M., MALYSHEVA, V. F., BAIGUZINA, F. A. & GRISHKOVA, N. V. 1995. [The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic diseases]. *Urol Nefrol (Mosk)*, 14-7.
- PRAKASH, D., VEEREGOWDA, B. M. & KRISHNAPPA, G. 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Current Science*, 85, 1299-1306.
- RAMOS, J. G. L., MARTINS-COSTA, S. H., BARROS, E. & MACHADO, A. 2006. *Antimicrobianos em Ginecologia e Obstetrícia: Consulta rápida*, Artmed Editora.
- RODRIGUES, F. J. & BARROSO, A. P. 2011. Etiologia e sensibilidade bacteriana em infecções do tracto urinário. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 29, 123-131.
- ROMLING, U. & BALSALOBRE, C. 2012. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med*, 272, 541-61.
- ROZALSKI, A., SIDORCZYK, Z. & KOTELKO, K. 1997. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 65-89.
- SAITO, R., SATO, K., KUMITA, W., INAMI, N., NISHIYAMA, H., OKAMURA, N., MORIYA, K. & KOIKE, K. 2006. Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*, 58, 673-7.
- SANTOS, S. B., FERNANDES, E., CARVALHO, C. M., SILLANKORVA, S., KRYLOV, V. N., PLETENEVA, E. A., SHABUROVA, O. V., NICOLAU, A., FERREIRA, E. C. & AZEREDO, J. 2010. Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol*, 76, 7338-42.
- SCHMIDT, W. C. & JEFFRIES, C. D. 1974. Bacteriophage typing of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Proteus morganii*. *Appl Microbiol*, 27, 47-53.
- SCHOLES, D., HOOTON, T. M., ROBERTS, P. L., STAPLETON, A. E., GUPTA, K. & STAMM, W. E. 2000. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J Infect Dis*, 182, 1177-82.

- SEADOR, J. & MULHOLLAND, S. G. 1999. Hospital-acquired urinary tract infections associated with the indwelling catheter. *Urol Clin North Am*, 26, 821-8.
- SHEERIN, N. S. 2011. Urinary tract infection. *Medicine*, 39, 384-389.
- SILLANKORVA, S., OLIVEIRA, R., VIEIRA, M. J., SUTHERLAND, I. W. & AZEREDO, J. 2004. Bacteriophage Phi S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling*, 20, 133-8.
- SILLANKORVA, S. M., OLIVEIRA, H. & AZEREDO, J. 2012. Bacteriophages and Their Role in Food Safety. *International Journal of Microbiology*, 2012, 13.
- SOSA, V., SCHLAPP, G. & ZUNINO, P. 2006. *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiology*, 152, 2149-57.
- STAMM, W. E. 1991. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. *Am J Med*, 91, 65S-71S.
- STEWART, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 292, 107-13.
- STEWART, P. S. & COSTERTON, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-8.
- STICKLER, D., GANDERTON, L., KING, J., NETTLETON, J. & WINTERS, C. 1993. *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urol Res*, 21, 407-11.
- STICKLER, D. & HUGHES, G. 1999. Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18, 206-8.
- STICKLER, D. J. 2008. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol*, 5, 598-608.
- STICKLER, D. J., LEAR, J. C., MORRIS, N. S., MACLEOD, S. M., DOWNER, A., CADD, D. H. & FEAST, W. J. 2006. Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. *J Appl Microbiol*, 100, 1028-33.
- STICKLER, D. J. & MORGAN, S. D. 2008. Observations on the development of the crystalline bacterial biofilms that encrust and block Foley catheters. *J Hosp Infect*, 69, 350-60.
- STICKLER, D. J. & ZIMAKOFF, J. 1994. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long-term bladder management. *J Hosp Infect*, 28, 177-94.
- SULAKVELIDZE, A., ALAVIDZE, Z. & MORRIS, J. G., JR. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 649-59.
- TAIT, K., SKILLMAN, L. C. & SUTHERLAND, I. W. 2002. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*, 18, 305-311.
- TENOVER, F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*, 34, S3-10; discussion S64-73.
- WACHINO, J., YAMANE, K., SHIBAYAMA, K., KUROKAWA, H., SHIBATA, N., SUZUKI, S., DOI, Y., KIMURA, K., IKE, Y. & ARAKAWA, Y. 2006. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 178-84.

- WIGGINS, B. A. & ALEXANDER, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 49, 19-23.
- WITHEY, S., CARTMELL, E., AVERY, L. M. & STEPHENSON, T. 2005. Bacteriophages–potential for application in wastewater treatment processes. *Sci Total Environ*, 339, 1-18.
- YELE, A. B., THAWAL, N. D., SAHU, P. K. & CHOPADE, B. A. 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. *Arch Virol*, 157, 1441-50.

Capítulo 2

Caracterização dos bacteriófagos

Capítulo 2 – Caracterização dos bacteriófagos

A caracterização de novos fagos é essencial, não só para prever o comportamento do fago aquando da infeção da bactéria, mas também para garantir a segurança de uma potencial terapia. Neste sentido, o principal objetivo deste capítulo foi a caracterização de fagos de *Proteus* em termos do seu crescimento e multiplicação, das proteínas que os constituem, a sua adesão a superfícies e ainda a sua resistência a um método mecânico de remoção de partículas aderidas.

2.1. Materiais e métodos

2.1.1. Microrganismos e fagos

Neste estudo utilizaram-se duas estirpes de coleção de *Proteus mirabilis*, SGSC 5460 e SGSC 5461 (Salmonella genetic stock centre – SGSC). As bactérias foram cultivadas em meio líquido Caldo de Soja Triptica (do inglês Tryptic Soy Broth – TSB) da Liofilchem, e também em placas de Petri contendo meio sólido TSB com 1,5% (p/v) de agar (Liofilchem) – TSA. Os meios foram preparados de acordo com as indicações do fabricante, e esterilizados por autoclavagem (15 minutos, 121°C).

Os fagos de *P. mirabilis* utilizados ao longo deste estudo foram os vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, os quais foram previamente isolados de efluente da ETAR (Frossos, Braga) e identificados quanto à sua família.

2.1.2. Curva de calibração densidade ótica vs células viáveis

Em todos os processos que envolvem infeção fágica foi necessário saber o número de células viáveis para assim determinar a multiplicidade de infeção (do inglês *Multiplicity of Infection* - MOI), não sendo esta mais do que a razão entre a concentração de fagos e a concentração bacteriana. Posto isto, foi necessário fazer uma curva de calibração entre a Densidade Ótica (DO_{620nm}) e o número de células viáveis (Anexo I, Figura A1).

Foram preparadas suspensões com diferentes concentrações (valores de DO_{620nm} entre 0,1 e 1), as quais foram diluídas em NaCl (0,9% (p/v)) plaqueadas em triplicado e incubadas *overnight* à temperatura ambiente, para evitar o crescimento exagerado das colónias e *swarming*

típico da bactéria *P. mirabilis*. No dia seguinte foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colónias (do inglês *Colony Forming Units* - CFU's) através da equação:

$$\text{Concentração da amostra (CFU's/ml)} = \frac{\text{CFU por placa} \times \text{fator de diluição}}{\text{Volume de amostra plaqueado (ml)}}$$

2.1.3. Produção de fagos

A produção de fagos teve por base a técnica descrita por Pires *et al.* (2011), com algumas modificações. Os inóculos dos respetivos hospedeiros foram incubados a 37°C, 120 rpm, até atingir uma DO_{620nm} 1×10^9 CFU/ml. Após o período de incubação fez-se uma sementeira em placas de Petri contendo meio sólido TSA nas quais se colocou 100 µl do respetivo inóculo e adicionou-se cerca de 2 a 3 ml de TSB top-agar com 0,6% de agar (líquido a 45°C). Deixou-se solidificar o top-agar, adicionou-se 20 µl de fago ao centro da placa e espalhou-se por toda a placa com a ajuda de tiras de papel estéreis, de forma a obter o máximo de cobertura possível pelos fagos. Por fim, colocou-se a incubar a 37°C *overnight*.

Terminado o período de incubação adicionou-se cerca de 3 ml de tampão SM com gelatina (5,8 g/l de NaCl [Nzytech]; 2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Panreac]; 50 ml/l de Tris-HCl 1 M, pH 7,5 [Biorad]; 5 ml/l de gelatina a 2% (p/v) [Sigma]) a cada placa. Colocaram-se as placas a 4°C sob agitação lenta (80 rpm) durante 5 horas para ocorrer eluição do fago para a fase líquida. Cessado este tempo, recolheu-se todo o líquido e também a camada de top-agar para tubos falcon de 50 ml. De seguida centrifugaram-se os falcons a $7500 \times g$ (Sigma 3-16k) durante 10 minutos a 4°C e recolheu-se e filtrou-se (0,22 µm, VWR International) o sobrenadante.

2.1.3.1. Título dos fagos – Unidades formadoras de placas

Para a contagem de unidades formadoras de placas (do inglês *Plaque Forming Units* - PFU's) utilizou-se a técnica descrita por Sambrook e Russell (2001). Para isso foi necessário proceder a diluições sucessivas da solução fágica, 1:10 em tampão SM sem gelatina. De seguida pipetaram-se 100 µl de hospedeiro para a placa de TSA e adicionaram-se 100 µl da respetiva diluição do fago. Por fim verteram-se 2 a 3 ml de TSB top-agar, agitou-se muito bem para homogeneizar, deixou-se secar e colocou-se a incubar *overnight* a 37°C. No dia seguinte contaram-se os PFU's na diluição mais adequada (30-300 PFU's), sendo de seguida aplicada a equação (indicada abaixo) para a obtenção do título do fago.

$$\text{Concentração da amostra (PFU's/ml)} = \frac{\text{PFU por placa} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado (ml)}}$$

2.1.3.2. Purificação e concentração dos fagos

O procedimento a seguir descrito teve como objetivo aumentar o título de fago. Por cada 10 ml de fago adicionou-se 0,584 g de NaCl, ficando posteriormente a solução 1 hora a 4°C com agitação lenta (80 rpm). Terminado este período, centrifugou-se a solução a 4°C, 10000 × g durante 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 g de polietilenoglicol (PEG 8000, Fisher) por cada 10 ml de sobrenadante (Sambrook e Russell, 2001). Colocou-se novamente a solução a 4°C *overnight* com agitação lenta (80 rpm). Posteriormente centrifugou-se a solução a cerca de 13000 × g durante 10 minutos, rejeitou-se o sobrenadante, e ao precipitado adicionou-se tampão SM (entre 5 a 10 ml dependendo da quantidade de precipitado). Após homogeneização, adicionou-se clorofórmio na proporção 1:4 (v/v), homogeneizou-se e centrifugou-se a 3500 × g, durante 15 minutos a 4°C. Depois da centrifugação obtiveram-se 3 fases distintas: clorofórmio, fase orgânica que contém por exemplo restos celulares e a fase aquosa de interesse que contém fago puro. Separou-se a fase aquosa de interesse e filtrou-se a mesma com ajuda de uma seringa e filtros de PES com poro 0,22 µm. Por fim procedeu-se à determinação do título dos fagos como descrito acima.

2.1.4. Espectro lítico dos fagos

De forma a verificar qual a abrangência e especificidade dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 determinaram-se os seus espectros líticos. Para esta determinação utilizaram-se várias espécies de *P. mirabilis*: SGSC 5460, SGSC 5461, CECT 4168, SGSC 5450, SGSC 5447, SGSC 5448, SGSC 3360, CECT 4101, 933, SGSC 5449, SGSC 5446, SGSC 5445. Para avaliar a especificidade dos fagos, foram incluídas outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* tais como: *Enterobacter aerogenes* CECT 684; *Enterobacter sakazakii* ATCC 29544; *Salmonella typhimurium* LT2; *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; *Klebsiella pneumoniae* SGSC 5924; *Escherichia coli* CECT 515; *Escherichia coli* CECT 434; *Escherichia coli* Ec7, Ec8 e Ec9 (isolados clínicos); *Escherichia hermannii* SGSC 5715; *Morganella morganii* SGSC 5703; *Morganella* V 025; *Citrobacter freundii* SGS 5345; *Citrobacter* C.K. 1162.

Para tal fizeram-se inóculos de todas as bactérias com colónias frescas, colocaram-se 100 µl de suspensão bacteriana na respetiva placa, adicionou-se 1 ml TSB top-agar com 0,6%

de agar, a 45°C para melhor espalhar e homogeneizar e deixou-se secar. Depois de todas as placas estarem bem secas colocou-se uma gota de cada fago (vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461) a uma concentração de 10⁸ PFU/ml nas placas, deixou-se secar muito bem e colocou-se a incubar a 37°C *overnight*. No dia seguinte verificou-se a presença ou não de halo de inibição de crescimento. Este procedimento foi repetido mais uma vez para esta concentração fágica.

2.1.5. Curva de crescimento dos fagos

Para as curvas de crescimento (do inglês *One Step Growth Curve* – OSGC) seguiu-se o procedimento descrito por Rahman *et al.* (2011), com pequenas modificações. Foram preparados pré-inóculos dos hospedeiros *P. mirabilis* SGSC 5460 e SGSC 5461 que foram usados (1 ml) para inocular 15 ml de meio TSB fresco. Deixou-se crescer até uma DO_{620nm} de 0,4 - 0,5. De seguida centrifugou-se 10 ml da suspensão a 4°C, 7000 × g durante 5 minutos, ressuspendeu-se o precipitado em 5 ml de meio fresco (para obter uma DO_{620nm} de aproximadamente 1) e adicionou-se 5 ml de solução fágica diluída (10⁶ PFU/ml) de forma a obter uma MOI de 0,005. Deixou-se o fago adsorver durante 5 minutos, centrifugou-se durante 5 minutos (7000 × g, 4°C) e ressuspendeu-se o precipitado em 10 ml de meio TSB fresco. Posteriormente recolheram-se amostras de 5 em 5 minutos até aos 30 minutos, e de 10 em 10 até aos 60 minutos. Por fim procedeu-se à determinação do título do fago como descrito no ponto 2.1.3.1.

2.1.6. Proteínas estruturais dos fagos

Uma vez que o trabalho envolve a utilização de dois novos fagos, foi feita a comparação do perfil proteico de ambos de forma a inferir a sua semelhança. Assim sendo, procedeu-se à extração e determinação da concentração de proteínas estruturais, e à eletroforese em condições desnaturantes.

2.1.6.1. Extração das proteínas estruturais dos fagos

Para a extração das proteínas colocaram-se 500 µl de fago concentrado (> 10⁹ PFU/ml) ou 2 ml de fago menos concentrado (< 10⁹ PFU/ml) num tubo falcon de 15 ml. De seguida, adicionaram-se 4 volumes de acetona gelada a cada um dos fagos. Vortexou-se e centrifugou-se durante 20 minutos a 4°C, 1600 × g. Depois da centrifugação descartou-se o sobrenadante,

escorreu-se muito bem todo o líquido e deixaram-se os precipitados a secar *overnight* (O'Flaherty *et al.*, 2004). No dia seguinte ressuspenderam-se os precipitados num volume adequado de água ou adicionou-se diretamente tampão de aplicação (*premixed Laemmli sample buffer* [Biorad] e β -mercaptoetanol [Sigma]) a cada amostra e colocaram-se a incubar durante 5 minutos a 100°C para desnaturar as proteínas. Posteriormente colocaram-se as amostras em gelo para arrefecer.

2.1.6.2. Determinação da concentração de proteínas nos fagos

Para a determinação da concentração de proteínas estruturais dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 seguiu-se o protocolo descrito no *kit BCA Protein Assay* da Thermo Scientific de acordo com as instruções dos fabricantes. Para inferir a concentração de proteína foi feita uma reta de calibração DO_{562nm} vs concentração de proteína, utilizando soluções padrão de albumina sérica bovina - BSA (Bovine Serum Albumin) a diferentes concentrações (Anexo I, Figura A2).

2.1.6.3. Eletroforese de proteínas – SDS PAGE e coloração dos géis

Para a execução da eletroforese de proteínas em condições desnaturantes, comumente conhecida por SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), usou-se a técnica descrita por Schagger e von Jagow (1987), com algumas modificações. Utilizou-se um gel de gradiente (4 a 20% de poliacrilamida, Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Polyacrylamide Gels [Biorad]), o marcador Color Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa [New England Biolabs]) e tampão de eletroforese TGS 1x (Tris-Glycine-SDS Buffer). A corrida foi feita a uma voltagem de 80 V, durante aproximadamente 2 horas.

No fim da corrida, colocou-se o gel durante 30 minutos numa solução de azul de coomassie (0,25% (p/v) de azul de coomassie R 250 [Biorad], 50% (v/v) metanol [Fisher] e 10% (v/v) ácido acético [Fisher]) com agitação constante. Terminado este período, retirou-se a solução anterior e colocou-se uma solução de descoloração (25% (v/v) metanol [Fisher] e 5% (v/v) ácido acético [Fisher]), com agitação constante para remover o corante em excesso. Esta solução foi depois substituída por água destilada, que foi mudada sempre que se encontrava com cor concentrada.

