

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO MESQUITA FILHO”**

**UNESP**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**Câmpus de Araraquara**

**Avaliação de biofilme de *Proteus mirabilis* em modelo experimental de fluxo dinâmico**

**GABRIELA MARIA PAVAN DE ARRUDA CAMARGO**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISABETH LOSHCHAGIN  
PIZZOLITTO**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS  
PIZZOLITTO**

**ARARAQUARA  
2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**Estudo de biofilme de *Proteus mirabilis* em modelo  
experimental de fluxo dinâmico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, câmpus de Araraquara, para a obtenção do título de Doutor.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ELISABETH LOSHCHAGIN PIZZOLITTO**

**Co-orientador: Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PIZZOLITTO**

**ARARAQUARA**

**2006**

Ficha Catalográfica

**Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e**

Camargo, Gabriela Maria Pavan de Arruda

C172a      Avaliação de biofilme de *Proteus mirabilis* em modelo experimental de fluxo dinâmico. / Gabriela Maria Pavan de Arruda Camargo. – Araraquara, 2006.  
103 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas

Orientador: Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Co-orientador: Antonio Carlos Pizzolitto

.      1.Biofilme. 2. *Proteus mirabilis*. 3.Incrustação. 3. Urina. 4.Cateter de Foley. I. Pizzolitto, Elisabeth Loshchagin, orient.. II.Pizzolitto, Antonio Carlos, co-orient.. III. Título.

**CDD: 576**

**CAPES: 40300005**

Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araraquara-UNESP e de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Instituto de Química, campus de Araraquara-UNESP.

Esta pesquisa está vinculada à linha de pesquisa Interação Parasita Hospedeiro, do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, curso de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

O projeto desta pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética sob o protocolo no 20/2003 e de acordo com o parecer no 26/2003, emitido foi considerado adequado em conformidades com as orientações constantes da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e de parecer favorável à sua execução.

O projeto desta pesquisa recebeu apoio financeiro pela FUNDUNESP Processo: 01288/04- DFP

Aos meus pais, Luiz Antônio e Vera Helena, pelo amor,  
dedicação e incentivo durante todas as fases da minha vida.

Aos meus irmãos: Rodrigo, Graziela e Diogo pelo estímulo e carinho.

Ao Jung, por seu companheirismo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisabeth Loshchagin Pizzolitto, por seus preciosos ensinamentos e exemplo de profissionalismo e amor à ciência. Acima de tudo, meu eterno reconhecimento por sua generosidade, paciência, amizade e constante incentivo durante a realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pelos caminhos e oportunidades, e principalmente por ter me conduzido através deles ao encontro de pessoas especiais.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, que muito gentilmente me acolheu e contribuiu de maneira grandiosa para que este trabalho fosse realizado.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela amizade e pronta disponibilização de estrutura e equipamentos indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

À Benedita Reis de Abreu, funcionária do setor de Microbiologia Clínica pelo apoio e colaboração.

À Marcos A. Dangona funcionário do departamento de Bioquímica e Enzimologia pelo auxílio prestado e pelas palavras de incentivo.

À Sebastião Anésio Dametto pela colaboração prestada em relação ao Microscópio Eletrônico de Varredura, no Instituto de Química.



Aos funcionários da Biblioteca-FCF, em especial à Maria Irani Coito, Ana Lucia Minale Barbosa da Silva e Moacir Flávio Gomes pela atenção e auxílio na elaboração desta dissertação.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Cláudia Lúcia Molina, Sônia Ornellas Silva e Laura Rosim pela atenção constante e gentil atendimento.

Ao meu amigo Armando Sambataro

Aos amigos Ivone Anno, Luis Gustavo Monnazzi, Ana Carolina Malaspina, Alessandro Guerta Pires, Rose Costa Ferraz, Lílian Oliveira. A agradável surpresa de poder compartilhar com vocês momentos de descontração, estudo, alegria, decepções e amizade, sem dúvida, foram de grande ajuda na realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho.

A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.

Aristóteles, 350 AC.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>14</b>
<b>RESUMO</b>	<b>16</b>
1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
3. PROPOSIÇÃO	38
4. MATERIAL E MÉTODO	39
4.1. MATERIAL	39
4.1.1. Cateter	39
4.1.2. Equipamentos e materiais utilizados na construção do modelo de bexiga artificial	40
4.1.3. Meios de cultura e reagentes	40
4.1.4. Urinas humanas	41
4.1.5. Microrganismo	42
4.1.6. Análise estatística	42
4.2. MÉTODOS	43
4.2.1. Modelo de bexiga artificial	43
4.2.2. Procedimento para operação do modelo de bexiga artificial	44
4.2.3. Composição das urinas	46
4.2.3.1. Urina artificial segundo Stickler (AS)	46
4.2.3.2. Urina artificial segundo Tunney (AT)	47
4.2.3.3. Urina humana (UH)	48
4.2.4. Estocagem do microrganismo	49
4.2.5. Inóculo	49

4.2.6.	Contagem do número de células viáveis de <i>P. mirabilis</i>	50
4.2.7.	Preparação dos segmentos de cateter para observação por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura de acordo com Pizzolitto et al.	51
4.2.8.	Perfil da alteração no peso dos segmentos do cateter	53
5.	RESULTADOS	54
5.1.	Modelo de bexiga artificial	54
5.2.	Bloqueio do cateter uretral pela formação de biofilme de <i>P. mirabilis</i> com a urina AS	57
5.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura dos segmentos do cateter uretral após canalização da urina AS	58
5.4.	Peso dos segmentos dos cateteres após 60 a canalização da urina AS com e sem a inoculação de <i>P.mirabilis</i>	
5.5.	Bloqueio do cateter uretral pela formação de biofilme de <i>P. mirabilis</i> com a urina AT	62
5.6.	Microscopia Eletrônica de Varredura dos segmentos do cateter uretral após canalização da urina AT	63
5.7.	Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina AT com e sem a inoculação de <i>P.mirabilis</i>	65
5.8.	Bloqueio do cateter uretral pela formação de biofilme de <i>P. mirabilis</i> com a urina UH	67
5.9.	Microscopia Eletrônica de Varredura dos segmentos do cateter uretral após canalização da urina UH	68
5.10.	Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina UH com e sem a inoculação e <i>P.mirabilis</i>	70
5.11.	Média dos resultados obtidos com as urinas artificiais AS, AT e urina humana UH	72
5.12.	Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização das urinas AS, AT e UH após a inoculação de <i>P.mirabilis</i>	75

6.	DISCUSSÃO	77
7.	CONCLUSÕES	89
8.	REFERÊNCIAS	91
9.	ANEXOS	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados com a urina artificial AS	57
Tabela 2	Número de microrganismos no início e no final do experimento com a urina artificial AS	57
Tabela 3	Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina AS com e sem o inóculo de <i>P. mirabilis</i>	60
Tabela 4	pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados com a urina artificial AT	62
Tabela 5	Número de microrganismos no início e no final do experimento com a urina artificial AT	62
Tabela 6	Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina AT com e sem o inóculo de <i>P. mirabilis</i>	65
Tabela 7	pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados com a urina artificial UH.	67
Tabela 8	Número de microrganismos no início e no final do experimento com a urina artificial UH	67
Tabela 9	Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina UH com e sem o inóculo de <i>P. mirabilis</i>	70
Tabela 10	pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio dos cateteres testados com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH.	73
Tabela 11	Média do número de microrganismos no início e no final do experimento com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH.	74
Tabela 12	Peso dos segmentos dos cateteres após os experimentos com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH após a contaminação com o <i>P. mirabilis</i>	75