Procedeu-se também à coloração com nitrato de prata do gel corado com azul de coomassie. Para isso foi necessário lavar o gel com solução de lavagem (20% (v/v) de etanol

[Sigma]) durante 20 minutos, retirou-se a solução e adicionou-se o volume necessário de solução de sensibilização (0,02% (p/v) de tiosulfato de sódio [Sigma]), deixou-se estar durante 2 minutos. De seguida descartou-se a solução anterior e lavou-se o gel duas vezes com água desionizada, 1 minuto em cada, retirou-se e adicionou-se a solução de coloração fria (0,2% (p/v) de nitrato de prata [Sigma] e 0,076% (v/v) de formaldeído [Sigma]) e colocou-se a agitar no escuro durante 30 minutos. Terminado este período, removeu-se a solução e mergulhou-se o gel num grande volume de água desionizada durante 1 minuto para que os iões livres fossem retirados. Repetiu-se este passo mais uma vez. Por fim colocou-se um pouco de solução de redução (6% (p/v) de carbonato de sódio [Panreac], 0,0004% (p/v) de tiosulfato de sódio [Sigma] e 0,05% de formaldeído [Sigma]), deixando pouco tempo, descartou-se e adicionou-se 300 ml de nova solução de redução, e deixou-se atuar durante 2 a 5 minutos. Assim que se obteve a intensidade desejada adicionou-se 50 ml de solução de paragem (12% ácido acético [Fisher]) e agitou-se durante 10 minutos.

2.1.7. Resistência dos fagos à sonicação

Para posteriormente se removerem e quantificarem os fagos aderidos aos cupões de silicone, foi necessário otimizar o tempo de sonicação de forma a garantir que o processo de remoção não compromete a viabilidade das partículas fágicas. Para isto colocou-se 1 ml de suspensão fágica vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 (a uma concentração de 10^7 PFU/ml) nos respetivos poços da placa de 24 poços. As suspensões foram depois sujeitas a diferentes tempos de sonicação (5, 10 e 20 segundos) e de amplitude (22 e 25%) no sonicador Sonics Vibra-Cell VC 505 – VC 750. Durante este processo a placa de 24 poços foi mantida em gelo, para evitar o aquecimento das amostras. Terminado o processo de sonicação, determinaram-se os PFU's das amostras como descrito no ponto 2.1.3.1. Todo este procedimento foi feito em duplicado.

2.1.8. Adsorção dos fagos a superfícies de silicone não funcionalizadas

Para este procedimento utilizaram-se cupões de silicone (1 cm²), sendo que para a preparação destes teve-se por base o procedimento descrito por Azevedo *et al.* (2006). Após esterilização (durante 30 minutos a 70°C) colocaram-se os cupões numa placa de 24 poços, e adicionaram-se 1,7 ml de solução fágica. Foram utilizadas diferentes soluções fágicas com as diferentes concentrações (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} PFU/ml) para ambos os fagos

(vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461), de forma a determinar o efeito da concentração no número de fagos adsorvidos. Deixou-se a repousar *overnight* à temperatura ambiente sem agitação e no dia seguinte retiraram-se todos os cupões, lavaram-se com tampão SM e colocaram-se num novo poço.

Posteriormente para a quantificação de fagos adsorvidos aos cupões adicionou-se novamente tampão SM (1,6 ml) e procedeu-se à sonicação, 5 segundos a 22% de amplitude, para cada cupão. Por fim determinaram-se os PFU's como descrito no ponto 2.1.3.1.

2.1.9. Adsorção dos fagos a superfícies de silicone funcionalizadas

Para funcionalizar a superfície do silicone seguiu-se o procedimento descrito por Cademartiri *et al.* (2010). Preparou-se uma solução contendo 15 ml de água destilada estéril, 0,6 ml de ácido acético glacial (Fisher) e 1,053 ml de APTS ((3-aminopropyl) triethoxysilane) (Sigma). Homogeneizou-se a solução, adicionou-se 1 ml a cada cupão de silicone com 1 cm² e deixou-se a repousar *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte lavou-se cada cupão de silicone três vezes em água destilada estéril, escorreram-se muito bem, colocaram-se noutra placa de 24 poços, adicionaram-se as respetivas soluções fágicas e seguiu-se como descrito no ponto anterior (2.1.8).

2.1.10. Libertação dos fagos em urina a 37°C ao longo do tempo em superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas

Foram colocados cupões com 4 cm² em placas de 6 poços. Para os cupões sujeitos a funcionalização, adicionou-se a cada poço 5 ml de solução de funcionalização e deixou-se a repousar. No dia seguinte lavaram-se todos os cupões em água destilada estéril, colocaram-se em novos poços e prepararam-se as soluções fágicas com concentração 10⁸ PFU/ml. Adicionou-se 5 ml da respetiva solução fágica ao respetivo poço e deixou-se a repousar *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte lavaram-se os cupões em tampão SM para retirar os fagos não aderidos, e colocaram-se em novos poços. De seguida adicionaram-se 5 ml de urina suplementada com 0,3% de glucose a cada poço, incluindo um poço com cupão para controlo negativo, e colocou-se a placa a incubar a 37°C sem agitação. Tiram-se 20 µl de cada solução em cada ponto ao longo do tempo (2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas). Posteriormente procedeu-se à contagem dos PFU's como descrito no ponto 2.1.3.1. Para as superfícies não funcionalizadas repetiu-se o procedimento, apenas com a eliminação do passo de funcionalização.

2.2. Resultados e discussão

2.2.1. Espectro lítico dos fagos

Os fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 foram isolados de efluente de ETAR. O seu espectro de ação para isolados e estirpes de referência de *P. mirabilis* foi estudado (Tabela 2.1) e mostra que o fago vB_PmiM_CEB5461 apresenta um espectro lítico mais alargado quando comparado com o fago vB_PmiP_CEB5460, verificando-se halo de inibição em todas as estirpes, o que significa que infeta todas as estirpes de *P. mirabilis* testadas. Por sua vez o fago vB_PmiP_CEB5460 mostra-se menos eficiente, infetando apenas 7 das 12 estirpes testadas.

Tabela 2.1 - Espectro lítico dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461.

Estirpes	Fagos	
	vB_PmiP_CEB5460	vB_PmiM_CEB5461
<i>P. mirabilis</i> 933*	-	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 3360	-	+
<i>P. mirabilis</i> CECT 4101	+	+
<i>P. mirabilis</i> CECT 4168	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5445	-	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5446	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5447	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5448	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5449	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5450	-	+ (T)
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5460	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5461	-	+

T – halo turvo. * Isolado clínico.

Como é visível na Figura 2.1, os fagos apresentam placas fágicas com tamanhos e morfologia muito distintos.

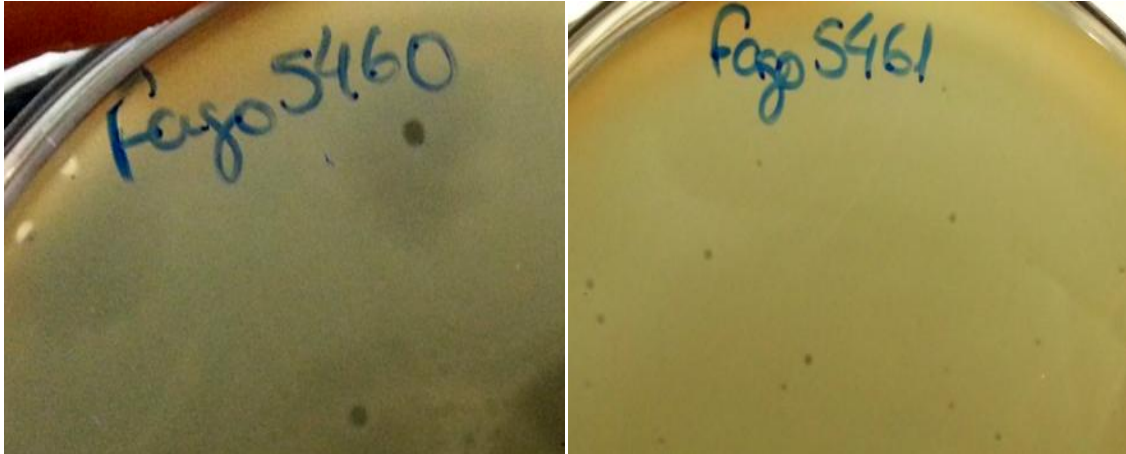


Figura 2.1 - Placas fágicas dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, respetivamente.

O fago vB_PmiP_CEB5460 apresenta grandes e lípidas placas fágicas, por sua vez o fago vB_PmiM_CEB5461 apresenta placas fágicas extremamente pequenas e ligeiramente baças.

De forma a saber se os novos fagos de *Proteus* seriam ou não específicos apenas para esta espécie bacteriana, realizou-se o seu espetro de atividade contra várias outras espécies bacterianas da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 2.2).

Os resultados obtidos mostraram que os dois fagos em estudo apenas atuam em *P. mirabilis*, devido à ausência de halo de inibição nas outras espécies testadas. Assim sendo, segundo a literatura pudemos concluir que ambos os fagos (vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461) são específicos apenas para *Proteus* (Stocker, 1955).

Tabela 2.2 - Espetro de atividade dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 em bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

Estirpes	Fagos	
	vB_PmiP_CEB5460	vB_PmiM_CEB5461
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5460	+	+
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5461	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i> CECT 684	-	-
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 29544	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SGSC 5924	-	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 515	-	-
<i>Escherichia coli</i> CECT 434	-	-
<i>Escherichia coli</i> Ec7*	-	-
<i>Escherichia coli</i> Ec8*	-	-
<i>Escherichia coli</i> Ec9*	-	-
<i>Escherichia hermannii</i> SGSC 5715	-	-
<i>Morganella morgani</i> SGSC 5703	-	-
<i>Morganella</i> V 025	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> SGSC 5345	-	-
<i>Citrobacter</i> C.K. 1162	-	-

* Isolados clínicos

2.2.2. Curva de crescimento dos fagos – OSGC

De forma a avaliar a replicação dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 nos respetivos hospedeiros, fizeram-se curvas de crescimento segundo a metodologia de *one step growth curve* (Rahman *et al.*, 2011). Com base nestas curvas foi possível determinar o período de latência (acumulação intracelular de fagos, seguida da libertação dos primeiros fagos), o período de aumento fágico (libertação exponencial de fagos) e o *burst size*, que não é mais que o número médio de fagos libertados por cada célula infetada, isto é, o número de fagos libertados antes e depois do processo de infeção (Ackermann, 1998, Lee *et al.*, 2014).

Como se pode observar na Figura 2.2, o fago vB_PmiP_CEB5460 tem um período de latência de 10 minutos, um período de aumento fágico de 15 minutos e um *burst size* de 45,7 PFU por bactéria infetada. Períodos de latência pequenos e *burst size* semelhantes foram observados por Kesik-Szeloch *et al.* (2013) em fagos da mesma família. Para além disso, foi também possível observar a existência de dois ciclos de replicação no decorrer dos 60 minutos.

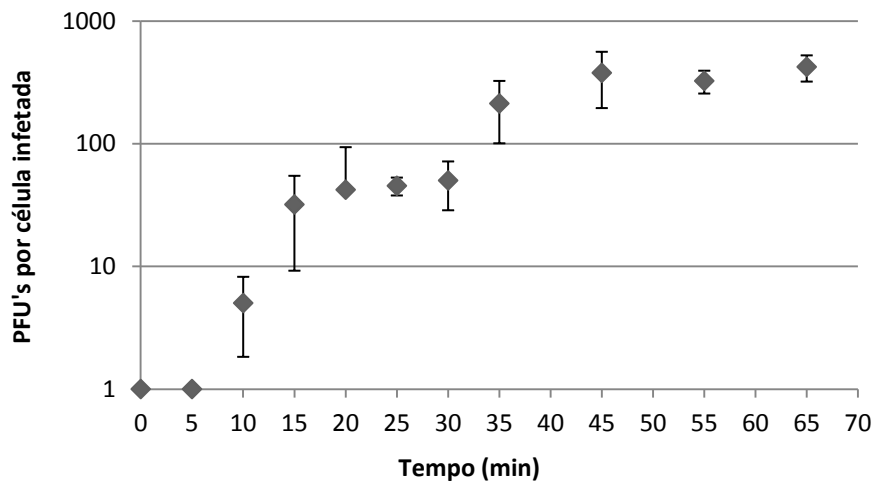


Figura 2.2 - Curva *One Step Growth* para o fago vB_PmiP_CEB5460, com representação do desvio padrão.

Por sua vez, na Figura 2.3 foi observado um período de latência de 25 minutos, um período de aumento fágico de 10 minutos e um *burst size* de 10,88 PFU por célula infetada para o fago vB_PmiM_CEB5461. Também Kesik-Szeloch *et al.* (2013) verificaram que os fagos pertencentes à família *Myoviridae* multiplicavam-se mais lentamente, possuindo também um *burst size* mais pequeno quando em comparação com os da família *Podoviridae*. Também aqui parece existir um segundo ciclo de replicação no decorrer dos 60 minutos do ensaio. De acordo com vários trabalhos, fagos da família *Podoviridae* conseguem no geral reproduzir-se até números muito superiores de *burst size* aos observados com fagos *Myoviridae* devido ao tamanho das partículas virais (Jiang *et al.*, 1998, Kesik-Szeloch *et al.*, 2013).

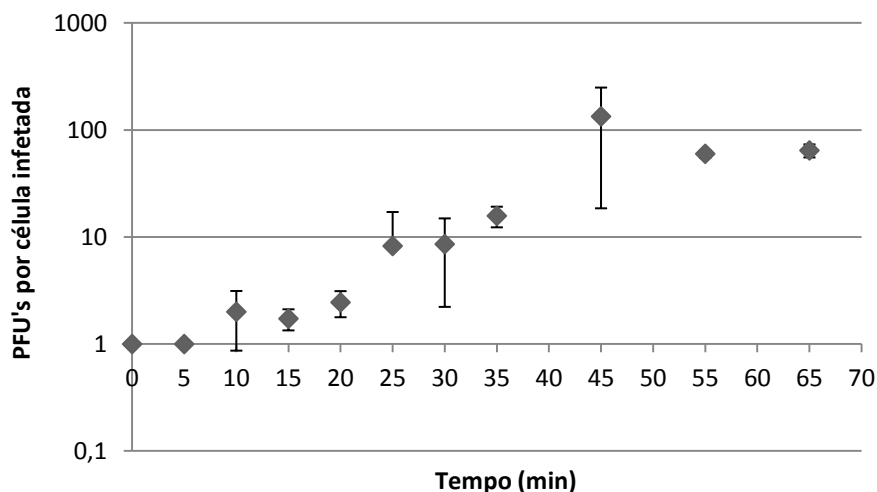


Figura 2.3 - Curva *One Step Growth* para o fago vB_PmiM_CEB5461, com representação do desvio padrão.

Na representação gráfica destas curvas *one steps growth* estão incluídos os 5 minutos de adsorção fágica tal como na representação feita por Melo *et al.* (2014).

2.2.3. Análise das proteínas estruturais dos fagos

As proteínas estruturais dos fagos foram extraídas e quantificadas, sendo que para o fago vB_PmiP_CEB5460 a concentração obtida foi de 339 $\mu\text{g/ml}$ e para o fago vB_PmiM_CEB5461 foi de 730 $\mu\text{g/ml}$ (Anexo I, Figura A2). Após quantificação, as proteínas estruturais foram analisadas por SDS-PAGE, o que permitiu a comparação dos mesmos através da avaliação das diferenças e semelhanças dos seus perfis proteicos (Figura 2.4). Devido às bandas do fago vB_PmiP_CEB5460 se apresentarem menos intensas foi necessário corar o gel também com nitrato de prata (Anexo II, Figura A1).

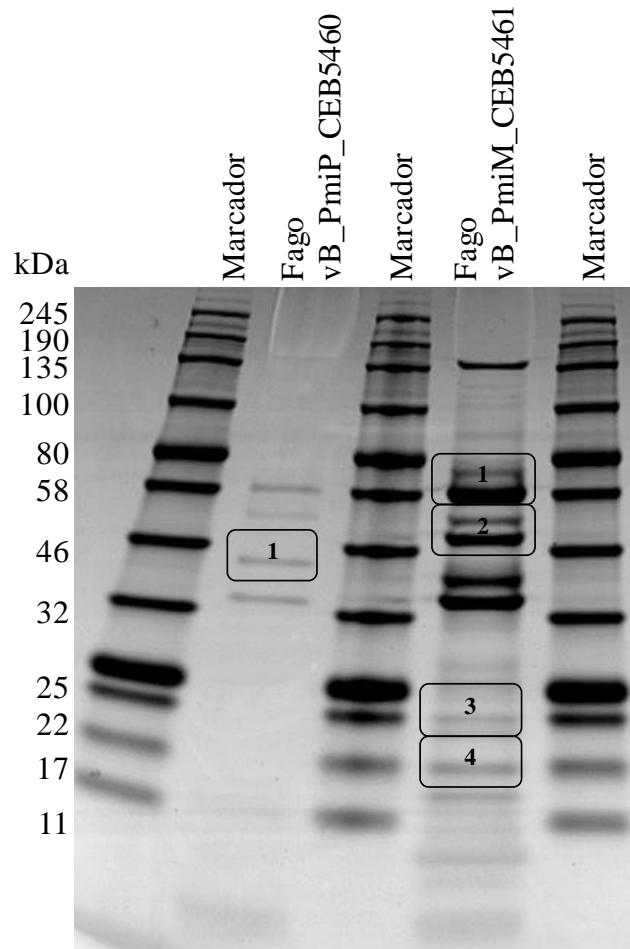


Figura 2.4 - Análise das proteínas estruturais dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 por SDS-PAGE. Coloração foi feita com azul de coomassie.

Na tabela 2.3 encontra-se o peso molecular e a proteína putativa do fago vB_PmiP_CEB5460.

Tabela 2.3 - Proteína putativa do fago vB_PmiP_CEB5460.

Fago vB_PmiP_CEB5460		
Número da banda	Peso molecular (kDa)	Proteína putativa
1	43,8	<i>Major capsid protein</i>

Por sua vez, na Tabela 2.4 encontram-se os pesos moleculares e as proteínas putativas do fago vB_PmiM_CEB5461.

Tabela 2.4 - Proteínas putativas do fago vB_PmiM_CEB5461.

Fago vB_PmiM_CEB5461		
Número da banda	Peso molecular (kDa)	Proteína putativa
1	72,5	<i>Tail sheath</i>
2	55,6	<i>Major capsid protein</i>
3	21,8	<i>Tail completion and sheath stabilizer protein</i>
4	17,8	<i>Head stabilizer protein</i>

Em ambos os fagos são observadas bandas com tonalidade mais acentuada (Figura 2.4), podendo estas corresponder à *major capsid protein* (proteína que compõe maioritariamente a cápside do fago) e à *major tail sheath protein* (proteína que compõe maioritariamente a cauda) (Han *et al.*, 2013).

A análise por SDS-PAGE mostra que os fagos são claramente diferentes. Na realidade os mesmos foram previamente observados por microscopia eletrónica de transmissão e sequenciados, o que permitiu de antemão saber que os fagos eram diferentes e identificar a ordem e família a que pertencem. Assim sendo, os fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, como os próprios nomes indicam, foram classificados como pertencendo à ordem *Caudovirales* e às famílias *Podoviridae* e *Myoviridae*, respetivamente.

2.2.4. Resistência fágica à sonicação

Um dos objetivos deste trabalho foi a avaliação do efeito do revestimento de superfícies com fagos na formação de biofilme, sendo por isso importante quantificar o fago que fica efetivamente ligado à superfície. Porém esta quantificação exige que, após a adsorção, o fago seja removido da superfície sem que a sua viabilidade seja afetada. A remoção por sonicação envolve um processo mecânico extremamente eficiente em que a energia sonora das ondas de ultrassons se propaga num meio líquido, atingindo de forma homogeneia a superfície e causando a libertação de partículas aderidas (Pitt e Ross, 2003, Zips *et al.*, 1990, Joyce *et al.*, 2011). Donatan *et al.* (2009) propuseram a sonicação no seu estudo como sendo um método rápido e fiável na remoção de fagos de superfícies sólidas. Porém, este processo tem que ser otimizado de forma a não comprometer a viabilidade das partículas fágicas e assim permitir uma correta quantificação das partículas fágicas que estavam aderidas.

Posto isto, foram testadas duas amplitudes e vários tempos de sonicação de forma a determinar as condições que menos afetam os fagos (Figuras 2.5 e 2.6). Como se pode observar pela Figura 2.5, o fago vB_PmiP_CEB5460 é pouco afetado pela sonicação após um curto tempo de sonicação (5 segundos) que causou uma redução inferior a 0,3 log no título deste fago. No entanto, a perda de viabilidade acentua-se com o aumento do período de sonicação, e com o aumento da amplitude ($p < 0,05$).

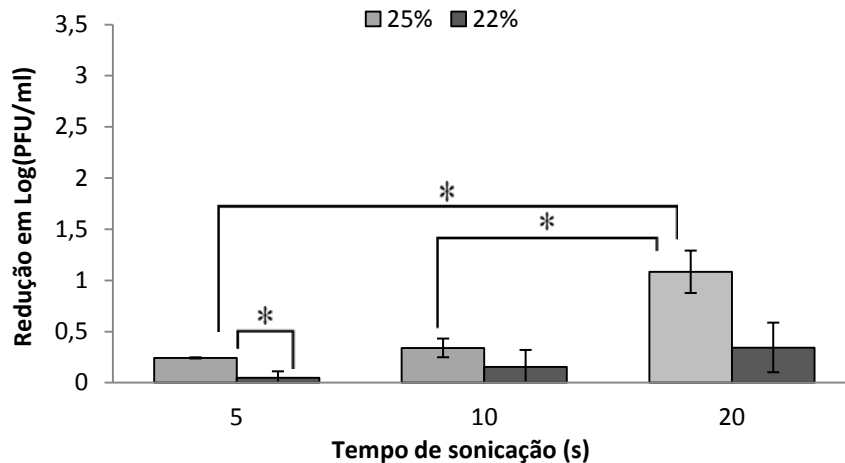


Figura 2.5 - Resistência do fago vB_PmiP_CEB5460 à sonicação. * amostras com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Na Figura 2.6 verifica-se que o fago vB_PmiM_CEB5461 é mais afetado pela sonicação que o fago vB_PmiM_CEB5460 e, mais uma vez, a perda de viabilidade acentua-se com aumento do tempo de sonicação ($p < 0,05$).

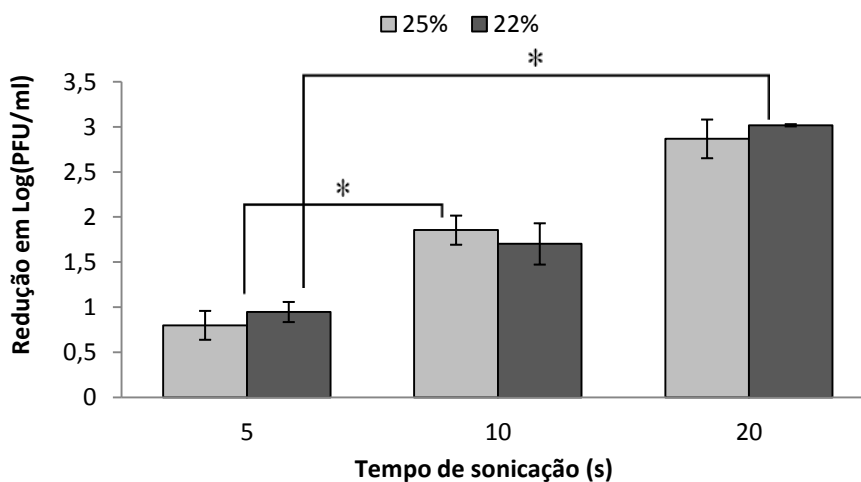


Figura 2.6 - Resistência do fago vB_PmiM_CEB5461 à sonicação. * amostras com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Como se pode observar pelos resultados obtidos, o melhor tempo de sonicação são os 5 segundos, e no geral a melhor amplitude é a de 22% ($p < 0,05$). Para além disso, é possível verificar que o fago vB_PmiM_CEB5461 em comparação com o fago vB_PmiP_CEB5460 é menos resistente à sonicação, sendo que tal facto se pode dever a este ser um fago da família *Myoviridae* ($p < 0,05$). Os fagos desta família possuem um aparelho único, uma cauda longa contrátil, a qual é composta por um tubo interno rígido (Aksyuk *et al.*, 2011). Estas características podem tornar o fago mais suscetível à sonicação, pois a energia aplicada (mesmo sendo baixa) pode quebrar a cauda do fago. Posto isto, poderá haver um pequeno desfasamento entre o resultado obtido para este fago e o número real de fagos aderidos, uma vez que o tempo e amplitude mais baixos podem comprometer a viabilidade de algumas partículas.

2.2.5. Quantificação dos fagos adsorvidos aos diferentes cupões

Após a determinação do melhor tempo e amplitude de sonicação, quantificaram-se os fagos adsorvidos aos diferentes cupões. As superfícies de silicone foram revestidas com partículas fágicas de duas formas diferentes. Na primeira foi feita uma adsorção simples, na qual se deixaram os fagos adsorver *overnight* às superfícies. Na segunda forma, antes da adsorção fágica foi feito um pré-tratamento, *overnight*, das superfícies com APTS, uma solução funcionalizadora de superfícies (Cademartiri *et al.*, 2010). Na Figura 2.7 e 2.8 encontram-se os resultados obtidos em termos de número de fagos adsorvidos nas superfícies de silicone funcionalizadas e não funcionalizada. Como é possível observar na Figura 2.7, o fago vB_PmiP_CEB5460 em superfícies não funcionalizadas adere em média dois logs abaixo da concentração inicial. O comportamento é ligeiramente diferente em relação aos valores com funcionalização. Nestas superfícies é visível uma diferença na adesão, com cerca de 3 logs abaixo da concentração inicial. Assim sendo, os resultados indicam que a funcionalização da superfície de silicone não parece traduzir-se num ganho em termos de número de fagos vB_PmiP_CEB5460 adsorvidos.

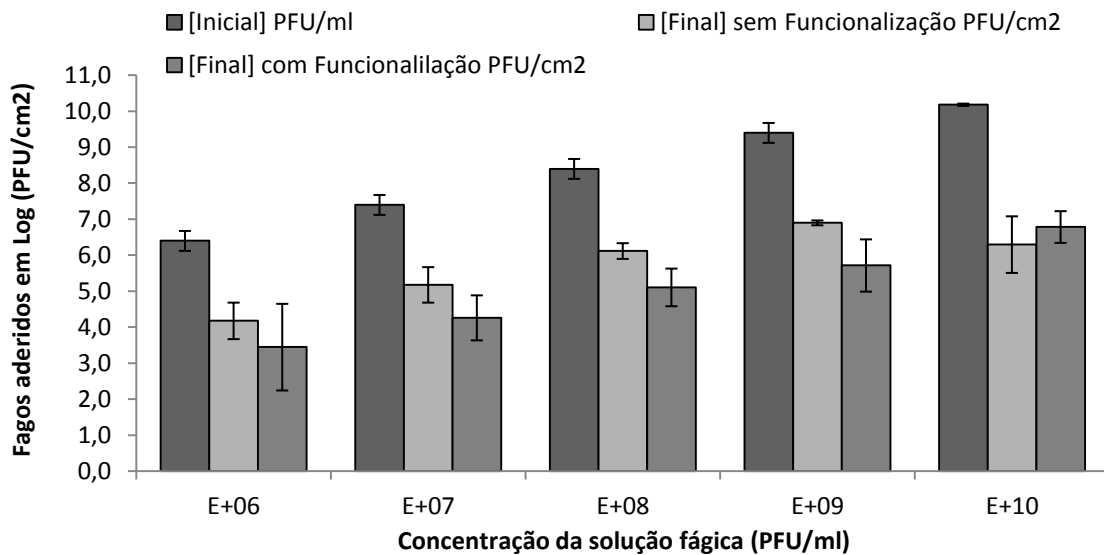


Figura 2.7 - Adsorção do fago vB_PmiP_CEB5460 a superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.

Por sua vez, o fago vB_PmiM_CEB5461 apresenta um comportamento ligeiramente diferente (Figura 2.8). As reduções neste fago não possuem um comportamento tão linear. É visível nos cupões sem funcionalização uma adsorção em média de 4 logs abaixo da concentração inicial da solução fágica. Em superfícies funcionalizadas o comportamento é semelhante. A adesão dos fagos é mais uma vez em média 4 logs inferior à concentração inicial da solução. No entanto, é de salientar que para este fago, os valores de partículas aderidas podem estar a ser ligeiramente subestimados, uma vez que a etapa de sonicação aplicada pode comprometer a viabilidade de uma parte das partículas.

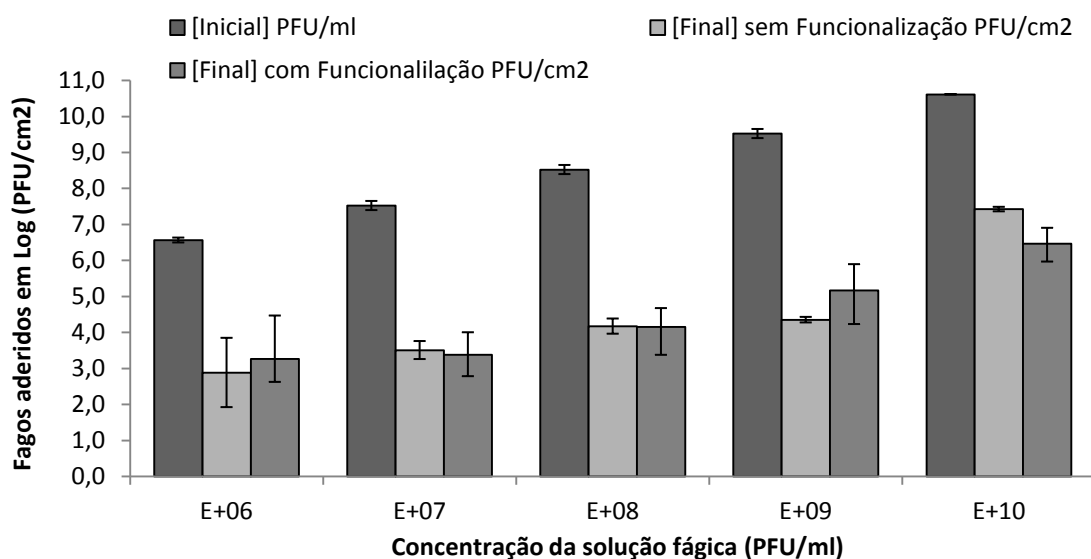


Figura 2.8 - Adsorção do fago vB_PmiM_CEB5461 a superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.

Segundo os resultados obtidos por Cademartiri *et al.* (2010), seria de esperar que a adsorção fágica fosse maior na superfície funcionalizada com APTS, contudo tal não é observado. Segundo o autor seria expectável que o aumento da concentração de grupos amina/amónia levassem a um aumento da ligação dos fagos, devido à interação dos grupos aniónicos presentes na cápside dos fagos. Por sua vez, esta interação deveria levar a que os fagos se ligassem à superfície funcionalizada através da cabeça como ilustrado na Figura 2.9, deixando assim as caudas livres para interagir com as bactérias.

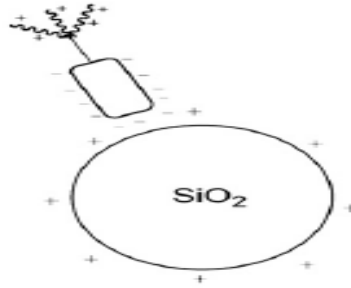


Figura 2.9 - Ligação fágica à superfície funcionalizada com APTS (adaptado de Cademartiri *et al.* (2010)).

A não obtenção do resultado esperado, isto é, aumento na concentração de fago adsorvido, pode ser devida à incapacidade da cápside do fago de se ligar aos grupos amina/amónia presentes nas superfícies funcionalizadas, podendo tal facto dever-se à formação de múltiplas camadas (as quais se formam após a camada de saturação), que dificultam o acesso do fago aos grupos amina disponíveis na superfície (Figura 2.10).

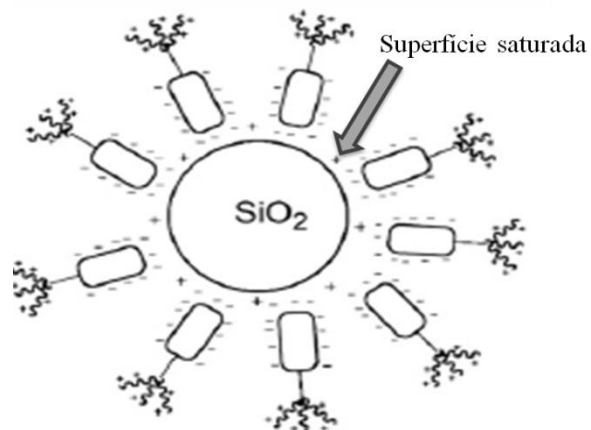


Figura 2.10 - Ligação fágica numa superfície saturada de APTS (adaptado de Cademartiri *et al.* (2010)).

Porém, de uma forma geral verifica-se que o fago vB_PmiP_CEB5460 é o que adere melhor a superfícies de silicone com ou sem funcionalização.