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reações químicas envolvidas no processo de formação de estruvita e carbonato apatita	29
Figura 2	Cateter de Foley	39
Figura 3	Esquema representativo do modelo da bexiga cateterizada	44
Figura 4	Esquema representativo da segmentação do cateter para a obtenção de amostras para Microscópio Eletrônico de Varredura	51
Figura 5	Foto representativa do modelo da bexiga cateterizada	54
Figura 6	Início do experimento com a urina límpida antes da introdução do inóculo	55
Figura 7	Algumas horas após a introdução do inóculo a turvação do meio com a urina fluindo pelo “olho” do cateter	55
Figura 8	Oclusão do “olho” do cateter, a urina não flui mais para a bolsa de drenagem e começa a recobrir o cateter	56
Figura 9	Cateter removido. As incrustações responsáveis pelo bloqueio do cateter são visíveis e o “olho” do cateter mostra-se recoberto	56
Figura 10	Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (2000x) (“olho”do cateter).	58
Figura 11	Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (2000x) (balão de retenção)	58
Figura 12	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter. (2000x)	59
Figura 13	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (5000x)	59
Figura 14	Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina AS e da urina AS contaminada com o <i>P. mirabilis</i>	61
Figura 15	Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (5000x) (“olho”do cateter)	63

Figura 16	Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (5000x)	63
Figura 17	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (5000x)	64
Figura 18	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (5000x)	64
Figura 19	Variação no peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina AT e da urina AT contaminada com o <i>P. mirabilis</i>	66
Figura 20	Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (2000x) (“olho” do cateter)	68
Figura 21	Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (2000x)	68
Figura 22	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (2000x)	69
Figura 23	Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (35000x)	69
Figura 24	Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina UH e da urina UH contaminada com o <i>P. mirabilis</i>	71
Figura 25	Média do tempo de bloqueio das urinas AS, AT e UH contaminadas com <i>P. mirabilis</i>	73
Figura 26	Distribuição das incrustações ao longo dos cateteres com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH após a contaminação com o <i>P. mirabilis</i>	76



## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de verificar a formação de incrustações e o bloqueio do cateter de Foley utilizando-se um modelo laboratorial de bexiga humana. Para tanto, foram utilizadas duas urinas artificiais de diferentes composições: a) urina AS composta por dez solutos em concentrações semelhantes as encontradas na urina humana de 24 horas, acrescida de gelatina; b) urina AT composta por 4 solutos também encontrados na urina humana, mas em concentrações maiores e suplementada com ovalbumina de galinha. Também foi utilizada a urina de 24 horas de três homens. As urinas contaminadas com o *P. mirabilis* foram bombeadas (0,5ml/min) para o frasco em que o cateter estava inserido até a oclusão do cateter. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada para verificar a presença de biofilme nos segmentos dos cateteres. Em seguida, foi determinado o tempo de bloqueio dos cateteres após a canalização com as três urinas, o número de células viáveis de *P. mirabilis* presentes no inóculo inicial e no final dos experimentos e o peso médio dos segmentos após a canalização com as urinas contaminadas. Houve alteração significativa no número de células viáveis no início e no fim do experimento para as urinas AS, AT e UH. O biofilme de *P. mirabilis* foi observado por MEV nos segmentos dos cateteres que canalizaram os três tipos de urina. Em outro experimento determinou-se o peso dos segmentos dos cateteres após a canalização das urinas sem a adição do microrganismo. Foi observado uma diferença significativa no peso dos segmentos dos cateteres após a canalização das urinas AS, AT e UH contaminadas com o *P. mirabilis* vs a canalização das urinas sem o microrganismo ( $p < 0,05$ ). O tempo de bloqueio dos cateteres que canalizaram a

urina AS vs urina AT e UH vs urina AT também foram diferentes ( $p < 0,05$ ). O tempo de bloqueio dos cateteres, o número de células viáveis presentes no inóculo inicial e no momento do bloqueio do cateter, e variação no peso dos segmentos dos cateteres após a canalização com as urinas sem a adição do *P. mirabilis* e contaminadas com o *P. mirabilis* não foram diferentes para as urinas AS, AT e UH. As três urinas examinadas mostraram a estabilização do *P. mirabilis* e a manutenção em  $10^8$  UFC/ml bem como a formação de biofilme. Os cateteres que canalizaram a urina AS e UH apresentaram tempos semelhantes de bloqueio. Os cateteres que utilizaram a urina AT foram bloqueados mais rapidamente ( $p < 0,05$ ). Não houve alteração de peso dos segmentos dos cateteres quando testados com o *P. mirabilis* entre as urinas.

Palavras-chave: Biofilme, *Proteus mirabilis*, Incrustação, Urina, Cateter de Foley

## ABSTRACT

The aim of the present work was to verify formation of encrustations and occlusion on Foley catheter using a laboratorial model of human bladder. Two artificial urines with different compositions were used: a) AS urine consisted by ten solutes in concentrations similar to those found in 24 hour human urine, added gelatin; b) AT urine consisted by four solutes, also found in human urine but in higher concentrations, and supplemented with chicken ovalbumin and UH 24 hour urine of three men. Urines contaminated with *P. mirabilis* were pumped (0,5ml/min) to flasks where the catheter was inserted reaching catheter occlusion. Scanning Electronic Microscopy (SEM) was used to check the presence of biofilms in catheter segments. The period of catheter occlusions after canalization was determined with the three urines, as well as the number of *P. mirabilis* viable cells present in the initial inoculum and in the end of the experiment. The median weight of the segments after canalization with contaminated urines was also determined. There were significant alterations about the number of viable cells in the beginning and in the end of the experiment with AS, AT and HU urines. *P. mirabilis* biofilm was observed by SEM in catheter segments that canalized the three types of urines. In another experiment, the weight of catheter segments was determined after urine canalization without microorganism addition. It was verified a significant difference in catheter segment weights after canalization of AS, AT and HU urines contaminated with *P. mirabilis* vs canalization of urines without microorganism ( $p < 0.05$ ). The period of catheter occlusions after canalization with AS urine vs AT and HU urines vs AT urines was also different ( $p < 0.05$ ). The period

of catheter occlusions, the number of viable cells present in the initial inoculum and in the moment of catheter occlusion, as well as the variation in catheter segment weights after canalization with urines without *P. mirabilis* addition and with contaminated urines were not different for AS, AT and HU urines. The three examined urines showed stabilization of *P. mirabilis*, maintenance of  $10^8$  CFU/ml as well as biofilm formation. Catheters that canalized AS and HU urines showed similar occlusion periods. Catheters using AT urine were occluded faster ( $p < 0.05$ ). There was no alteration in catheter segment weights when tested with *P. mirabilis* among urines.

Key-words: Biofilm, *Proteus mirabilis*, Encrustation, Urine, Foley Catheter

## 1. INTRODUÇÃO

A cateterização uretral de longa permanência desempenha um papel importante no tratamento de muitos pacientes e é particularmente relevante para aqueles que apresentam retenção urinária, obstruções da bexiga e doenças ou danos neurológicos. Contudo, a cateterização uretral de longa permanência raramente é livre de complicações; a formação de incrustações, responsável pelo bloqueio do cateter, ocorre em aproximadamente 40-50% dos pacientes cateterizados (KOELER-OCKMORE e FENELEY, 1996; GETLIFFE, 2003). As incrustações cobrem o balão, obstruem o olho e o lúmen do cateter e podem causar traumas na mucosa da bexiga e na uretra durante a retirada do cateter. O bloqueio do lúmen do cateter pode levar a retenção urinária e a uma distensão dolorosa da bexiga. A bacteriúria é inevitavelmente associada com a formação de incrustações e o bloqueio do cateter. A retenção da urina pode ocasionar o refluxo vesico-ureteral e facilitar a infecção ascendente do trato urinário culminando em episódios de pielonefrite, septicemia e choque (MORRIS e STICKLER, 1998a; STICKLER et al., 2002). Assim, a formação de incrustações não somente causa a falência do implante urológico pela obstrução do seu lúmen, mas também constitui-se em foco para a infecção (SCHIERHOLZ et al., 2002).