2.2.6. Quantificação da liberação dos fagos em urina

De forma a compreender o processo de liberação em urina artificial dos fagos aderidos a superfícies de silicone, determinou-se a quantidade de fagos libertada ao longo do tempo. As soluções fágicas colocadas nas superfícies possuíam uma concentração de 10^8 PFU/ml.

É possível observar na Figura 2.11 que o fago vB_PmiP_CEB5460 liberta-se em maior quantidade quando aderido a superfícies funcionalizadas. Porém, em ambas as situações, superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas, a liberação do fago apresenta um comportamento linear, o que indica que a liberação ocorre logo no primeiro tempo parando de seguida. Para as superfícies não funcionalizadas a concentração de fago libertada, e consequentemente presente na urina, é de cerca de 10^3 PFU/ml, o que corresponderá à liberação de uma percentagem da população aderida inferior a 1%. Já nas superfícies funcionalizadas, apesar do comportamento linear, a concentração de fago libertada é superior, possuindo esta um valor entre 10^5 e 10^6 PFU/ml, o que corresponde a quase totalidade da população aderida. Mais uma vez, a funcionalização de superfícies não se revela eficaz no que concerne à quantidade final de fago aderido.

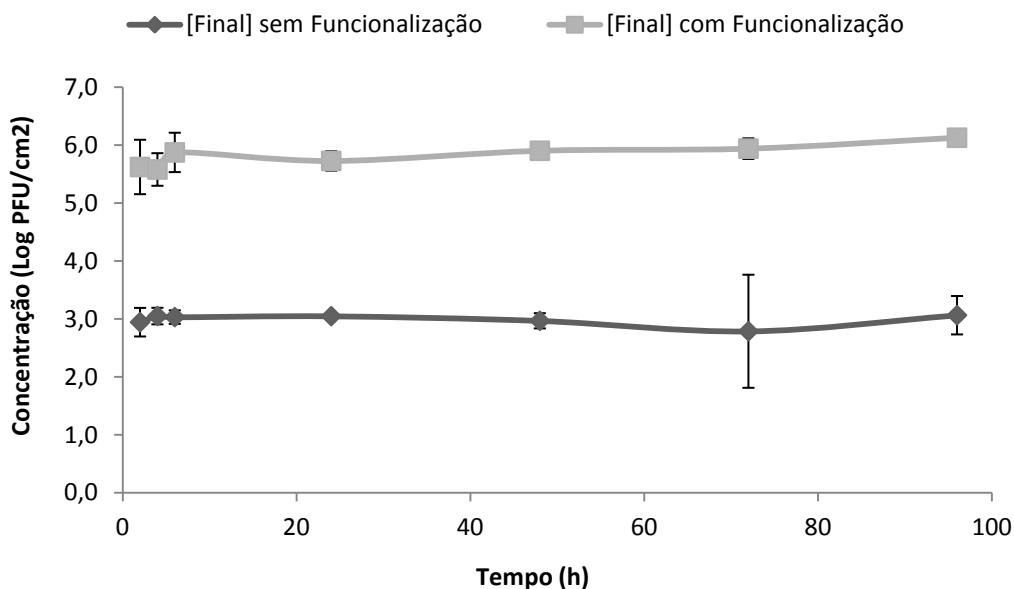


Figura 2.11 - Liberação ao longo do tempo do fago vB_PmiP_CEB5460 em superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.

Por sua vez, como é visível na Figura 2.12, o comportamento do fago vB_PmiM_CEB5461 é diferente. Contrariamente ao verificado no fago anterior, a quantidade de

fago libertado é semelhante nas duas superfícies. De facto parece ocorrer a libertação quase total do fago nas primeiras duas horas.

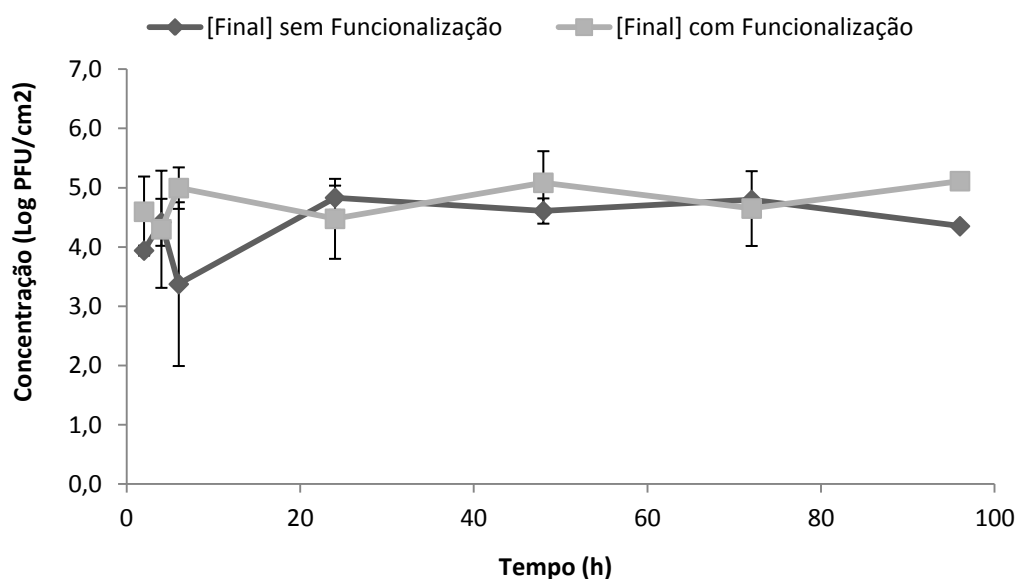


Figura 2.12 - Libertação ao longo do tempo do fago vB_PmiM_CEB5461 em superfícies não funcionalizadas e funcionalizadas.

Este procedimento permitiu verificar que para o fago vB_PmiP_CEB5460 adsorvido sem funcionalização prévia ocorre libertação inicial de uma pequena quantidade de fagos da superfície de silicone, ficando assim a maioria da população aderida à superfície. Relativamente ao fago vB_PmiM_CEB5461, os dados levam a crer que toda a quantidade de fago aderido se liberta às 2 horas. Contudo para confirmar todos estes factos poder-se-ia ter sonificado as superfícies de silicone terminado o período da experiência, a fim de verificar se a quantidade restante de fago estava de facto aderida à superfície.

Apesar de aparentemente só se verificar um revestimento estável para um dos fagos, na realidade a rápida libertação do fago quando em contacto com a urina, pode ter um efeito benéfico em cateteres ao permitir a interação do fago com a bactéria ainda em suspensão. Isto pode permitir um controlo do patogénico antes da adesão à superfície e a própria multiplicação em suspensão poderia permitir um aumento rápido do título do fago dentro do cateter. Para além disso, este trabalho permitiu também verificar que a urina artificial à partida não é um meio severo para o fago, isto é, não afeta a sua viabilidade ao contrário do reportado Tóthová *et al.* (2012) com o fago filamentoso M13.

2.2.7. Conclusão

Os fagos, organismos simples que se encontram largamente distribuídos na natureza, são vírus que apenas atacam as bactérias (Azeredo e Sutherland, 2008, Yele *et al.*, 2012). Por sua vez, as bactérias do género *Proteus* são microrganismos que se encontram comumente associados a infeções urinárias, podendo estas ser de difícil tratamento (Jacobsen *et al.*, 2008), sendo a espécie *P. mirabilis* a mais frequentemente encontrada em humanos (Jacobsen e Shirliff, 2011). A falta de fagos descritos específicos para a bactéria *P. mirabilis* estimulou a caracterização de dois fagos, recentemente isolados e que pertencem à coleção de fagos do grupo de Biotecnologia de Bacteriófagos da Universidade do Minho, com o intuito de avaliar o seu potencial para fins terapêuticos.

Neste capítulo pretendeu-se à caracterização de novos fagos, a fim de conhecer o seu perfil de multiplicação, a sua capacidade de adsorção a superfícies poliméricas, resistências à sonicação, o espectro lítico e de atividade.

Foi possível observar que estes novos fagos de *P. mirabilis* são morfologicamente diferentes, sendo classificados como pertencendo a famílias diferentes, *Podoviridae* e *Myoviridae*. Através do estudo realizado foi possível verificar que o fago vB_PmiM_CEB5461 é possuidor de um amplo espectro lítico, e que ambos os fagos, apesar de não terem sido testados em outras espécies do género *Proteus*, apenas infetam bactérias da espécie *P. mirabilis*. No que concerne às suas resistências à sonicação, foi possível apurar que um dos fagos é mais resistente, o fago vB_PmiP_CEB5460, não ocorrendo um decréscimo acentuado quando sonicado com amplitude e tempos de sonicação mais baixos. Observou-se também se seria possível revestir superfícies poliméricas, neste caso o silicone, com estes fagos e que a adsorção simples (sem funcionalização da superfície) permite um revestimento mais estável, em particular para o fago vB_PmiP_CEB5460. Verificou-se também que o fago vB_PmiP_CEB5460 adsorve em maior número e aparentemente com maior estabilidade que o fago vB_PmiM_CEB5461.

De salientar que todo este trabalho de caracterização foi importante não só para conhecer os fagos, mas também para a realização do trabalho descrito no capítulo seguinte. Foi possível perceber que apesar do fago vB_PmiM_CEB5461 ser mais promissor para terapia, devido ao amplo espectro; o fago vB_PmiP_CEB5460 permite um revestimento mais estável de superfícies de silicone.

2.3. Referências

- ACKERMANN, H. W. 1998. Tailed bacteriophages: the order *caudovirales*. *Adv Virus Res*, 51, 135-201.
- AKSYUK, A. A., KUROCHKINA, L. P., FOKINE, A., FOROUHAR, F., MESYANZHINOV, V. V., TONG, L. & ROSSMANN, M. G. 2011. Structural conservation of the *myoviridae* phage tail sheath protein fold. *Structure*, 19, 1885-94.
- AZEREDO, J. & SUTHERLAND, I. W. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol*, 9, 261-6.
- AZEVEDO, N. F., PACHECO, A. P., KEEVIL, C. W. & VIEIRA, M. J. 2006. Adhesion of water stressed *Helicobacter pylori* to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol*, 101, 718-24.
- CADEMARTIRI, R., ANANY, H., GROSS, I., BHAYANI, R., GRIFFITHS, M. & BROOK, M. A. 2010. Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials*, 31, 1904-10.
- DONATAN, S., YAZICI, H., BERMEK, H., SARIKAYA, M., TAMERLER, C. & URGEN, M. 2009. Physical elution in phage display selection of inorganic-binding peptides. *Materials Science and Engineering: C*, 29, 14-19.
- HAN, J. E., KIM, J. H., HWANG, S. Y., CHORESCA, C. H., JR., SHIN, S. P., JUN, J. W., CHAI, J. Y., PARK, Y. H. & PARK, S. C. 2013. Isolation and characterization of a *Myoviridae* bacteriophage against *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with mastitis. *Res Vet Sci*, 95, 758-63.
- JACOBSEN, S. M. & SHIRTLIFF, M. E. 2011. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence*, 2, 460-5.
- JACOBSEN, S. M., STICKLER, D. J., MOBLEY, H. L. & SHIRTLIFF, M. E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*, 21, 26-59.
- JIANG, S. C., KELLOGG, C. A. & PAUL, J. H. 1998. Characterization of marine temperate phage-host systems isolated from Mamala Bay, Oahu, Hawaii. *Appl Environ Microbiol*, 64, 535-42.
- JOYCE, E., AL-HASHIMI, A. & MASON, T. J. 2011. Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *J Appl Microbiol*.
- KESIK-SZELOCH, A., DRULIS-KAWA, Z., WEBER-DABROWSKA, B., KASSNER, J., MAJKOWSKA-SKROBEK, G., AUGUSTYNIAK, D., LUSIAK-SZELACHOWSKA, M., ZACZEK, M., GORSKI, A. & KROPINSKI, A. M. 2013. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virology*, 10, 100.
- LEE, H. S., CHOI, S., SHIN, H., LEE, J. H. & CHOI, S. H. 2014. *Vibrio vulnificus* bacteriophage SSP002 as a possible biocontrol agent. *Appl Environ Microbiol*, 80, 515-24.
- MELO, L. D., SILLANKORVA, S., ACKERMANN, H. W., KROPINSKI, A. M., AZEREDO, J. & CERCA, N. 2014. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* phage vB_SepS_SEP9 - a unique member of the *Siphoviridae* family. *Res Microbiol*.
- O'FLAHERTY, S., COFFEY, A., EDWARDS, R., MEANEY, W., FITZGERALD, G. F. & ROSS, R. P. 2004. Genome of *staphylococcal* phage K: a new lineage of *Myoviridae* infecting gram-positive bacteria with a low G+C content. *J Bacteriol*, 186, 2862-71.

- PIRES, D., SILLANKORVA, S., FAUSTINO, A. & AZEREDO, J. 2011. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 and ATCC 10145 biofilms. *Res Microbiol*, 162, 798-806.
- PITT, W. G. & ROSS, S. A. 2003. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog*, 19, 1038-44.
- RAHMAN, M., KIM, S., KIM, S. M., SEOL, S. Y. & KIM, J. 2011. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling*, 27, 1087-93.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHAGGER, H. & VON JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166, 368-79.
- STOCKER, B. A. 1955. Bacteriophage and bacterial classification. *J Gen Microbiol*, 12, 375-81.
- TÓTHOVÁ, L. U., BÁBÍČKOVÁ, J. & CELEC, P. 2012. Phage survival: The biodegradability of M13 phage display library in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59, 490-494.
- YELE, A. B., THAWAL, N. D., SAHU, P. K. & CHOPADEV, B. A. 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. *Arch Virol*, 157, 1441-50.
- ZIPS, A., SCHAULE, G. & FLEMMING, H. C. 1990. Ultrasound as a means of detaching biofilms. *Biofouling*, 2, 323-333.

Capítulo 3

Caracterização da formação de biofilme em superfícies de silicone revestidas com bacteriófagos: modelo estático e contínuo

Capítulo 3 – Caracterização da formação de biofilme em superfícies de silicone revestidas com bacteriófagos: modelo estático e contínuo

Os biofilmes têm sido associados a várias patologias, principalmente infecções associadas a dispositivos médicos com longo período de permanência no doente, como cateteres, próteses, entre outros (Drenkard, 2003, Stewart, 2002). A bactéria *P. mirabilis* é um dos principais agentes causadores de infecções urinárias associadas a cateteres, devido à sua bem conhecida capacidade de formar biofilmes.

O revestimento de superfícies com agentes antimicrobianos tem sido descrito como uma das opções existentes que limita a colonização bacteriana e a consequente formação de biofilmes em superfícies (Johnson *et al.*, 1993, DiTizio *et al.*, 1998). O objetivo primordial deste trabalho foi a avaliação da eficácia do pré-tratamento de superfícies com fagos na prevenção da formação de biofilmes de *P. mirabilis*. Para atingir este objetivo foi necessário caracterizar um conjunto de estirpes de *P. mirabilis* em termos do perfil antimicrobiano e capacidade de formação de biofilmes de forma a selecionar apenas estirpes boas formadoras de biofilmes para os ensaios. Foi também caracterizada a resistência de *P. mirabilis* à sonicação, a fim de permitir uma correta remoção e contabilização da bactéria em biofilme. Para os estudos de avaliação do efeito do revestimento com fagos na capacidade de adesão e formação de biofilme de *P. mirabilis* optou-se por usar um modelo estático e um modelo contínuo.

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Screening para a capacidade de formação de biofilme

Para a formação de biofilmes prepararam-se inóculos das 15 estirpes de *P. mirabilis* (SGSC 5460, SGSC 5461, L340862, CECT 4168, SGSC 5450, SGSC 5447, SGSC 5448, SGSC 3360, CECT 4101, 933, SGSC 5449, SGSC 5446, SGSC 5445, L340877 e SLázaro) em 10 ml de urina artificial (Brooks e Keevil (1997)) suplementada com 0,3% de glucose (Silva *et al.*, 2010) os quais foram a incubar *overnight*, sob agitação (120 rpm) a 37°C. De seguida centrifugaram-se as amostras (3 minutos, a 5000 × g), rejeitaram-se os sobrenadantes e ressuspenderam-se os *pellets* em urina artificial fresca até uma DO_{620nm} de 0,1 (aproximadamente 1x10⁸ CFU/ml). Posteriormente diluíram-se os inóculos em urina artificial, de forma a obter uma

concentração de 1×10^6 CFU/ml. Colocou-se 180 μ l de urina artificial fresca e 20 μ l dos inóculos previamente preparados em placas de 96 poços (n=6). Estas foram incubadas durante 48 horas, a 37°C, 100 rpm, sendo o meio mudado às 24 horas. Colocaram-se ainda 200 μ l de urina artificial para servir como controlo negativo (n=6).

Para a quantificação da formação de biofilme teve-se por base a técnica descrita em Pires *et al.* (2011), com pequenas alterações. Após 48 horas de incubação das placas de 96 poços, retirou-se todo o meio e lavou-se o biofilme com 220 μ l de tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate buffered saline* - PBS) (8 g/l NaCl [Nzytech]; 0,2 g/l KCl [Sigma]; 0,2 g/l KH_2PO_4 [Sigma]; 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Sigma]; pH 7,5). Retirou-se o PBS, colocou-se 220 μ l de metanol (100%) e deixou-se atuar durante 20 minutos para fixar a amostra. Retirou-se o metanol e deixou-se a placa a repousar até secar completamente. Adicionaram-se 220 μ l de violeta de cristal (1% (v/v) [Merck]) e deixou-se a atuar cerca de 10 minutos, retirou-se, lavou-se com água e secou-se muito bem a placa com ajuda de papel. Por fim adicionou-se 220 μ l de ácido acético (33% (v/v) [Fisher]), homogeneizou-se muito bem e leu-se a absorvância a 570 nm.

Posteriormente as estirpes foram classificadas quanto à formação de biofilme, como descrito em Stepanovic *et al.* (2000), como não formadoras, fracas formadoras, moderadas e fortes formadoras, de acordo com as classes indicadas abaixo. Foi definida uma DO cut-off (DO_c) com três desvios-padrão acima da média do controlo negativo, ficando da seguinte forma:

- $\text{DO} \leq \text{DO}_c \rightarrow$ Não aderente
- $\text{DO}_c < \text{DO} \leq 2 \times \text{DO}_c \rightarrow$ Fraco aderente
- $2 \times \text{DO}_c < \text{DO} \leq 4 \times \text{DO}_c \rightarrow$ Moderado aderente
- $4 \times \text{DO}_c < \text{DO} \rightarrow$ Forte aderente

Para esta experiencia foram realizados três ensaios independentes.

3.1.2. Resistência da bactéria à sonicação

O tempo de sonicação para obter uma eficiente remoção das células do biofilme foi otimizado tal como descrito no Capítulo 2, ponto 2.1.7., para posterior quantificação da bactéria, sem comprometer a viabilidade celular. Neste ensaio foi utilizada apenas uma estirpe de *P. mirabilis* (SGSC 5449).

Prepararam-se inóculos da bactéria como descrito no ponto 3.1.1, e após crescimento *overnight*, centrifugou-se a amostra, ressuspendeu-se em NaCl (0,9% (p/v)), leu-se a $\text{D.O.}_{620\text{nm}}$ e acertou-se a mesma a 0,1. De seguida adicionou-se 1 ml de suspensão bacteriana a poços de

uma placa de 24 poços que foram sujeitos a diferentes tempos de sonicação (5, 10, 15, 20, ou 40 segundos) e amplitude (22% e 25%) no sonicador Sonics Vibra-Cell VC 505 – VC 750. Durante este processo a placa de 24 poços foi mantida em gelo, para evitar o aquecimento das amostras, que poderia comprometer a viabilidade celular. Terminado o processo de sonicação, determinaram-se os CFU's das amostras como descrito no Capítulo 2, ponto 2.1.2. Foram realizados três ensaios independentes para este estudo.

3.1.3. Concentração inibitória mínima (MIC)

Para a determinação da concentração inibitória mínima teve-se por base as normas M7-A7 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Institute, 2006). Foram utilizadas 15 estirpes de *P. mirabilis*, e os seguintes antibióticos: amicacina (Sigma), amoxicilina (Sigma), ampicilina (Sigma), cefalotina (Sigma), ciprofloxacina (Sigma), fosfomicina (Sigma), gentamicina (Sigma) e ácido nalidíxico (Sigma). Foram testadas concentrações dos antibióticos acima e abaixo dos respectivos *breakpoints* (Anexo III, Tabela A1). Incubaram-se as placas com agitação (120 rpm) a 37°C *overnight*, e no dia seguinte leram-se as mesmas.

3.1.4. Formação de biofilme em cupões de silicone

Cupões de silicone com 1 cm² foram previamente lavados e esterilizados como descrito no ponto 2.1.8. do Capítulo 2. Foram utilizados cupões revestidos com fagos individualizados (vB_PmiP_CEB5460 ou vB_PmiM_CEB5461) e com um cocktail dos dois fagos. Cupões de silicone estéreis foram utilizados como controlo. Os fagos foram imobilizados em superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas como descrito no Capítulo 2, pontos 2.1.8 e 2.1.9 de forma a terem uma concentração de fago aderido de aproximadamente 10⁶ PFU/cm². Os cupões foram colocados em placas de 24 poços para estudos de formação de biofilme.

Para estes ensaios foram selecionadas duas estirpes bacterianas de *P. mirabilis* com elevada capacidade de formação de biofilme (SGSC 5446 e SGSC 5449). Fizeram-se inóculos de cada bactéria como descrito no ponto 3.1.1. e posteriormente a cada poço contendo um cupão de silicone adicionou-se 1 ml da suspensão bacteriana (10⁵ CFU/ml) previamente preparada. Colocaram-se as amostras a 37°C, 120 rpm, para permitir a formação de biofilme. Nos tempos 0, 3, 6, 24 e 48 horas foram retirados dois cupões, lavados em 1 ml de (0,9% (p/v)) e sonicados durante 5 segundos (22% de amplitude) para quantificação do número de células viáveis. Para

quantificação da biomassa total do biofilme, dois cupões foram sujeitos ao procedimento de violeta de cristal como descrito no ponto 3.1.1.

3.1.5. Formação de biofilme em modelo contínuo

Para mimetizar ao máximo as condições de um cateter, formaram-se também biofilmes usando um modelo contínuo em cateteres de Foley (Figura 3.1).





Figura 3.1 - Imagens do sistema contínuo montado no laboratório, com pormenor das diferentes posições dos reguladores das cassetes.

Começou-se por acertar o caudal a 0,5 ml/min para mimetizar o caudal médio real num paciente cateterizado (Levering *et al.*, 2014, Jones *et al.*, 2005). Após o acerto do caudal, as tubagens foram autoclavadas (15 minutos a 121°C), e secas na estufa a 65°C. Sob condições de esterilidade e com a ajuda de um bisturi estéril cortaram-se as duas pontas a um cateter de Foley em silicone (Silkemed Uro-cath 2Way, Overpharma), adicionou-se cerca de 3 ml do cocktail de fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 a uma concentração de 10^9 PFU/ml (de forma a obter um revestimento de cerca de 10^6 fagos/cm²), vedou-se e deixou-se repousar *overnight* à temperatura ambiente. No dia seguinte lavou-se com tampão SM para retirar os fagos não adsorvidos e montaram-se os sistemas de fluxo dentro da câmara de fluxo, mantendo as pontas destes fechadas e em condições estéreis.

Fizeram-se inóculos das bactérias *P. mirabilis* SGSC 5446 e SGSC 5449 em cerca de 10 ml de urina artificial suplementada com 0,3% de glucose e colocaram-se a incubar *overnight* a 37°C, 120 rpm. No dia seguinte centrifugou-se o inóculo (3 minutos, 5000 × g), e preparou-se uma suspensão bacteriana com as duas estirpes, a uma concentração de 1×10^8 CFU/ml.

Dois sistemas, um com fagos adsorvidos e outro sem fagos adsorvidos, foram alimentados durante 24 horas com a suspensão previamente preparada. A partir do ponto 24 horas os dois cateteres passaram a ser alimentados só com urina artificial. Nos tempos 48, 96,

e 168 horas, sob condições de esterilidade, cortaram-se 2 cm de cada cateter, sendo 1 cm para análise por CFU's e o outro para análise por violeta de cristal. Cada porção de 1 cm de cateter foi lavada com 1 ml de NaCl (0,9% (p/v)) e PBS, respetivamente. As porções destinadas à análise por CFU's foram colocadas em 1,5 ml de NaCl (0,9% (p/v)) estéril, sonicadas durante 5 segundos a 22% de amplitude e depois prosseguiu-se como descrito no ponto 2.1.2. do Capítulo 2. Por sua vez, as porções de cateter para violeta de cristal, seguiram o protocolo descrito no ponto 3.1.1., apenas com variação das quantidades colocadas de metanol, violeta de cristal e ácido acético, sendo estas de 1 ml. Para esta experiência foram realizados dois ensaios independentes.

3.2. Resultados e discussão

3.2.1. *Screening* para a capacidade de formação de biofilme

Para melhor avaliar o efeito do revestimento com partículas fágicas na formação de biofilme, foi feito um *screening* inicial para selecionar estirpes de *P. mirabilis* com elevada capacidade de formação de biofilme. Para tal utilizou-se o modelo da microplaca de 96 poços, amplamente utilizado em estudos de formação de biofilme por permitir a análise rápida e simples de um elevado número de estirpes (Pierce *et al.*, 2008). Foram selecionadas 15 estirpes de *P. mirabilis* e o biofilme foi formado em urina artificial durante 48 horas. A quantificação dos biofilmes foi feita pela coloração violeta de cristal (Figura 3.2). Aqui é possível observar as diferenças entre as várias estirpes no que se refere à formação de biofilme, sendo que quanto mais elevada é a absorvância da amostra, maior era a quantidade de biomassa presente.

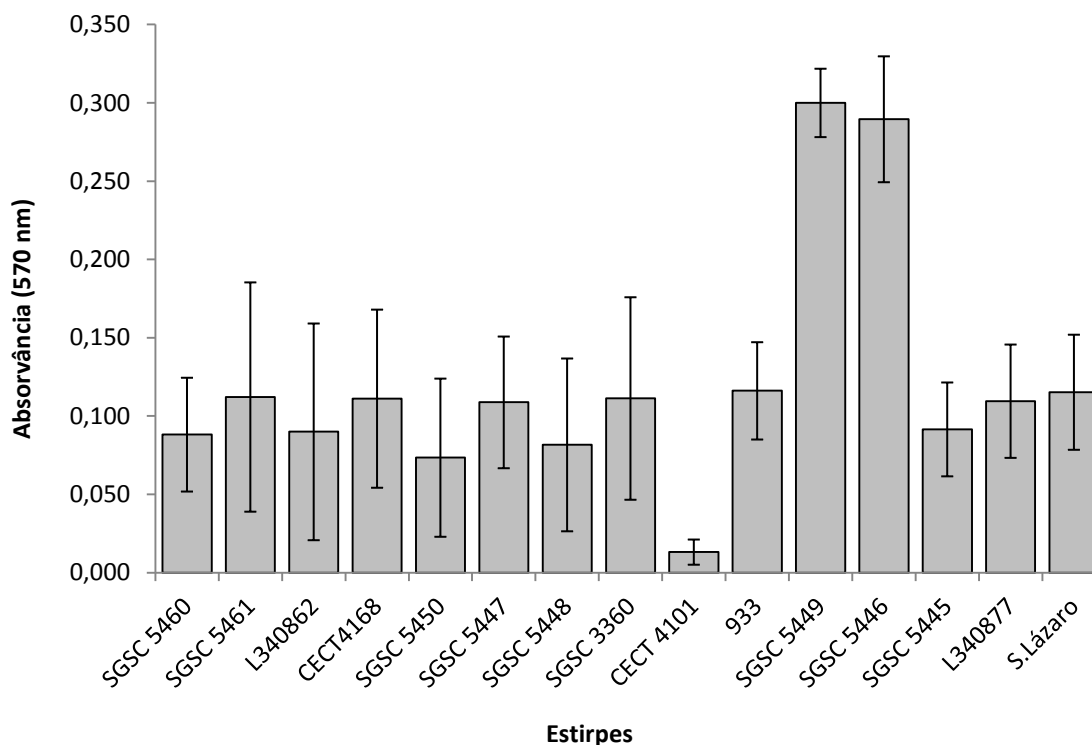


Figura 3.2 - Quantificação da formação de biofilme por violeta de cristal.

De forma a melhor classificar todas as estirpes relativamente à sua formação de biofilme, definiram-se várias classes de acordo com as definições de Stepanovic *et al.* (2000). Assim sendo, após a definição da DO cut-off (como definido nos materiais e métodos), as estirpes foram classificadas como não aderentes, fracas, moderadas e fortes aderentes.

Como se pode observar na Tabela 3.1, a maior parte das estirpes são consideradas, segundo a classificação de Stepanovic *et al.* (2000) como sendo moderadas formadoras de biofilme. Cinco estirpes encontram-se dentro do patamar de fracas formadoras de biofilme e apenas a estirpe CECT 4101 é classificada como não formadora de biofilme.

É possível verificar também que segundo a classificação de Stepanovic *et al.* (2000) apenas as estirpes *P. mirabilis* SGSC 5449 e 5446 são consideradas fortes formadoras de biofilme. Na realidade este comportamento é bem visível na Figura 3.2, onde apenas estas duas estirpes se destacam com elevados níveis de produção de biomassa.

Tabela 3.1 - Classificação das várias estirpes de *P. mirabilis* quanto à capacidade de formação de biofilme.

Estirpes	Classificação			
	Não aderente (0)	Fraco (+)	Moderado (++)	Forte (+++)
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5460		+		
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5461			++	
<i>P. mirabilis</i> L340862*		+		
<i>P. mirabilis</i> CECT 4168			++	
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5450		+		
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5447			++	
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5448		+		
<i>P. mirabilis</i> SGSC 3360			++	
<i>P. mirabilis</i> CECT 4101	0			
<i>P. mirabilis</i> 933*			++	
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5449				+++
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5446				+++
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5445		+		
<i>P. mirabilis</i> L340877*			++	
<i>P. mirabilis</i> SLázaro*			++	

* Isolados clínicos

3.2.2. Concentração inibitória mínima

Para além da avaliação da capacidade de formação de biofilme foi também determinado o perfil de resistência das várias estirpes bacterianas aos antimicrobianos. Utilizou-se para tal o método de microdiluição em meio de cultura líquido, pois este método apresenta várias vantagens, como a fácil execução, reprodutibilidade e a utilização de pequenas quantidades de reagentes (Jorgensen e Ferraro, 2009). A escolha dos antibióticos baseou-se, de acordo com a literatura, em alguns dos antibióticos mais prescritos e descritos nas patologias associadas a este tipo de infeções (Franz e Horl, 1999). Na Tabela 3.2 estão representadas as sensibilidades/resistências das várias estirpes bacterianas de *P. mirabilis*.

Tabela 3.2 - Resistências aos antibióticos das várias estirpes de *P. mirabilis*.

Estirpe	Antibióticos							
	Amicacina	Amoxicilina	Ampicilina	Cefalotina	Ciprofloxacina	Fosfomicina	Gentamicina	Ácido nalidíxico
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5460	S	S	S	I	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5461	I	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> L340862*	R	S	R	I	S	S	R	S
<i>P. mirabilis</i> CECT 4168	R	S	S	S	S	R	I	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5450	I	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5447	S	S	S	S	S	S	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5448	I	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 3360	I	S	S	S	S	R	I	R
<i>P. mirabilis</i> CECT 4101	I	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> 933*	I	S	S	S	S	S	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5449	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5446	I	S	S	S	S	S	I	S
<i>P. mirabilis</i> SGSC 5445	R	S	S	S	S	R	R	S
<i>P. mirabilis</i> L340877*	R	S	R	R	R	S	R	S
<i>P. mirabilis</i> SLázaro*	I	S	S	S	S	R	R	S

* Isolados clínicos

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que todas as estirpes apresentam em média resistência a pelo menos dois antibióticos. De todos os antibióticos testados o que se apresenta como mais eficaz, isto é, possui um maior número de estirpes sensíveis é a amoxicilina (com todas as estirpes sensíveis), seguido do ácido nalidíxico e da ciprofloxacina, ambos com apenas uma estirpe resistente. Estes antibióticos pertencem à gama das fluoroquinolonas e quinolonas. Segundo vários autores, as estirpes de *P. mirabilis* geralmente apresentam suscetibilidade a este grupo de antibióticos (O'Hara *et al.*, 2000, Luzzaro *et al.*, 2001). Por sua vez, os antibióticos aos quais as estirpes apresentam mais resistências são

a amicacina e a gentamicina, antibióticos que se encontram enquadrados no grupo dos aminoglicosídeos, o que vai de encontro à literatura, pois já foi descrita a resistência destas estirpes a este tipo de antibióticos (Saito *et al.*, 2006, Wachino *et al.*, 2006, Aragon *et al.*, 2008). Para além disso, foi possível verificar que o perfil antimicrobiano de todas as estirpes é bastante semelhante, salvo os isolados clínicos L340862 e L340877 que apresentam um perfil ligeiramente diferente e um maior número de resistências.

O objetivo deste procedimento seria determinar as resistências aos antimicrobianos para posteriormente, com as estirpes mais resistentes (sendo estas à partida mais virulentas) e com boa capacidade de adesão, formar biofilme. Todavia, as estirpes que apresentam um maior número de resistências não foram classificadas como fortes formadoras de biofilme. Devido a este facto, optou-se por seleccionar as estirpes com maior capacidade de adesão e consequentemente, melhor formação de biofilme.