A incrustação é o resultado da cristalização dos componentes iônicos da urina sobre a superfície do cateter e sua incorporação na camada do biofilme bacteriano. Existe uma forte associação entre a colonização bacteriana dos cateteres urinários e a formação de incrustações (SHAW et al., 2005). O mecanismo de incrustação por meio da formação do biofilme tem sido estudado (CHOONG e WHITFIELD, 2000b) e apresentam os seguintes passos: a infecção

do trato urinário por *P. mirabilis* ou outras espécies produtoras de urease, a formação de um filme condicionante na superfície do cateter, a aderência das bactérias produtoras de urease no cateter, o desenvolvimento da comunidade bacteriana do biofilme, a elevação do pH da urina e matriz do biofilme pela ação da urease na uréia; a atração de íons de cálcio e magnésio na matriz, a indução alcalina e a cristalização estabilizada por gel do cálcio e fosfato amoníaco-magnésiano.

O microrganismo *Proteus mirabilis* é freqüentemente relacionado com cálculos associados à infecção e incrustações do cateter (STICKLER et al., 1998; LI e MOBLEY, 2002; SHAW et al., 2005; MATHUR et al., 2006). Este microrganismo não é a causa comum das infecções do trato urinário no hospedeiro normal, preferencialmente, infecta o trato urinário com anormalidades funcionais ou anatômicas ou pela instrumentação crônica como a cateterização. Em contato com uma superfície sólida ele sofre mudanças morfológicas dramáticas, de uma célula única, nadante, de forma bacilar para uma célula alongada multinuclear e multiflagelada, produtora de manta “swarming”. O *P. mirabilis* penetra no trato urinário via uretra ou cateter, atravessa e coloniza a bexiga e ascende dos ureteres para os rins, colonizando-os. Em alguns casos, ganha acesso aos capilares e estabelece uma bacteriemia (MOBLEY e BELAS, 1995; COKER et al., 2000). A urease é um fator de virulência essencial para esta bactéria, alcalinizando a urina e causando a precipitação de estruvita e apatita (DUMANSKI et al., 1994).

A variabilidade dos modelos humanos em termos de dieta, ingestão de líquidos, constituintes urinários e infecção por uma ampla taxa de microrganismos

dificulta a comparação dos biomateriais utilizados na manufatura dos cateteres. Os modelos animais são mais constantes em termos da sua reprodutividade, dieta e ingestão de líquidos, mas os constituintes urinários são variáveis. Os testes *in vitro* proporcionam um ambiente bastante utilizado para determinar a tendência a formação de incrustações nos biomateriais apresentando algumas vantagens sobre as triagens clínicas, já que a formação de incrustações não é influenciada pela dieta do paciente e medicação, ou por diferenças metabólicas individuais (CHOONG et al., 2000; MORRIS e STICKLER, 1998a).

Existem vários modelos para simular a formação de incrustação nos cateteres urinários. Esses modelos são classificados como de fluxo contínuo ou estático e podem utilizar urinas humanas ou urinas artificiais (TUNNEY et al., 1997; STICKLER et al., 1999; TUNNEY et al., 1999; CHOONG et al., 2000). No modelo estático, os biomateriais são colocados em um recipiente contendo urina e esta é trocada em intervalos regulares. No modelo de fluxo contínuo, uma bomba mantém um fluxo de urina constante (0,5-1,5ml/min) para o recipiente contendo a amostra a ser avaliada durante todo o experimento (SANTIN et al., 1999; CHOONG et al., 2000).

Em 1987, Cox et al. desenvolveram um modelo de fluxo contínuo com reposição diária de uma solução de urina artificial (COX et al.; 1987 apud TUNNEY et al., 1996). Na década de noventa, Schmitz et al. (1993) e Getliffe (1994) utilizaram frascos de vidro com cateteres instalados na parte inferior de cada frasco, para simular uma bexiga, a urina era bombeada para os frascos (bexiga) permitindo o escoamento da urina pelos cateteres para dentro de um saco coletor. Tunney et al. (1997) desenvolveram um modelo de urina artificial

com fluxo contínuo baseado no MRD (Modified Robbins Device) para simular as condições do trato urinário. Contrastando com esses modelos, Sarangapani et al. (1995) usaram um aparato de fluxo contínuo constituído de uma câmara de 500ml com urina contaminada com *P. mirabilis* na qual os materiais dos cateteres eram presos por fios de aço inoxidável. Em 1999, Stickler et al. desenvolveram um modelo de bexiga artificial cateterizada com a finalidade de estudar o processo de formação de incrustações nos cateteres urinários, em laboratório.

O desenvolvimento das incrustações e subsequente bloqueio do cateter continuam a ser, causas de complicações médicas nos pacientes cateterizados e, conseqüentemente causam maiores gastos ao nível de Saúde Pública. O desenvolvimento de um modelo de laboratório capaz de reproduzir as condições fisiológicas e hidrodinâmicas de uma bexiga humana cateterizada poderá fornecer maiores informações sobre o processo de formação de biofilmes e incrustações nos cateteres.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A cateterização urinária é um dos procedimentos médicos mais utilizados (JONES et al., 2006) e anualmente milhões de cateteres uretrais são usados na Europa e Estados Unidos (SCHIERHOLZ et al., 2002). Pacientes da comunidade e hospitalares podem necessitar de uma cateterização por várias razões como, por exemplo: retenção ou incontinência urinária aguda ou crônica, drenagem da bexiga hipotônica ou neurogênica, investigação urodinâmica, irrigação da bexiga e também pós ou pré-operatório (ROBINSON, 2001).

É desconhecido o fato de quando ou aonde a primeira cateterização foi realizada ou por quem. A referência mais antiga sobre o cateter foi descoberta nos Aforismos de Hipócrates (400 AC) no qual o cateter é descrito como um tubo para drenar fluidos das cavidades corporais (ELVES e FENELEY, 1997; MOOG et al., 2005). Através dos séculos, diversos materiais como talos de junco, cebola e metais como o cobre e a prata foram utilizados para a sua confecção. Em 1779, Bernard introduziu o primeiro cateter de borracha flexível. Em 1934, Frederick Foley inventou um cateter com um balão inflável próximo à ponta e com um canal separado para a insuflação de água, mantendo assim o cateter posicionado dentro da bexiga. Atualmente, os cateteres uretrais são confeccionados de diversos materiais, mas o design padrão continua o mesmo desenvolvido por Foley (ELVES e FENELEY, 1997; LAWRENCE e TURNER, 2006).

O cateter urinário é uma ferramenta médica essencial, no entanto, quando usado inapropriadamente ou por longos períodos, ele representa um fator de risco para a aquisição de infecção do trato urinário (KUNIN, 2001). Dukes

(1929) foi o primeiro a fazer a ilação entre infecções do trato urinário e a cateterização. Observou que os pacientes submetidos à cirurgia para a extração do câncer do reto, invariavelmente contraíam infecção no trato urinário deduzindo que não era a operação que predispunha os pacientes à infecção, mas sim a cateterização urinária. O interesse sobre a relação entre as infecções do trato urinário e cateterização foi estimulado, principalmente, pelo trabalho de Beeson (1958) que demonstrou que as bactérias podem ser transferidas da uretra para a bexiga durante a passagem do cateter. Em 1982, Platt et al. realizando um estudo com 1485 pacientes cateterizados observaram que a presença de bacteriúria ( $>10^5$ UFC/ml) durante a cateterização estava associada com um aumento de três vezes na taxa de mortalidade. Similarmente, Kunin et al. (1992), estabeleceram que os pacientes cateterizados tinham uma probabilidade três vezes maior de morrerem ao final de um ano do que os pacientes não cateterizados. Durante a cateterização do trato urinário as bactérias podem ser levadas para a bexiga pela parede externa do cateter, que fica em contato com a uretra, enquanto que, *in situ*, ele facilita o acesso da bactéria para a bexiga pela via intraluminal ou pela retenção extraluminal das bactérias entre o lado externo do cateter e a parede da uretra (MAKI e TAMBYAH, 2001). A infecção do trato urinário associada ao uso de cateter é o tipo mais comum de infecção hospitalar, respondendo por 40% dessas infecções e pela maioria dos 900.000 pacientes com bacteriúria nosocomial a cada ano nos Estados Unidos (JOHNSON et al., 2006). Um amplo espectro de espécies bacterianas pode colonizar a bexiga dos pacientes cateterizados (STICKLER, 2002). O trato urinário dos pacientes cateterizados é altamente sensível a infecção. Concentrações de microrganismos entre 100 a 10.000