3.2.3. Resistência bacteriana à sonicação

Tal como descrito no ponto 2.2.7. do Capítulo 2, também aqui foi necessário testar a resistência bacteriana à sonicação com diferentes tempos e amplitudes. Esta necessidade advém do facto de ser necessário aplicar um passo de sonicação para remover as células do biofilme da superfície de adesão, para posterior contagem do número de células viáveis. De forma a determinar as condições que menos afetam as células, foram testados diferentes tempos de sonicação a duas amplitudes diferentes, estando os resultados obtidos representados na Figura 3.3. Este teste foi efetuado numa das estirpes classificada como forte formadora de biofilme, a *P. mirabilis* SGSC 5449.

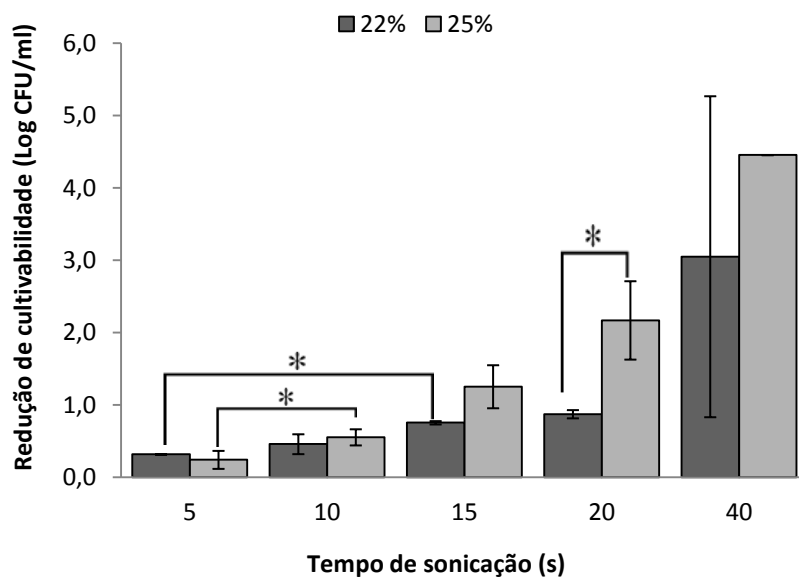


Figura 3.3 - Resistência da estirpe de *P. mirabilis* SGSC 5449 à sonicação. * representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Como é possível verificar na Figura 3.3, e à semelhança do que ocorreu também com os fagos, à medida que o tempo de sonicação aumenta, ocorre uma redução da cultivabilidade celular. Por exemplo, para 22% de amplitude, é possível verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre 5 e 15 segundos de sonicação ($p < 0,05$). O mesmo acontece quando estamos perante uma amplitude mais elevada. No entanto, as diferenças entre amplitudes de 22 ou 25% só são estatisticamente significativas para os 20 segundos ($p < 0,05$). O mesmo fenómeno foi observado por Joyce *et al.* (2011), embora este tenha utilizado células bacterianas de espécies diferentes (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*). Na realidade células Gram-negativas parecem mais sensíveis à sonicação que as Gram-positivas, que geralmente aguentam períodos de sonicação mais prolongados (Monsen *et al.*, 2009). Também Duckhouse *et al.* (2004) constataram que com o aumento do tempo de exposição à sonicação o número de inativação de bactérias (*E. coli*) aumentava. Esta sensibilidade bacteriana aos ultrassons é afetada por vários aspetos, como a composição do meio, a viscosidade, a distribuição da energia na solução (Joyce *et al.*, 2011). A sonicação, quando utilizada por elevados períodos de tempo e elevadas amplitudes, é um conhecido método para provocar a desintegração celular, podendo causar lise celular e conseqüente libertação de compostos intracelulares (Foladori *et al.*, 2007). No entanto, é também muito utilizada no estudo de biofilmes por permitir uma remoção muito eficiente e homogeneia das células aderidas (Morris *et al.*, 1998, Bjerkan *et al.*, 2009). Deve contudo ser otimizada para assegurar a completa remoção do biofilme, evitando o comprometimento da viabilidade celular.

Assim sendo, a amplitude e o tempo de sonicação que menos parecem afetar a viabilidade celular bacteriana são respetivamente 22% e 5 segundos. Foi feita uma confirmação quanto à capacidade de remoção do biofilme destes parâmetros de sonicação, que se mostrou eficiente para todos os tempos testados.

3.2.4. Formação de biofilme em superfícies revestidas com fago

Após a identificação das estirpes boas formadoras de biofilme, *P. mirabilis* SGSC 5449 e *P. mirabilis* SGSC 5446, procedeu-se à formação de biofilme simples em superfícies de silicone.

Na Figura 3.4 encontram-se os resultados obtidos na prevenção da formação de biofilme por *P. mirabilis* SGSC 5449, após a adsorção dos fagos aos cupões de silicone.

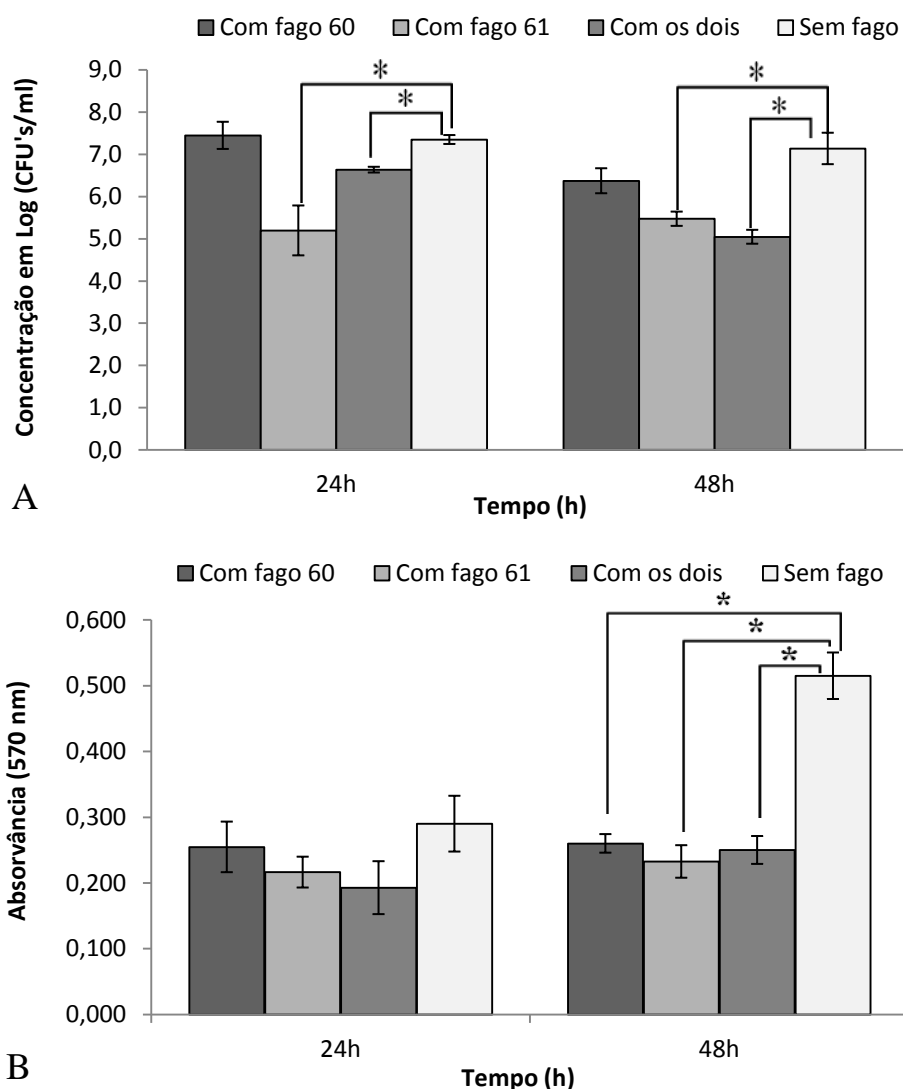


Figura 3.4 - Formação de biofilme da bactéria *P. mirabilis* SGSC 5449 em superfícies de silicone revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B). * representa $p < 0,05$.

Os resultados obtidos mostram algum decréscimo na formação de biofilme em cupões com fagos adsorvidos, comparando com os cupões sem fagos, nos pontos 24 e 48 horas na quantificação por células viáveis. No entanto, este decréscimo é significativo ($p < 0,05$) apenas para os cupões com fago vB_PmiM_CEB5461 e para os cupões com ambos os fagos. De facto, os dados de CFU's parecem indicar que o fago vB_PmiM_CEB5461, sozinho ou em cocktail, poderá ter uma melhor ação que o fago vB_PmiP_CEB5460. Quer para o fago vB_PmiM_CEB5461 quer para o cocktail, é observado um decréscimo de quase dois logs no número de CFUs, o que corresponderia a uma redução de cerca de 99% da população viável do biofilme. Por sua vez, na quantificação de biomassa total verifica-se um grande decréscimo apenas no ponto 48 horas ($p < 0,05$), para todas as superfícies com fagos adsorvidos.

Na Figura 3.5 é possível observar os dados obtidos na prevenção da formação de biofilme com a mesma estirpe em cupões funcionalizados e posteriormente revestidos com fagos.

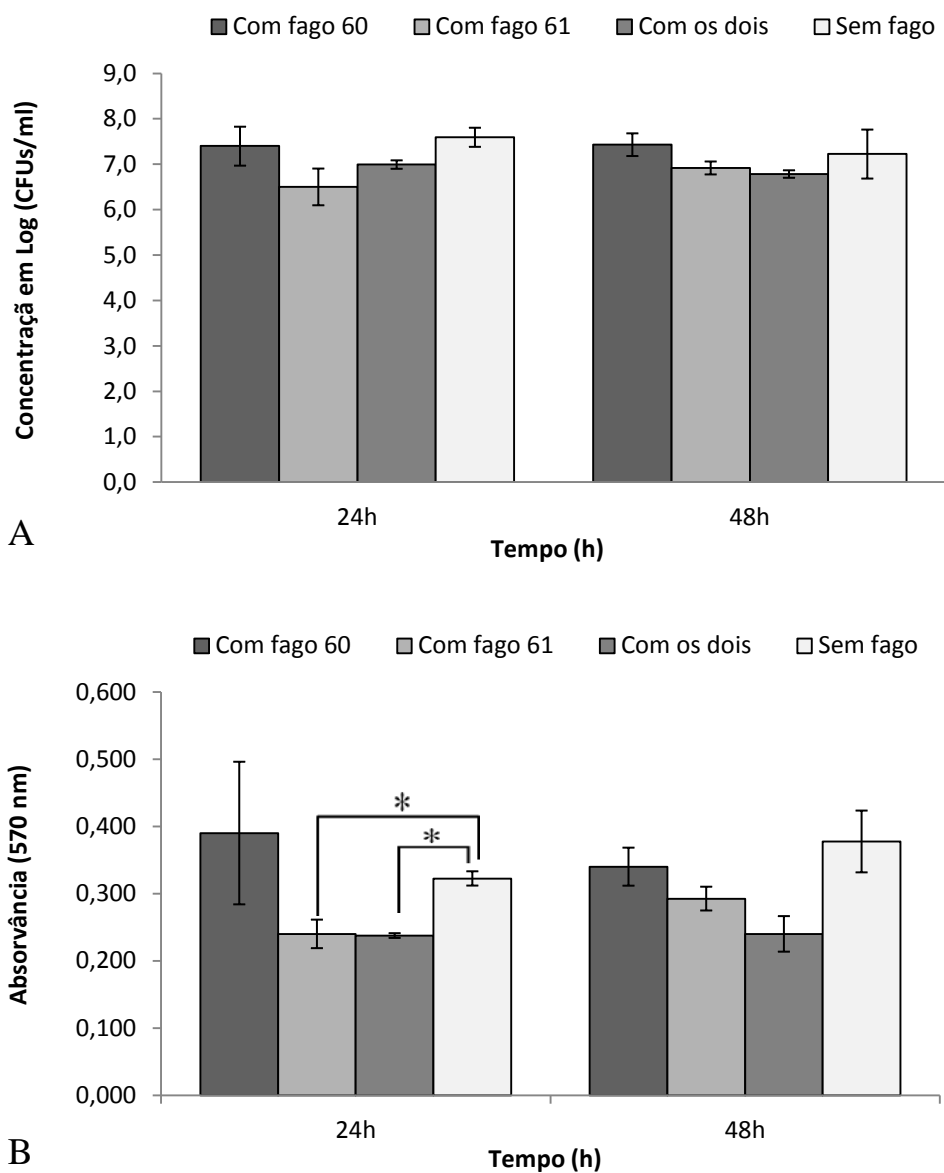


Figura 3.5 - Formação de biofilme da bactéria *P. mirabilis* SGSC 5449 em superfícies de silicone funcionalizadas e revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B). * representa $p < 0,05$.

Como se pode verificar na Figura 3.5, não existe redução significativa no número de células cultiváveis, apesar de haver um decréscimo na biomassa total do biofilme às 24 horas com o fago vB_PmiM_CEB5461 e com o cocktail de fagos.

Na Figura 3.6 estão representados os resultados obtidos na prevenção da formação de biofilme simples com a estirpe *P. mirabilis* SGSC 5446.

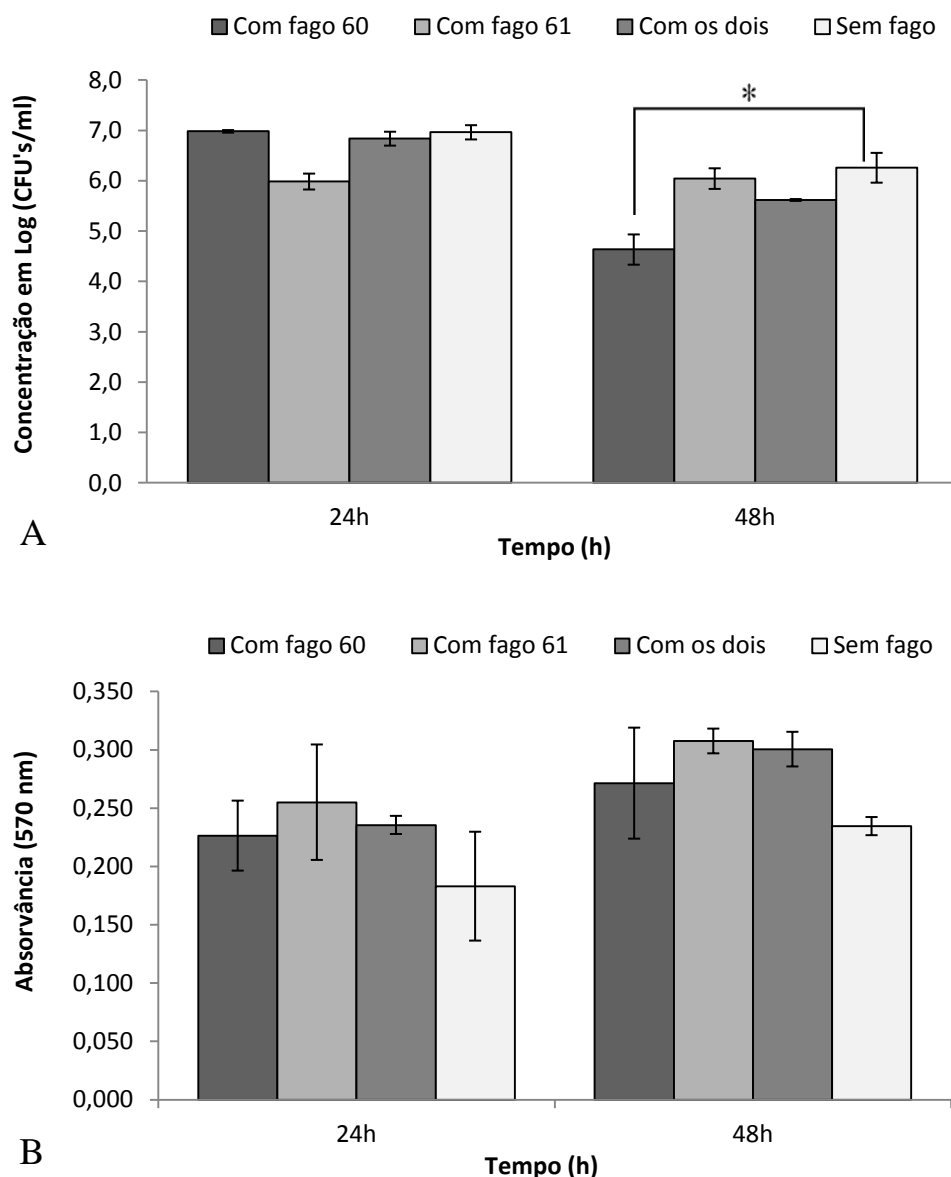


Figura 3.6 - Formação de biofilme da bactéria *P. mirabilis* SGSC 5446 em superfícies de silicone revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B). * representa $p < 0,05$.

Através da análise da Figura 3.6 é possível observar que apenas existe uma redução estatisticamente significativa do número de células cultiváveis no ponto 48 horas com o fago vB_PmiP_CEB5460. Em oposição, no caso da biomassa total não é notório nenhum efeito em termos de prevenção da formação de biofilme em qualquer outro ponto. Na Figura 3.7 estão representados os resultados da formação de biofilme da estirpe *P. mirabilis* SGSC 5446 em superfícies funcionalizadas e com fagos adsorvidos, onde também não é visível qualquer efeito

na prevenção da formação de biofilme, quer em termos de células cultiváveis quer na biomassa total.

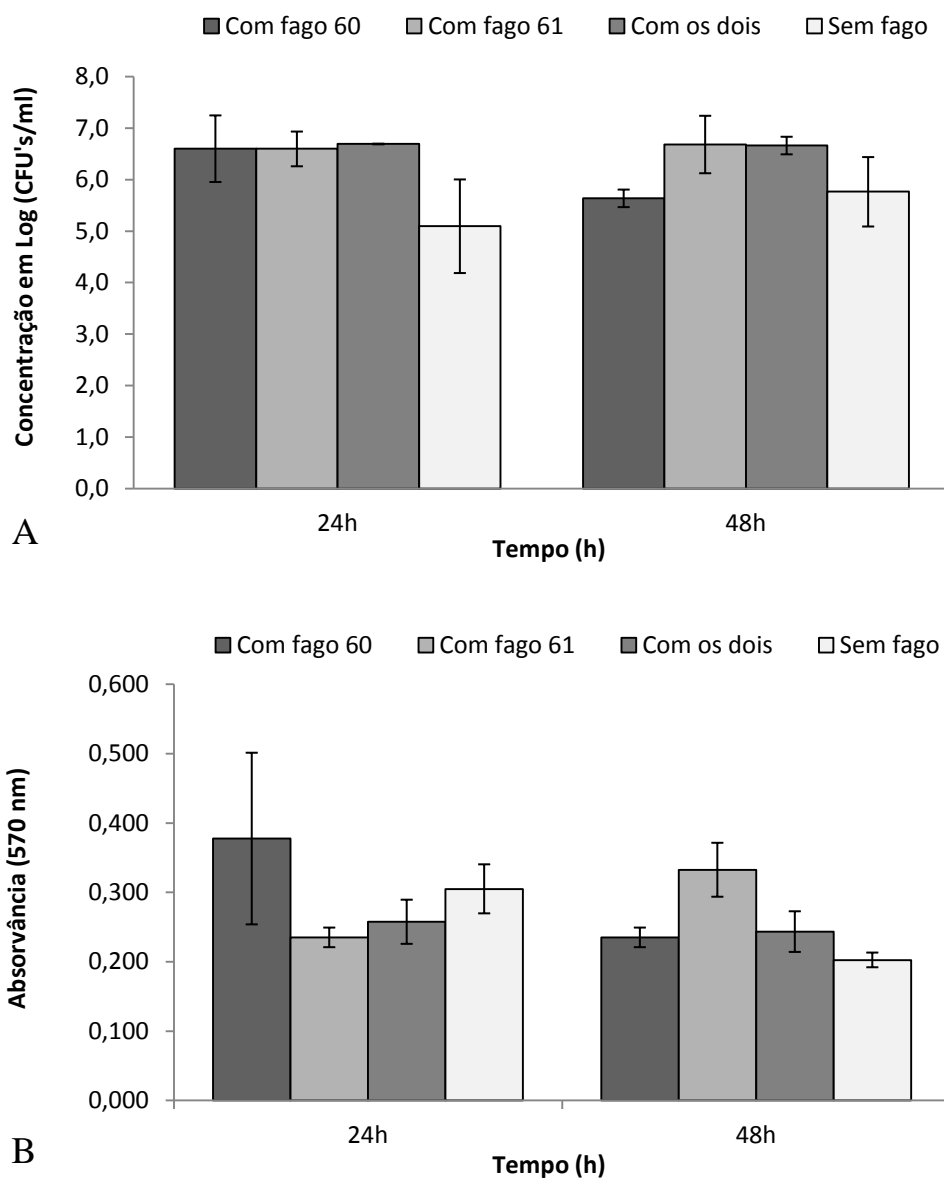


Figura 3.7 - Formação de biofilme da bactéria *P. mirabilis* SGSC 5446 em superfícies de silicone funcionalizadas e revestidas com fagos. Quantificação da população de células viáveis (A) e da biomassa total (B).

De um modo geral, os resultados obtidos parecem indicar uma ligeira redução do biofilme formado nas superfícies revestidas com fago. No entanto, a funcionalização das superfícies de silicone antes da adsorção do fago não se mostrou benéfica afetando, de algum modo, a ação do fago nas células do biofilme. Este efeito pode passar por uma menor disponibilidade do fago para interagir com as células, ou, eventualmente, pelo comprometimento

da viabilidade da partícula fágica. Apesar de outros autores indicarem que a funcionalização permite um posicionamento mais estratégico das partículas fágicas (Cademartiri *et al.*, 2010), o que potencializaria o seu efeito, os mesmos resultados não foram observados para os fagos e biofilmes utilizados neste trabalho.

Foi ainda observado um efeito preferencial do fago vB_PmiM_CEB5461 na formação do biofilme de *P. mirabilis* SGSC 5449, e do fago vB_PmiP_CEB5460 na formação de biofilme de *P. mirabilis* SGSC 5446, o sugere que a utilização de um cocktail pode ser estratégia para biofilmes de *P. mirabilis* mais heterogêneos. No entanto, é difícil prever se o efeito de redução do biofilme formado seria mantido para períodos de incubação mais longos. Na realidade, vários trabalhos sobre o efeito da terapia fágica em biofilmes têm mostrado uma redução da eficiência desta terapia para biofilmes mais maduros, decorrente do aparecimento de fenótipos resistentes aos fagos (Fu *et al.*, 2010). Para melhor avaliar o potencial deste tipo de abordagem é importante não só estender os períodos de formação de biofilme, mas também mimetizar as condições dinâmicas que se verificam em pacientes cateterizados.

3.2.5. Biofilme em modelo contínuo

De forma a mimetizar ao máximo a situação real de um cateter urinário montou-se um sistema contínuo de formação de biofilme com cateteres de Foley. Foram utilizados 2 cateteres em simultâneo. O primeiro foi previamente revestido com um cocktail fágico e o segundo não sofreu qualquer tipo de tratamento. Aos dois cateteres foi fornecido um fluxo contínuo de urina com as duas estirpes de *P. mirabilis* (Levering *et al.*, 2014, Jones *et al.*, 2005) durante 24 horas, e de seguida foram alimentados apenas com urina artificial. Apesar da ausência de resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$), é visível um decréscimo na população cultivável do biofilme. Por sua vez, o cocktail fágico não se revelou eficaz, pois a diferença entre os resultados obtidos para o cateter com fagos e para o cateter não revestido não é significativa (Figura 3.8).

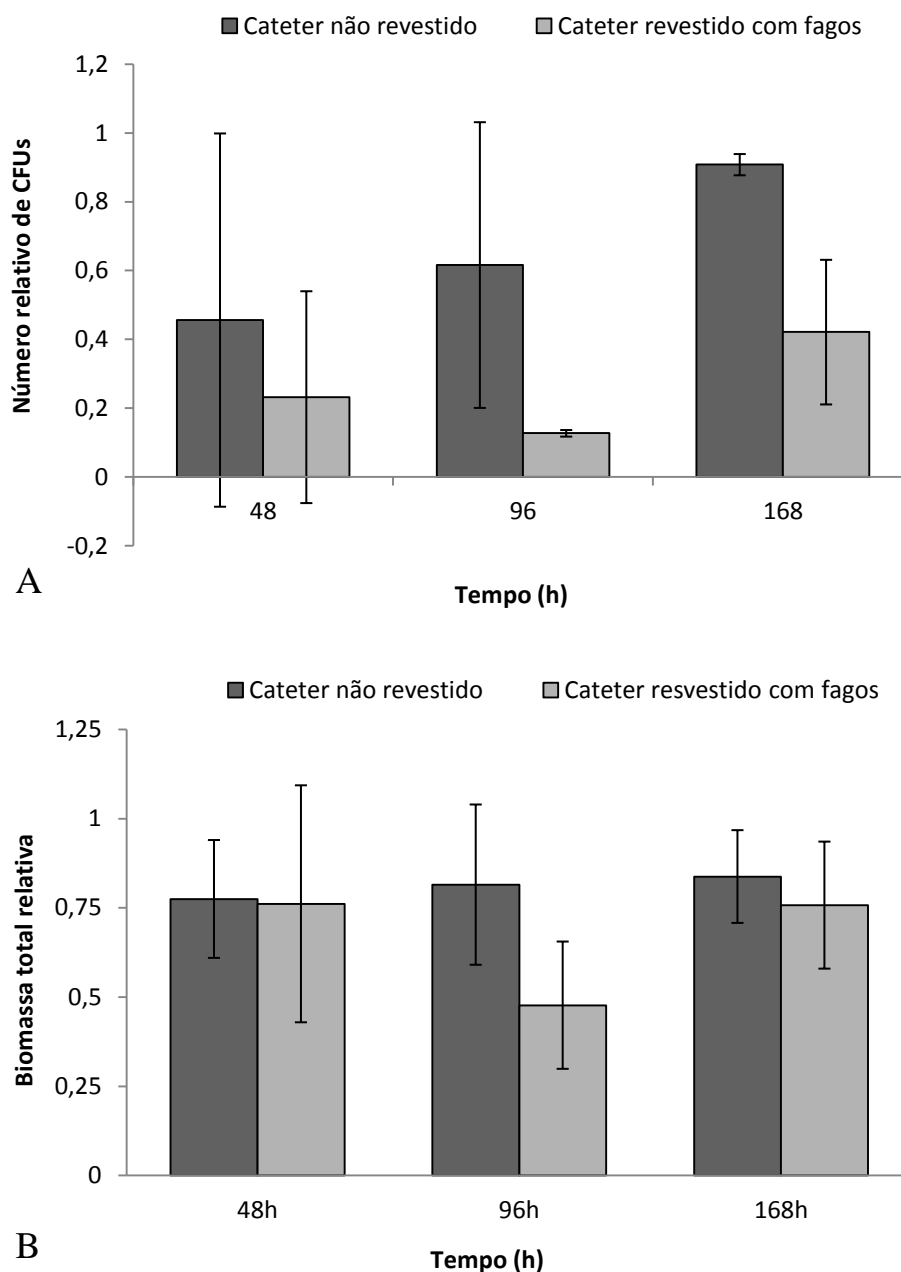


Figura 3.8 - Quantificação da formação de biofilme em cateter de Foley normal e revestido com fagos por CFU's (A) e por violeta de cristal (B).

Também na quantificação por CV parece haver uma tendência para a redução do biofilme, mas, mais uma vez, não são visíveis diferenças estatisticamente significativas (Figura 3.8 B).

A obtenção destes resultados pode dever-se ao facto de ser extremamente difícil manter todas as condições de esterilidade aquando da troca de tubagens e meios, o que por sua vez pode levar a contaminações, contudo não foram visualizadas colónias com morfologia diferente das de *Proteus*. Outro aspeto importante que pode impedir a ação dos fagos é a matriz de

exopolissacarídeos do biofilme, pois esta é relatada na literatura como sendo uma barreira que resiste à penetração de vários agentes (Drenkard, 2003, Stewart e Costerton, 2001), impedindo também o acesso viral à superfície das células bacterianas (Sutherland *et al.*, 2004). Apesar de neste estudo a superfície do cateter possuir fagos adsorvidos, pode eventualmente ocorrer um revestimento pouco uniforme da superfície, deixando assim pequenas áreas livres para a adesão bacteriana. Apesar destas limitações, parece observar-se uma tendência na redução do biofilme que só poderá ser comprovada com o aumento do número de réplicas dos ensaios contínuos em cateter de Foley. Na realidade, este ensaio teve apenas duas réplicas o que pode em parte explicar a maior variabilidade dos resultados e a ausência de diferenças estatisticamente significativas.

Outra característica importante da bactéria *P. mirabilis* é a sua enorme capacidade de formar cristais, que, associados às células bacterianas já fixadas às superfícies, podem levar ao entupimento dos cateteres (Coker *et al.*, 2000, Rozalski *et al.*, 1997, Stickler *et al.*, 2006). Durante o estudo foi também observado este fenómeno, que ocasionalmente levou à interrupção do fluxo devido ao entupimento das ligações entre a fonte de alimentação e o cateter de Foley. Na realidade, a diferença em termos de quantidade de incrustações cristalinas/biofilme entre os cateteres normais ou revestidos com fago, foi bem visível a olho nu (Figura 3.9). Apesar da diferença a olho nu, esta não se traduziu em diferenças estatisticamente significativas nem na redução da biomassa nem na redução da população viável.



Figura 3.9 - Incrustações cristalinas/biofilme observados no ponto 96 horas. (A) cateter de Foley normal; (B) cateter de Foley não revestido após formação de biofilme; (C) cateter de Foley revestido com fagos após formação de biofilme.

Outros autores já avaliaram a ação de fagos (coli-proteus e T4) na prevenção e erradicação de biofilmes de *E. coli* e *P. mirabilis* (Carson *et al.* 2010). Eles observaram boas

reduções na população dos biofilmes de *E. coli*, 3 a 4 logs com ambos os fagos, porém para *P. mirabilis* foi observado apenas 1 log de redução. Os autores acreditam que a obtenção desse resultado pode ser devida ao biofilme e fatores dependentes do fago, como por exemplo a produção de depolimerases e a capacidade para penetrarem a matriz de EPS. A depolimerase é uma enzima capaz de degradar polissacáridos da matriz, permitindo assim o acesso à superfície das bactérias (Hughes *et al.*, 1998). É possível que os fagos utilizados neste estudo não possuam depolimerases, o que poderia ajudar a explicar reduções inferiores às observadas para outras espécies. No entanto é de salientar que a redução do biofilme causada pelos fagos de *Proteus* utilizados neste estudo, foi visível para biofilmes maduros, um fenômeno pouco comum entre os fagos aplicados a amostras de biofilme (Sillankorva *et al.*, 2008).

3.2.6. Conclusão

Os biofilmes são responsáveis por várias patologias nos humanos, principalmente associadas a dispositivos médicos. A formação destes não é mais do que uma estratégia bacteriana de sobrevivência (Azeredo e Sutherland, 2008, O'Toole *et al.*, 2000). As bactérias da espécie *P. mirabilis* são um dos microrganismos mais comumente isolados em biofilmes de cateteres urinários (Carson *et al.*, 2010). Estes microrganismos têm assim a capacidade de colonizar as superfícies, neste caso os cateteres, formando biofilme. Estas bactérias possuem motilidade, o que faz com que sejam capazes de se movimentar nas superfícies, reverter o fluxo de urina até à bexiga, e assim causar infecções urinárias (Coker *et al.*, 2000). Para além disso, estas bactérias produzem urease, que por sua vez gera amónia elevando o pH da urina e do biofilme. Isto leva à formação de cristais, que associados às bactérias aderidas (biofilme) levam ao entupimento dos cateteres (Stickler *et al.*, 2006). Todas estas características podem ser uma das causas da dificuldade em combater as infecções urinárias associadas a cateteres causadas por esta bactéria.

Por sua vez, os fagos são vírus que apenas atacam as bactérias, mais propriamente os seus hospedeiros. Estes organismos simples encontram-se largamente distribuídos na natureza, e podem apresentar-se como uma solução no combate dos biofilmes (Azeredo e Sutherland, 2008, Yele *et al.*, 2012).

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito do revestimento de superfícies com partículas fágicas na prevenção da formação de biofilme por *P. mirabilis*. Os fagos vB_PmiM_CEB5461 e vB_PmiP_CEB5460 pareceram causar uma ligeira redução do biofilme,

apesar de terem um efeito preferencial em estirpes diferentes. Quanto ao revestimento das superfícies, o revestimento sem funcionalização da superfície mostrou-se mais eficiente.

Apesar das diferenças visíveis a olho nu (em termos de biofilme e incrustações) no modelo contínuo, os ensaios realizados em cateter de Foley não foram conclusivos pois, apesar da redução aparente na população viável, não foram observadas reduções estatisticamente significativas. Todavia, os resultados obtidos neste ensaio apenas dizem respeito a dois ensaios independentes, sendo que a repetição do mesmo poderia eventualmente proporcionar resultados mais conclusivos.