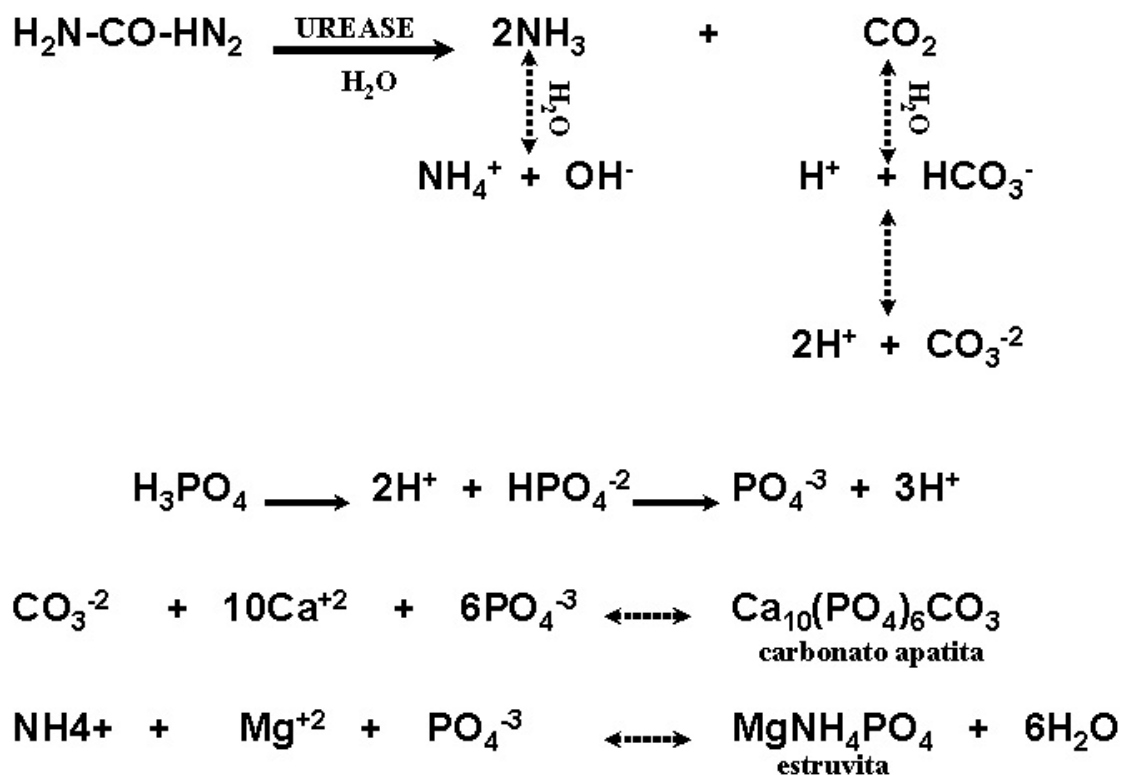
UFC/ml de urina progridem para altas contagens  $\geq 10^5$ UFC/ml dentro de 24-48 horas (STARK e MAKI, 1984). Nos estágios iniciais da cateterização, a infecção é devida a espécies únicas de bactérias como o *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. Quanto maior o tempo de cateterização maior é a variedade de microrganismos que se acumulam na bexiga. Pacientes cateterizados por longo tempo podem tornar-se infectados por comunidades mistas, principalmente por Gram-negativos como a *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* (STICKLER, 2002).

Entre os patógenos causadores de infecção no trato urinário algumas espécies são capazes de produzir a enzima urease, como o: *Proteus* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus* sp. (GRIFFITH e OSBORNE, 1987; HEDELIN, 2002). As espécies de *Proteus* correspondem a 70% de todas as bactérias isoladas dos cálculos urinários (COKER et al., 2000; TORZEWSKA, et al., 2003). Os pacientes cateterizados por longo tempo podem apresentar infecções por microrganismos produtores de urease e geralmente apresentam o desenvolvimento de cálculos urinários de estruvita ( $MgNH_4PO_4$ ) e carbonato apatita [ $Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$ ] (McLEAN et al., 1996). Estes cálculos correspondem a somente 5-10% de todos os cálculos urinários (MORTON et al., 2002), mas estão associadas com uma substancial morbidade, como hemorragias e obstrução do fluxo urinário. Os cálculos associados à infecção compostos de fosfato amoníaco-magnésiano também são denominados de estruvita e fosfato triplo e os de carbonato de cálcio de apatita ou carbonato apatita (BIHL e MEYERS, 2001).

O primeiro relato sobre os cálculos associados às infecções do trato urinário foi encontrado em uma sepultura na Idade do Bronze na Hungria (BICHLER et al., 2002). No início de 1797, Wollaston relatou que estes cálculos eram compostos de fosfato amoníaco-magnésiano (WOLLASTON et al., 2002). Na metade do século XIX, Ulex, geólogo sueco, descobriu fosfato amoníaco-magnésiano e o denominou de estruvita em homenagem ao seu amigo e mentor, von Struve (1772-1851), um diplomata russo e naturalista (GRIFFITH e OSBORNE, 1987). Em 1817, Marcet salientou que “a alcalinização que acompanha a putrefação da urina resulta em cristalização dos fosfatos urinários dissolvidos” (GRIFFITH, 1982). A associação entre infecção urinária e formação de cálculos foi reconhecida pela primeira vez por Horton Smith em 1897 (CHOONG e WHITFIELD, 2000b). Outra importante contribuição para o entendimento da origem dos cálculos associados à infecção foi dado por Brown em 1901, com o desenvolvimento da teoria de que as bactérias degradam a urina e facilitam a formação de cálculos urinários. Seus pacientes tinham cálculos constituídos de fósforo e carbono combinado com o cálcio e magnésio, dos quais conseguiu isolar o *Proteus vulgaris* do núcleo de um cálculo urinário (BICHLER et al., 2002). Hager e Magath (1925), sugeriram que a enzima “urease” seria a causa da hidrólise da urina. Um ano depois, Sumner (1926) foi bem sucedido no isolamento e purificação desta enzima a partir da *Canavalia ensiformis* (feijão de porco). Um estudo realizado por Braude e Siemienski (1960) sobre o papel da urease bacteriana na pielonefrite mostrou que o *P. mirabilis* alcalinizava os rins levando a precipitação de estruvita com a conseqüente formação de cálculos. Griffith et al., (1976), realizaram vários experimentos para estudar o papel da urease bacteriana

na formação dos cálculos e demonstraram que: (1) na urina estéril tanto humana quanto sintética quando inoculada com *P. mirabilis* ou urease de *jack bean* (feijão de porco) ocorria a alcalinização do meio, supersaturação e conseqüente precipitação de cristais de estruvita e apatita nas bolas de vidro; (2) as mesmas urinas quando inoculadas com microrganismos fracamente ou não produtores de urease não formavam cristais de estruvita e apatita nem ocorria a alteração do pH urinário, mostrando assim o papel central das bactérias produtoras de urease na geração de cálculos na bexiga e nos rins. Similarmente, Stegmayr e Stegmayr (1983) mostraram a perda de solubilidade e conseqüente precipitação dos íons de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  na urina quando inoculada com cepas de *Proteus*. O exame, pela microscopia eletrônica de varredura, realizado por Takeuchi et al. (1984), em cálculos retirados de pacientes com infecção urinária confirmou a presença de células microbianas por toda sua estrutura.

A formação de estruvita e carbonato apatita se inicia com a hidrólise da uréia pela urease microbiana formando amônia e dióxido de carbono. A amônia é novamente hidrolisada formando íons amônio e hidróxido, alcalinizando o meio. Com a urina alcalinizada diminui a solubilidade dos íons magnésio e cálcio e a curva de dissociação do ácido fosfórico desloca-se para a direita formando mais fosfatos. Simultaneamente o dióxido de carbono é hidrolisado e ocorre um equilíbrio na formação de íon carbonato e bicarbonato. Sob estas condições, e a abundância de  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  ocorre a precipitação da estruvita e carbonato apatita.