3.3. Referências

- ARAGON, L. M., MIRELIS, B., MIRO, E., MATA, C., GOMEZ, L., RIVERA, A., COLL, P. & NAVARRO, F. 2008. Increase in beta-lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB- and inhibitor-resistant TEM-type beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 61, 1029-32.
- AZEREDO, J. & SUTHERLAND, I. W. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol*, 9, 261-6.
- BJERKAN, G., WITSO, E. & BERGH, K. 2009. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop*, 80, 245-50.
- BROOKS, T. & KEEVIL, C. W. 1997. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 24, 203-6.
- CADEMARTIRI, R., ANANY, H., GROSS, I., BHAYANI, R., GRIFFITHS, M. & BROOK, M. A. 2010. Immobilization of bacteriophages on modified silica particles. *Biomaterials*, 31, 1904-10.
- CARSON, L., GORMAN, S. P. & GILMORE, B. F. 2010. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 447-455.
- COKER, C., POORE, C. A., LI, X. & MOBLEY, H. L. 2000. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect*, 2, 1497-505.
- DITIZIO, V., FERGUSON, G. W., MITTELMAN, M. W., KHOURY, A. E., BRUCE, A. W. & DICOSMO, F. 1998. A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials*, 19, 1877-84.
- DRENKARD, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 5, 1213-9.
- DUCKHOUSE, H., MASON, T. J., PHULL, S. S. & LORIMER, J. P. 2004. The effect of sonication on microbial disinfection using hypochlorite. *Ultrason Sonochem*, 11, 173-6.
- FOLADORI, P., LAURA, B., GIANNI, A. & GIULIANO, Z. 2007. Effects of sonication on bacteria viability in wastewater treatment plants evaluated by flow cytometry-fecal indicators, wastewater and activated sludge. *Water Res*, 41, 235-43.

- FRANZ, M. & HORL, W. H. 1999. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. II: clinical management. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 2754-62.
- FU, W., FORSTER, T., MAYER, O., CURTIN, J. J., LEHMAN, S. M. & DONLAN, R. M. 2010. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 397-404.
- HUGHES, K. A., SUTHERLAND, I. W. & JONES, M. V. 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 144 (Pt 11), 3039-47.
- INSTITUTE, C. A. L. S. 2006. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.
- JOHNSON, J. R., BERGGREN, T. & CONWAY, A. J. 1993. Activity of a nitrofurazone matrix urinary catheter against catheter-associated uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 2033-6.
- JONES, B. V., MAHENTHIRALINGAM, E., SABBUBA, N. A. & STICKLER, D. J. 2005. Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J Med Microbiol*, 54, 807-13.
- JORGENSEN, J. H. & FERRARO, M. J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 49, 1749-55.
- JOYCE, E., AL-HASHIMI, A. & MASON, T. J. 2011. Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *J Appl Microbiol*.
- LEVERING, V., WANG, Q., SHIVAPOOJA, P., ZHAO, X. & LÓPEZ, G. P. 2014. Soft Robotic Concepts in Catheter Design: an On-Demand Fouling-Release Urinary Catheter. *Advanced Healthcare Materials*, 3, 1588-1596.
- LUZZARO, F., PERILLI, M., AMICOSANTE, G., LOMBARDI, G., BELLONI, R., ZOLLO, A., BIANCHI, C. & TONIOLO, A. 2001. Properties of multidrug-resistant, ESBL-producing *Proteus mirabilis* isolates and possible role of β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 131-135.
- MONSEN, T., LOVGREN, E., WIDERSTROM, M. & WALLINDER, L. 2009. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol*, 47, 2496-501.
- MORRIS, C. E., MONIER, J. M. & JACQUES, M. A. 1998. A technique To quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4789-95.
- O'HARA, C. M., BRENNER, F. W. & MILLER, J. M. 2000. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev*, 13, 534-46.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H. B. & KOLTER, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79.
- PIERCE, C. G., UPPULURI, P., TRISTAN, A. R., WORMLEY, F. L., JR., MOWAT, E., RAMAGE, G. & LOPEZ-RIBOT, J. L. 2008. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, 3, 1494-500.

- ROZALSKI, A., SIDORCZYK, Z. & KOTELKO, K. 1997. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 65-89.
- SAITO, R., SATO, K., KUMITA, W., INAMI, N., NISHIYAMA, H., OKAMURA, N., MORIYA, K. & KOIKE, K. 2006. Role of type II topoisomerase mutations and AcrAB efflux pump in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother*, 58, 673-7.
- SILLANKORVA, S., NEUBAUER, P. & AZEREDO, J. 2008. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnol*, 8, 79.
- SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. & AZEREDO, J. 2010. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol*, 59, 747-54.
- STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B. & SVABIC-VLAHOVIC, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40, 175-9.
- STEWART, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 292, 107-13.
- STEWART, P. S. & COSTERTON, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358, 135-8.
- STICKLER, D. J., LEAR, J. C., MORRIS, N. S., MACLEOD, S. M., DOWNER, A., CADD, D. H. & FEAST, W. J. 2006. Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. *J Appl Microbiol*, 100, 1028-33.
- SUTHERLAND, I. W., HUGHES, K. A., SKILLMAN, L. C. & TAIT, K. 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 232, 1-6.
- WACHINO, J., YAMANE, K., SHIBAYAMA, K., KUROKAWA, H., SHIBATA, N., SUZUKI, S., DOI, Y., KIMURA, K., IKE, Y. & ARAKAWA, Y. 2006. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 178-84.
- YELE, A. B., THAWAL, N. D., SAHU, P. K. & CHOPADE, B. A. 2012. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*. isolation, characterization and its effect on biofilm. *Arch Virol*, 157, 1441-50.

Capítulo 4

Conclusão final e sugestão de trabalho futuro

Capítulo 4 - Conclusão final e sugestões de trabalho futuro

Este trabalho teve como objetivo a caracterização de novos fagos de *P. mirabilis*, vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461, pertencentes a famílias diferentes, *Podoviridae* e *Myoviridae*, respetivamente; e a avaliação da sua ação na prevenção da formação de biofilmes.

Estes fagos foram isolados recentemente de efluente de ETAR e, para alargar o conhecimento das suas características, foram estudados, no âmbito deste trabalho, os seguintes parâmetros: perfil de crescimento e replicação; perfis proteicos; resistência a um método mecânico de remoção; e capacidade de adsorção a superfícies poliméricas.

Estes estudos mostraram que o fago vB_PmiM_CEB5461 possui um espectro lítico mais amplo, sendo capaz de infetar todas as estirpes de *P. mirabilis* testadas. Por sua vez, o fago vB_PmiP_CEB5460 tem um maior *burst size* (número de fagos libertados por célula infetada), resiste melhor à sonicação e adere, de uma forma geral, melhor à superfície polimérica estudada - o silicone.

Dos dois processos de adsorção testados, com ou sem funcionalização prévia das superfícies, verificou-se que ambos permitiram a adesão dos fagos. No entanto a adsorção sem funcionalização permitiu um revestimento mais estável. Quanto à libertação de fagos da superfície não funcionalizada, verificou-se uma pequena libertação (inferior a 1%) de fago vB_PmiP_CEB5460 ao contrário do que ocorreu com o fago vB_PmiM_CEB5461 em que houve libertação de praticamente toda a população às 2 horas. Já nas superfícies previamente funcionalizadas, a ligação foi menos estável, mesmo para o fago vB_PmiP_CEB5460, havendo libertação da maioria das partículas nas primeiras duas horas.

Foi necessário caracterizar a capacidade de formação de biofilme de todas as estirpes de *P. mirabilis* presentes no estudo, bem como avaliar a sua suscetibilidade a antibióticos. Apenas duas estirpes (*P. mirabilis* SGSC 5449 e 5446) foram classificadas como fortes formadoras de biofilme, porém foram suscetíveis à maioria dos antimicrobianos testados. No entanto, estando as estruturas de biofilme muito associadas a uma extraordinária resistência a antimicrobianos, seguiu-se o estudo com estas duas estirpes boas formadoras de biofilme.

A sonicação foi otimizada tanto para permitir a libertação de fagos como de bactérias (remoção do biofilme), de forma a permitir a sua quantificação sem afetar a viabilidade. A amplitude e o tempo que menos afetaram a viabilidade dos fagos e da bactéria foram, respetivamente, 22% e 5 segundos de sonicação.

Na prevenção da formação de biofilmes, os fagos apresentaram um efeito significativo na redução do biofilmes em condições estáticas apenas às 48 horas. Dos dois tipos de revestimentos testados, foram obtidos melhores resultados em superfícies não funcionalizadas. Quanto ao modelo contínuo em cateter de Foley, apesar das diferenças visíveis a olho nu, no que diz respeito a incrustações por cristais e biofilme, as diferenças em termos de biomassa total e população viável dos biofilmes, não foram estatisticamente significativas.

Posto isto, as sugestões de trabalho futuro passam por:

- Repetição de ensaios em modelo contínuo, de forma a aumentar o número de réplicas e a robustez dos resultados obtidos;
- Utilização dos fagos, na forma individual e/ou em cocktail, em simultâneo com agentes antimicrobianos no revestimento de superfícies, o que poderá culminar numa melhor eficácia na prevenção de biofilmes;
- Manipulação genética dos fagos, de forma a induzir a produção de depolimerases, que poderão potenciar a degradação da matriz do biofilme;
- Isolamento de novos fagos para a espécie de *P. mirabilis*;
- Utilização das endolisinas (enzima produzida pelos vírus que tem como função a degradação de peptidoglicano) dos fagos de *P. mirabilis* no revestimento de superfícies, que poderão eventualmente ter um efeito mais significativo nos biofilmes.

Anexos

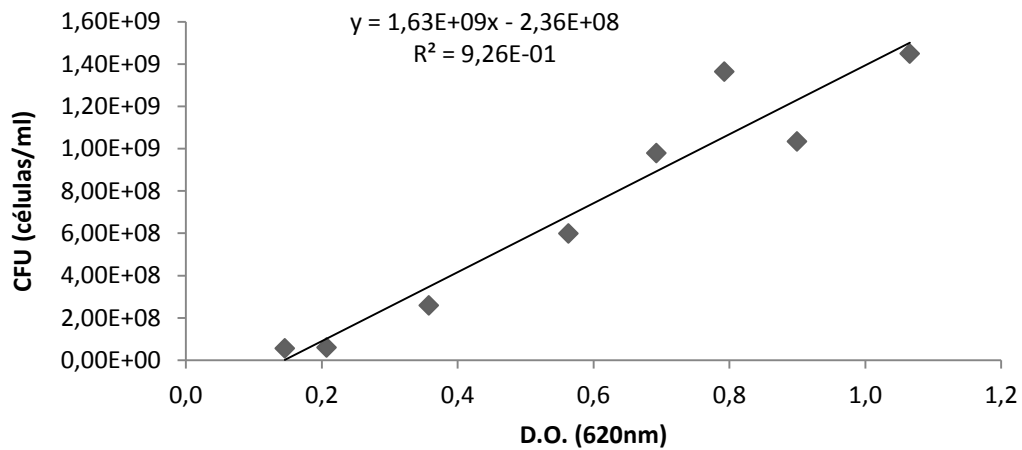
Anexo I

Figura A1 – Curva de calibração densidade ótica *versus* número de células viáveis para a estirpe *P. mirabilis* SGSC 5460. Através da curva de calibração, que relaciona a absorvância e a concentração celular, é possível determinar a MOI.

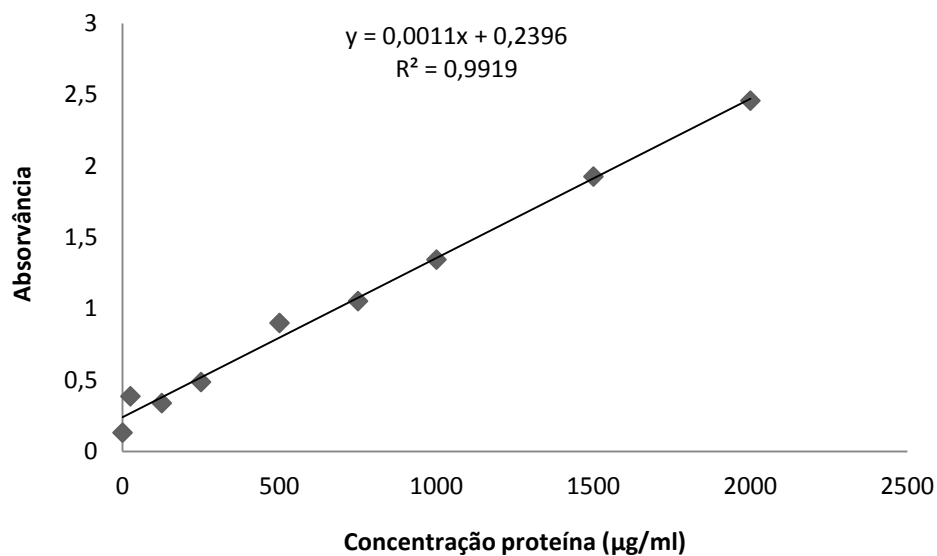


Figura A2 – Curva de calibração absorvância *vs* concentração de proteína para doseamento de proteína pelo método BCA.

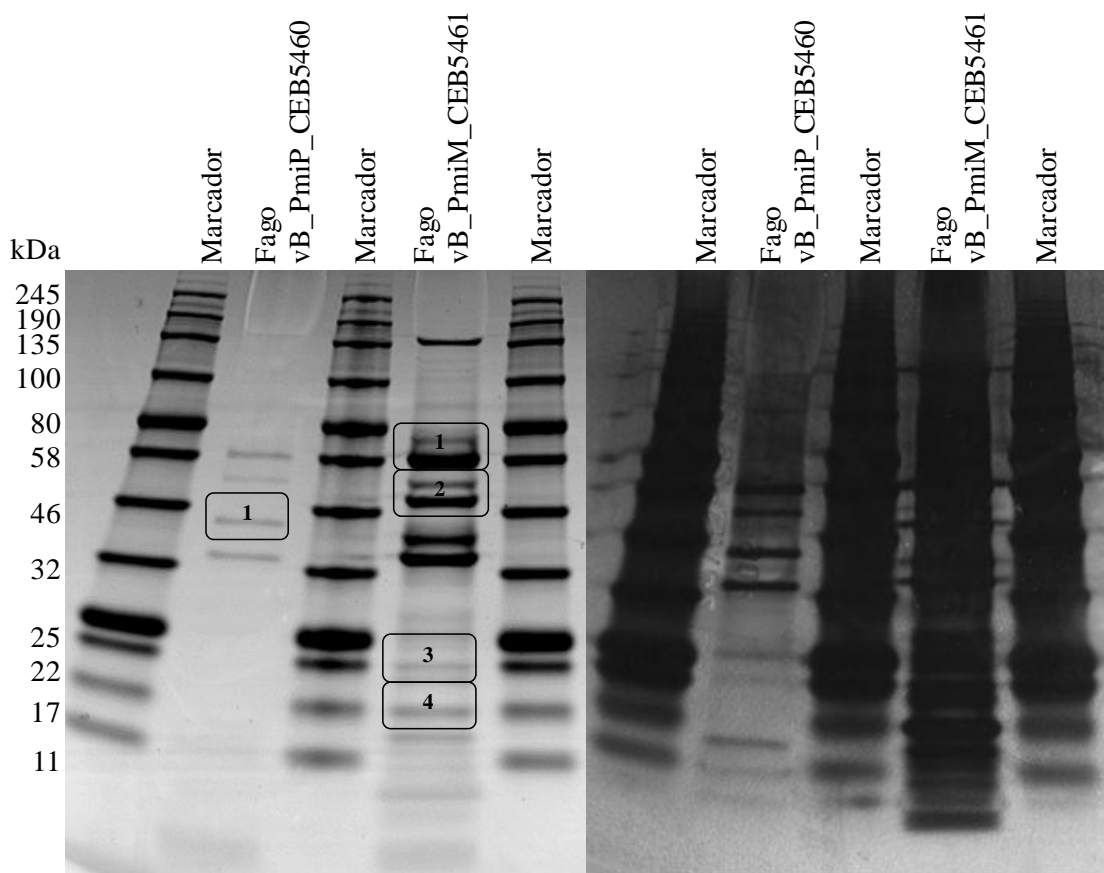
Anexo II

Figura A1 - Análise das proteínas estruturais dos fagos vB_PmiP_CEB5460 e vB_PmiM_CEB5461 por SDS-PAGE. À esquerda é possível visualizar o gel após coloração Azul de Coomassie e à direita é apresentado o mesmo gel após coloração com nitrato de prata.

Anexo IIITabela A1 – *Breakpoints* dos vários antibióticos testados.

Antibiótico	Sensível ≤	Intermédio	Resistente >
Amicacina	8	16	16
Amoxicilina	8	-	8
Ampicilina	8	-	8
Cefotina	8	16	32
Ciprofloxacina	0,5	1	1
Fosfomicina	32	-	32
Gentamicina	2	4	4
Ácido nalidíxico	16	-	16