**Figura 1:** Reações químicas envolvidas no processo de formação de estruvita e carbonato apatita

Em 2002, Li et al. realizaram um experimento em que uma cepa selvagem de *Proteus mirabilis* foi comparada com um mutante urease-negativo. Ratos cateterizados e não cateterizados foram infectados com inóculos de diferentes concentrações das duas cepas e os resultados mostraram que quando infectados com a cepa selvagem de *P. mirabilis* os ratos cateterizados eram mais suscetíveis a uma infecção ascendente do trato urinário comparados com os não cateterizados; e que também os ratos cateterizados apresentavam maior formação de cálculos. Quando infectados com a cepa mutante os ratos cateterizados foram mais suscetíveis que os não cateterizados à colonização da bexiga pelo *P. mirabilis*, mas não dos rins e em ambos os grupos não houve a formação de cálculos.

A cateterização uretral de longa duração desempenha papel importante no tratamento de muitos pacientes e, é especialmente importante para os que apresentam dificuldades em esvaziar a bexiga. A incrustação e o bloqueio do lúmen do cateter devido a presença de sais minerais é a complicação mais comum, ocorrendo em aproximadamente 40-50% dos pacientes cateterizados. Mais de 50% dos pacientes cateterizados por períodos superiores a 28 dias apresentam o bloqueio recorrente dos cateteres (KUNIN, 1987; GETLIFFE e MULHAL, 1991; KOELER-OCKMORE e FENELEY, 1996; GETLIFE, 2003; CHAKRAVARTI et al., 2005; MATHUR et al., 2006). O biofilme e os cristais podem cobrir o balão, obstruir o olho e o lúmen do cateter causando traumas na mucosa da bexiga e na uretra durante a remoção. O bloqueio do lúmen do cateter pode levar a retenção da urina, distensão dolorosa da bexiga e incontinência urinária em decorrência do bloqueio da passagem de urina. A bacteriúria está associada com a incrustação e o bloqueio do cateter. A retenção da urina pode facilitar a infecção ascendente do trato urinário culminando em episódios de pielonefrite, septicemia e choque (MORRIS e STICKLER, 1998a; MORRIS e STICKLER, 1998b). Há vários anos sabe-se que a incrustação não somente causa a falência de um implante urológico pela obstrução do seu lúmen, mas também constitui-se em foco para a infecção (SCHIERHOLZ et al., 2002).

A associação entre cateterização de longa duração e incrustação é conhecida desde a década de 70 (BROCKLEHURST e BROCKLEHURST, 1978; BRUCE et al., 1974; NORBERG et al., 1980). Bruce et al. (1974) pela utilização de métodos químicos encontraram altas concentrações de cálcio, fósforo e

magnésio nas incrustações dos cateteres usados por pacientes com infecção urinária por *Proteus* sp. No entanto, somente em 1983, Hukins et al. por meio da análise por raio X identificaram a estruvita como o único componente da incrustação. Em 1984, Hedelin et al. usando outras técnicas observaram que as incrustações além da estruvita continham também fosfato de cálcio. Três anos depois, em 1987, Mobley e Warren mostraram que a presença de *P. mirabilis* na urina estava associada com a obstrução do cateter. Cox et al. (1989a) investigando a associação entre bactéria e incrustação, nos cateteres, descobriram biofilmes bacterianos sob camadas de estruvita circundadas por carbonato apatita. Em 1989, Kunin observou que os pacientes cujos cateteres apresentavam bloqueio por incrustação eram significativamente mais colonizados por *P. mirabilis* e *Providencia stuartii* do que aqueles que não apresentavam bloqueio e também que a urina dos pacientes com bloqueio dos cateteres era mais alcalina e apresentava quantidades menores de cálcio, magnésio e fosfato. Hedelin et al. (1991), mostraram que a infecção persistente por *P. mirabilis* estava associada com a elevação do pH urinário e a presença de incrustações no cateter. Stickler et al. (1993), analisando 75 cateteres usados por um período de 3-83 dias observaram que 69 cateteres apresentavam biofilme e entre esses, aqueles cuja análise bacteriana evidenciou o *P. mirabilis* apresentavam incrustações.

Tem sido proposta uma analogia entre o desenvolvimento de “cálculos associados à infecção” e a formação de incrustações no cateter (GETLIFE e MULHAL, 1991). Os cálculos associados à infecção e incrustações no cateter têm uma causa comum - microrganismos produtores de urease (COX et al.,



1989a e HEDELIN, 2002). O mecanismo de formação de incrustações por microrganismos produtores de urease no cateter é idêntico à formação de cálculos associados à infecção (TUNNEY, et al., 1999).

As incrustações e o bloqueio dos cateteres urinários estão envolvidos com a produção de biofilme bacteriano, nos quais são observados células bacterianas, glicocálice e cristais. O estudo do mecanismo de formação de incrustação por meio da formação do biofilme apresenta os seguintes passos: (1) adsorção de proteínas na superfície do cateter (2) deposição de eletrólitos e moléculas orgânicas no substrato protéico (3) aderência das bactérias produtoras de urease no cateter (4) desenvolvimento da comunidade bacteriana e a formação de matriz de polissacarídeos extracelulares (5) alcalinização da urina e matriz do biofilme pela ação da urease na uréia; (6) atração de íons de cálcio e magnésio para a matriz; (7) estabilização dos cristais de cálcio e fosfato amoníaco-magnésiano com a matriz do biofilme (BURR e NUSEIBEH, 1995; CHOONG e WHITFIELD, 2000b; SOFER e DENSTDET, 2000; BEIKO et al., 2004).

Antes de ser inserido, o cateter urinário é uma superfície limpa e estéril, mas, imediatamente após sua inserção, os fluidos corporais envolvem o cateter. Os componentes urinários como: proteínas, íons e polissacarídeos aderem à superfície do cateter e formam um filme condicionante, alterando as características da superfície e fazendo com que as bactérias percebam os componentes dos filmes e aproximem-se do cateter. Por exemplo, a presença comum dos íons de sódio ou magnésio na urina pode atuar como pontes entre a superfície do cateter e a superfície do microrganismo, ambas carregadas negativamente (REID et al., 1995; HABASH e REID, 1999).

As bactérias ligam-se inicialmente à superfície do cateter por meio de polissacarídeos extracelulares. Novas bactérias aderem e são adicionadas e presas dentro da matriz do glicocálice juntamente com as bactérias originadas das divisões celulares resultando em microcolônias aderidas, as quais, coalescem para formar um biofilme (NICKEL et al., 1994; CHOONG e WHITFIELD, 2000a). Este microambiente é favorável à formação e deposição da estruvita (fosfato amoníaco-magnésiano) e apatita (fosfato de cálcio). As colônias bacterianas produtoras de urease iniciam a formação dos cristais e a matriz de polissacarídeos aniônicos atraem os íons divalentes  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  da urina. A urease alcaliniza a urina pela hidrólise da uréia em amônia, diminuindo a solubilidade do sal de magnésio (estruvita), do sal de cálcio (hidroxiapatita) ocasionando a deposição sobre o cateter. Os cristais precipitam e se agregam com a matriz glicoprotéica na superfície do cateter (SEDOR e MULHOLLAND, 1999). Sob estas condições, os cristais de magnésio e fosfato de cálcio são formados e ficam presos na matriz orgânica e o biofilme contendo minerais forma as incrustações que bloqueiam o cateter (TUNNEY et al., 1999; DONLAN, 2001; MORRIS e STICKLER 2001; JONES et al., 2005).

O *Proteus mirabilis* está freqüentemente relacionado com cálculos associados à infecção e incrustações do cateter (STICKLER et al., 1993; MORRIS et al., 1997; LI e MOBLEY, 2002), é uma bactéria Gram-negativa móvel da família das *Enterobacteriaceae* que sofre mudanças morfológicas dramáticas, de uma célula única, nadante, de forma bacilar para uma célula alongada multinuclear e multiflagelada, produtora de manta “swarming” em resposta ao crescimento em uma superfície sólida (MOBLEY e BELLAS, 1995; COKER et al., 2000; SABBUBA

et al., 2002). Este microrganismo não é a causa comum das infecções do trato urinário no hospedeiro normal. Preferencialmente, infecta o trato urinário em que existam anormalidades funcionais ou anatômicas ou pela instrumentação crônica como a cateterização (COKER et al., 2000; MOBLEY e BELAS, 1995; WARREN et al., 1982). O microrganismo entra no trato urinário via uretra ou cateter, atravessa e coloniza a bexiga e ascende dos ureteres para os rins, colonizando-os. Em alguns casos, ganha acesso aos capilares e estabelece uma bacteriemia (COKER et al., 2000). A urease é um fator de virulência essencial para esta bactéria, alcalinizando a urina e causando a precipitação de estruvita e apatita (McLEAN et al., 1985; DUMANSKI et al., 1994; TORZEWSKA et al., 2003; MORRIS e STICKLER, 1998b). Embora a urease seja a força principal atrás do biofilme mineralizado, existem evidências que o polissacarídeo da cápsula bacteriana também esteja envolvido. Estudos *in vitro* indicam que a cápsula produzida pelo *Proteus mirabilis* cria um gel que estabiliza o crescimento dos cristais (MORRIS et al., 1999) e que o polissacarídeo extracelular purificado da cápsula é o único capaz de ligar o magnésio e acelerar a formação de estruvita (DUMANSKI et al., 1994). Outros fatores de virulência como a produção de hemolisinas e fimbria também estão envolvidas com a patogenicidade do *P. mirabilis*. O *Proteus mirabilis* dificulta o tratamento médico de muitos pacientes sob cateterização de longa duração da bexiga: ele é geralmente o responsável pela formação de incrustações e o conseqüente bloqueio dos cateteres devido à formação de biofilmes (GETLIFFE e MULHAL, 1991; WARREN, 1991; MORRIS et al., 1997; MORRIS e STICKLER, 1998b; STICKLER et al., 1998; LI e MOBLEY, 2002; SABBUBA et al., 2002; STICKLER et al., 2002; STICKLER et al., 2003a).

Existem vários modelos para simular a formação de incrustação nos biomateriais e nos cateteres urinários. O estudo da formação de incrustações pode ser realizado *in vivo* por meio de triagens clínicas em pacientes cateterizados, pela observação dos cateteres com incrustações removidos de pacientes e em animais. Nos modelos *in vivo* que utilizam animais, os biomateriais ou os cateteres são inseridos cirurgicamente na bexiga e removidos depois de um tempo determinado (CORMIO et al., 1996). Também podem ser usados modelos *in vitro* que são classificados como de fluxo estático ou contínuo e podem utilizar urinas humanas ou urinas artificiais. No modelo estático, os biomateriais são colocados em um recipiente contendo urina e esta é trocada em intervalos regulares. No modelo de fluxo contínuo, uma bomba mantém um fluxo de urina constante (0,5-1,5ml/min) para o recipiente contendo a amostra a ser avaliada durante todo o experimento (TUNNEY et al., 1997; SANTIN, et al., 1999; STICKLER et al., 1999; TUNNEY et al., 1999; CHOONG, et al., 2000; SHAW et al., 2005). A urina artificial foi usada pela primeira vez em um modelo *in vitro* de fluxo estático por Finlayson e Dubois (1973) para estudar o crescimento e a cristalização dos cálculos urinários. Este modelo era baseado no aparato desenvolvido por Lyon e Vermeulen (1965) para estudar a cinética da deposição do cálcio em bastões de vidro. No início, os modelos para o estudo da formação das incrustações eram do tipo estático (SRINIVASAN e CLARK, 1972; GRIFFITH et al., 1976; HEDELIN et al., 1985) mas depois os modelos foram de fluxo contínuo (STICKLER et al., 1996; GEPI-ATTEE e FENELEY; 1997; TUNNEY et al., 1997).

Cox et al. (1987) desenvolveram um modelo de fluxo contínuo com reposição diária de uma solução de urina artificial. A urease foi incluída como um componente na urina para simular os efeitos da infecção bacteriana por microrganismos produtores de urease, e assim, precipitar os minerais da solução formando incrustações (TUNNEY et al., 1997). Na década de noventa, Schmitz et al. (1993) e Getliffe (1994) utilizaram frascos de vidro e cateteres instalados na parte inferior de cada frasco, para simular uma bexiga, a urina era bombeada para os frascos (bexiga) permitindo a descida da urina pelos cateteres para dentro de um saco coletor. Sarangapani et al. (1995) usaram um aparato de fluxo contínuo constituído de uma câmara de 500ml com urina contaminada com *P. mirabilis* na qual os materiais dos cateteres foram presos por fios de aço inoxidável. Tunney et al. (1997) também desenvolveram um modelo de urina artificial de fluxo contínuo baseado no Modified Robbins Device (MRD) para simular as condições do trato urinário utilizando a urease para mimetizar o efeito das bactérias produtoras de urease. Stickler et al. (1999) idealizaram um modelo de bexiga cateterizada, para estudar o processo de incrustação, em laboratório.

Também têm sido relatados modelos que utilizam urina humana. Gleeson et al. (1989) descreveram um modelo de fluxo contínuo utilizando urina humana estéril e urina humana contaminada com *Proteus mirabilis*. Este modelo consistia de uma câmara com 700ml de urina humana na qual os biomateriais na forma de discos eram suspensos (GLEESON et al., 1989 apud CHOONG et al., 2000). O modelo planejado por Holmes et al. (1992) também utilizava urina humana estéril que era bombeada para um recipiente fechado estéril contendo os materiais a serem avaliados.

Vários autores descreveram um modelo de bexiga cateterizada para estudar o processo de formação de incrustações nos cateteres urinários em laboratório. Este modelo examina as espécies microbianas capazes de produzir biofilme e bloquearem o “olho” e o lúmen dos cateteres, quais os tipos de cateteres utilizados correntemente na prática clínica, capazes de resistir à colonização bacteriana e a formação de incrustações e é usado também para testar novas estratégias para o controle e prevenção da incrustação e bloqueio do cateter assim como novos materiais para a manufatura dos cateteres representando um teste preciso para os cateteres (MORRIS e STICKLER, 1998a; MORRIS e STICKLER, 1998b; STICKLER et al., 1999; STICKLER et al., 2003a).

### 3. PROPOSIÇÃO

Desenvolver um modelo *in vitro* da bexiga humana cateterizada baseado no modelo de Stickler et al 1999.

Contaminar as amostras de urinas artificiais e humana com o *P. mirabilis*

Avaliar a formação da incrustação nos cateteres por meio da contaminação artificial de amostras de urinas artificiais e humanas com o *P. mirabilis*

Detectar por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura os biofilmes de *P. mirabilis* formados nos cateteres de Foley, manufacturados com látex siliconizado.

Determinar a variação no peso dos segmentos dos cateteres antes e após a inoculação das urinas com o *P. mirabilis*

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. MATERIAL

#### 4.1.1 CATETER

Foram utilizados sonda de Foley de látex siliconizado (RÜSCH; Kamunting, Malásia) 14F (diâmetro externo correspondente a 4,62mm), como apresentado na figura 2.



**Figura 2:** Cateter de Foley: (1) ponta do cateter; (2) olho do cateter; (3) balão inflado; (4) coluna do cateter (5) conector/canal de drenagem da urina; (6) válvula de insuflação do balão/canal de passagem da água.



#### **4.1.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DO MODELO DA BEXIGA ARTIFICIAL**

- (1) suportes e garras metálicas
- (2) recipientes de plástico (Frenesius Kabi; Campinas, SP, Brasil)
- (3) equipo para a bomba de infusão (Samtronic Modelo ST-550T2, São Paulo, Brasil)
- (4) bomba de infusão peristáltica (Samtronic Modelo ST-550T2, São Paulo, Brasil)
- (5) rolha de silicone
- (6) frasco de vidro encamisado
- (7) banho ultratermostático (Quimis, Diadema, Brasil)
- (8) bolsa de drenagem (BIONAL, Recife, Brasil)

#### **4.1.3. MEIOS DE CULTURA E REAGENTES**

Os meios de cultura utilizados foram: ágar CLED (Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), caldo Trypticase de Soja (bioBrás; Montes Claros, Brasil) e Caldo Nutriente (MERCK, Darmstadt, Germany). Os meios de cultura foram preparados e distribuídos em câmara de Fluxo Laminar (Veco-Campinas, SP, Brasil) e estocados em refrigerador a 4°C até o momento do uso.

Os reagentes utilizados no preparo das amostras para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram: etanol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KHPO}_4$ , (Merck, Darmstadt), e glutaraldeído (Fluka, Chemika; Switzeland).

No preparo das urinas artificiais foram utilizados:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{oxalato}$ ,  $\text{KCl}$ , uréia, gelatina, ovalbumina de galinha (LabSynth; Diadema, Brasil);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Reagem; Rio de Janeiro, Brasil),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Difco; Sparks, USA).

Os meios de cultura e soluções foram preparadas no setor de Microbiologia Clínica do C. R. D. – Centro de Referência Diagnóstica do Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Unidade Auxiliar Integrada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, Câmpus de Araraquara, UNESP.

#### **4.1.4. URINAS HUMANAS**

O protocolo de pesquisa e o Consentimento Livre e Esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Foi coletada a urina de 24 horas de três voluntários masculinos saudáveis sem história prévia de infecção do trato urinário, que concordaram em participar deste estudo doando o material biológico. Foi escolhida a urina masculina para ser utilizada nessa pesquisa pelo fato de que a uretra masculina é mais longa que a feminina (aproximadamente 20cm) dificultando o acesso dos microrganismos a bexiga, diminuindo o risco de infecção em comparação com a uretra feminina, de aproximadamente 6cm e próxima ao ânus e meato uretral.

#### **4.1.5. MICRORGANISMO**

*Proteus mirabilis* cepa ATCC 25933

#### **4.1.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram analisados pelo Teste T de Student, ANOVA 1 (Análise de Variância) e seguidas quando necessário do teste de Newman-Keuls *post hoc* realizados pelo programa Sigma Stat 2.0. As diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. MODELO DE BEXIGA ARTIFICIAL

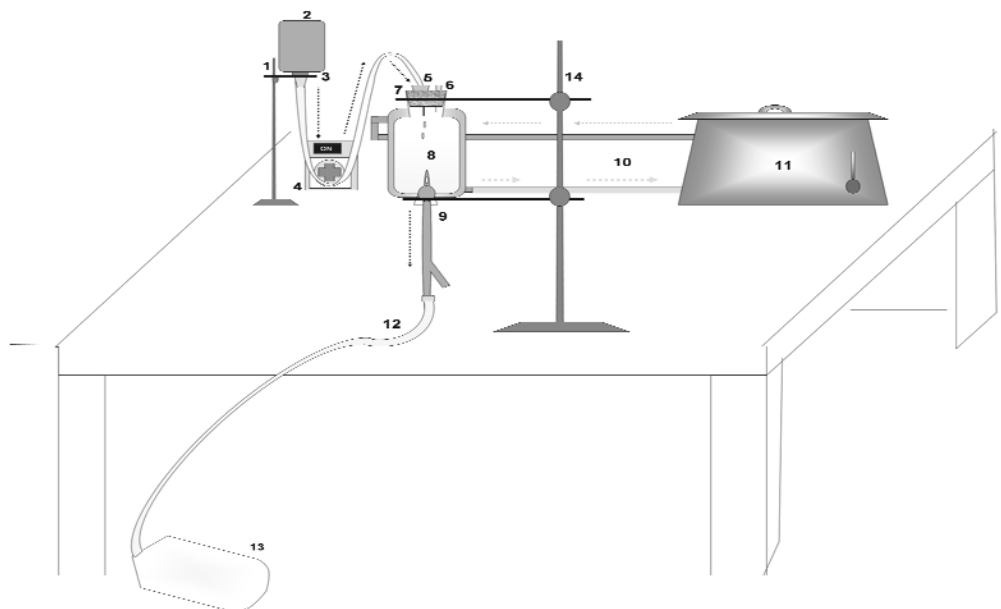
Para a construção desse modelo (figura 3) utilizou-se um frasco de solução fisiológica (NaCl 0,9%) vazio com capacidade para 1000ml. Este frasco, colocado com a boca voltada para baixo foi preso, por uma garra, a um suporte de metal. Na tampa deste recipiente foi conectado o equipo para a saída do líquido do frasco. O equipo foi acoplado ao mecanismo de propulsão da bomba de infusão peristáltica sendo que na sua extremidade final foi conectada uma agulha. Esta agulha foi inserida em uma rolha de silicone esterilizada, responsável pela vedação do frasco de vidro encamisado (“bexiga”) até que o bisel ultrapassasse a rolha, permitindo assim que o líquido armazenado no recipiente de plástico chegasse ao interior do frasco encamisado.

Neste modelo, a bomba de infusão peristáltica foi usada para produzir fluxo contínuo e estável (0,5ml/min) da urina do recipiente de plástico até o frasco de vidro encamisado (“bexiga”).

O frasco de vidro encamisado esterilizado, preso por duas garras a um suporte metálico, foi mantido a 37°C pela circulação de água realizada pelo banho ultratermostático conectado ao frasco por tubos de látex inseridos nas laterais do frasco (entrada e saída de água).

Um orifício na base do frasco encamisado, permitia a inserção do cateter. O balão do cateter foi inflado com 10ml de água, sendo o cateter seguro na posição correta, em seguida foi fechada a saída da “bexiga”, para que a urina pudesse escoar do frasco encamisado pelo interior do cateter e pelo tubo

conector alcançar a bolsa de drenagem. O cateter foi conectado ao tubo conector ligado a bolsa de drenagem para a coleta do líquido.



**Figura 3:** Esquema representativo do modelo da bexiga cateterizada: (1) suporte e garra metálica para prender o recipiente de plástico, (2) recipiente de plástico, (3) equipo para a bomba de infusão, (4) bomba de infusão peristáltica, (5) tubo de vidro para a inserção da agulha do equipo, (6) tubo de vidro para a manutenção do equilíbrio entre as pressões interna e externa, (7) rolha de silicone, (8) frasco de vidro encamisado, (9) cateter de Foley inflado, (10) tubos para a saída e entrada de água ligados ao frasco encamisado e ao banho ultratermostático, (11) banho ultratermostático, (12) tubo de conexão do cateter à bolsa de drenagem, (13) bolsa de drenagem, (14) suporte e garra para o frasco encamisado.

#### 4.2.2. PROCEDIMENTO PARA A OPERAÇÃO DO MODELO DE BEXIGA ARTIFICIAL

Todos os experimentos foram realizados quatro vezes. Antes do início da montagem do aparato, o frasco encamisado, a rolha de silicone e a agulha foram

autoclavadas a 120°C por 15 minutos e em seguida secos em estufa por 24 horas. Dentro do fluxo laminar o cateter foi inserido no frasco encamisado e inflado com 10ml de água destilada esterilizada com o auxílio de uma seringa estéril e conectado a bolsa de drenagem. Por último o frasco foi vedado com a rolha de silicone. O frasco foi então preso ao suporte com o auxílio de garra metálica e conectado ao banho termostático a 37°C pelas borrachas para a entrada e saída de água. O equipo foi inserido no frasco contendo urina (também preso em suporte por garra metálica) e conectado ao frasco encamisado por meio de uma agulha. A bomba peristáltica foi ligada e a urina foi bombeada para o frasco encamisado até o volume acumular-se abaixo do olho do cateter. Neste momento, a bomba foi desligada e a suspensão bacteriana foi adicionada ao modelo ficando em repouso por 1 hora. Após esse período, a bomba foi religada para o início do experimento.

O aparelho continuava em funcionamento até o momento em que era observada a oclusão do cateter. A bomba era desligada e retiradas da bexiga duas alíquotas de urina: uma de 1ml e a outra de 200µl. E seguida foram transferidas respectivamente para um tubo de ensaio vazio e para um tubo de ensaio contendo 800µl de solução salina. O pH final da urina contida no primeiro tubo foi medido com o auxílio de uma fita reagente (Merk, Darmstad, Germany) o segundo tubo foi utilizado para determinação de células viáveis. A urina residual na “bexiga” foi removida e descartada dentro de um frasco contendo solução de hipoclorito a 50%. O balão foi desinflado e o cateter foi desconectado da bolsa de drenagem e removido via “uretra”.

### 4.2.3. COMPOSIÇÃO DAS URINAS

#### 4.2.3.1. URINA ARTIFICIAL (STICKLER et al., 1999)

A primeira urina a ser preparada, foi denominada urina AS. Tinha a seguinte composição em g/l:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,65g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,65g; NaCl 4,6g;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  5,2g;  $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,65g;  $\text{Na}_2\text{oxalato}$  0,02g; KCl 1,6g; uréia 25,0g; gelatina 5g (LabSynth; Diadema, Brasil);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Reagem; Rio de Janeiro, Brasil): 2,8g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Difco; Sparks, USA): 1,0g; caldo tripticaseína de soja (bioBrás; Montes Claros, Brasil): 1,0g e água MiliQ. Todos os reagentes e o meio de cultura foram pesados em balança analítica (AB204, Mettler Toledo). Após a pesagem os componentes da urina artificial foram separados em 4 grupos:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , NaCl,  $\text{Na}_3\text{citrato} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (grupo 1);  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{oxalato}$  (grupo 2); gelatina (grupo 3), uréia (grupo 4). Cada constituinte dos grupos foram primeiramente dissolvidos separadamente em água MILIQ e em seguida foram transferidos para beakers de 100ml (Pyrex) correspondentes ao seu grupo. Os quatro grupos de soluções foram misturados uma a uma formando uma única solução. O pH da solução foi medido em aparelho medidor de pH (Digimed instrumentação analítica LTDA, São Paulo, Brasil) ajustado para 6,1 com NaOH 10N. Em seguida a solução foi esterilizada por membrana filtrante com poros de 0,20 $\mu\text{m}$  de diâmetro (Corning, Japão). O caldo tripticaseína de soja após ser esterilizado por autoclavação foi preparado separadamente, e em seguida adicionado à solução para a concentração final de

1g/l. Após o preparo, a urina AS foi transferida com o auxílio de uma pipeta de 5ml para o frasco vazio de soro.

#### **4.2.3.2. URINA ARTIFICIAL (TUNNEY et al.,1999)**

A segunda urina utilizada modificada por Gorman et al. (2003) foi denominada urina AT. A composição desta urina em g/l era a seguinte:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Reagem): 7,6g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  3,6g; uréia 16,0g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3,5g; *chicken albumin* 0,4g; caldo nutriente (MERCK, Darmstadt, Germany) 8g/l e água MILIQ. Todos os reagentes e o meio de cultura foram pesados em balança analítica (AB204, Mettler Toledo). Após a pesagem os componentes foram divididos em 2 grupos:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e uréia (grupo 1) e  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e ovalbumina de galinha (grupo 2). Cada constituinte dos grupos foram primeiramente dissolvidos separadamente em água MILIQ e em seguida transferidos para beakers de 600ml (Pyrex) correspondentes ao seu grupo. Foram obtidos dois grupos de soluções: solução A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , uréia) e solução B ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ovoalbumina de galinha) O pH de ambas as soluções foi medido em aparelho medidor de pH (Digimed Instrumentação Analítica LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e em seguida esterilizadas por membrana filtrante com poros de 0,20 $\mu\text{m}$  de diâmetro (Corning, Japão). O caldo nutriente foi preparado separadamente e foi esterilizado por autoclavação e transferido por meio de uma pipeta de 5ml para o frasco de soro vazio (1000ml). Em seguida foi adicionada ao frasco a solução A seguido da solução B. As soluções A e B foram preparadas e adicionadas ao frasco separadamente.



#### 4.2.3.3. URINA HUMANA (UH)

O terceiro grupo de experimentos foi utilizado um pool de urina humana como meio de crescimento sendo denominada urina UH. Três homens voluntários doaram a urina coletada em garrafas PET de 1,5-2 litros, de água mineral, previamente lavadas com água deionizada esterilizadas e secas em estufa a 37°C. As urinas foram levadas ao laboratório e foram retiradas alíquotas das mesmas para a realização de cultura pelo sistema URI-LAB (Laborclin, Paranaíba, MS). O procedimento de inoculação foi realizado pelo contato do laminocultivo com a urina não diluída por meio da imersão do recipiente contendo a amostra de urina (50ml), de forma que a mesma entrasse em contato com todo o meio de cultura. A seguir, o sistema URI-LAB foi colocado em estufa a 37°C por 24-48 horas. As urinas restantes foram estocadas a 4°C em geladeira. Após o período de incubação, as urinas que não apresentaram crescimento microbiano, foram removidas da geladeira seis horas antes de serem usadas com a finalidade de solubilizar qualquer precipitado. Em seguida foram misturadas e esterilizadas por membrana filtrante com poros de 0,20µm de diâmetro (Corning, Japão). O pH da solução foi medido em aparelho medidor de pH (Digimed instrumentação analítica LTDA, São Paulo, Brasil), ajustado para 6,1 com NaOH 10N. Em seguida a solução foi esterilizada novamente por cápsula com membrana filtrante com poros de 0,20µm de diâmetro (Corning, Japão). Após o preparo, a urina UH foi transferida por meio de uma pipeta de 5ml para o frasco vazio de soro.

#### 4.2.4. ESTOCAGEM DO MICRORGANISMO

Foi adicionado 0,5ml de ágar Nutriente (na forma líquida) com uma pipeta Pasteur estéril à cepa liofilizada de *P. mirabilis* ATCC 25933. O líófilo foi ressuspendido para homogeneizar e a suspensão foi transferida para uma placa de Ágar Nutriente incubada a 37°C por 24 horas. Após esse período, as colônias de *P. mirabilis* foram semeadas em caldo BHI por 24 horas a 37°C. Decorrido esse período, 200µl de caldo BHI eram transferidos para tubos Eppendorf, acrescidos de 50µl de glicerol e estocada a -70°C até o momento do uso.

#### 4.2.5. INÓCULO

O preparo do inóculo de *Proteus mirabilis* cepa ATCC 25933 foi o mesmo para todas as urinas utilizadas sendo realizado em fluxo laminar. Dois dias antes do início do experimento a suspensão em estoque do microrganismo foi retirada do freezer e uma alíquota de 40µl adicionada a 5ml de BHI. Em seguida incubada a 37°C por 24 horas em estufa. Após esse período, a suspensão bacteriana foi semeada em uma placa de ágar Cled e incubada em estufa a 37° C por 24 horas. No dia do experimento, quatro colônias de *Proteus mirabilis* foram inoculadas em 10ml da urina a ser avaliada e incubada a 37°C com agitação de 150g (Marconi, Piracicaba, Brasil) por 4 horas.

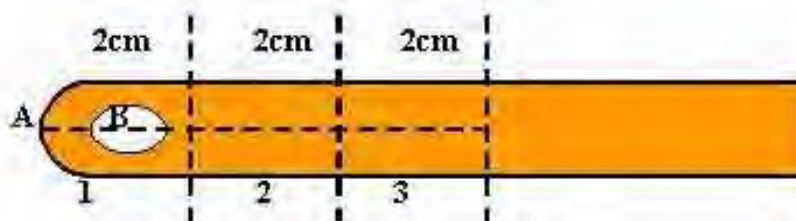
#### 4.2.6. CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DE *P. mirabilis*

A contagem do número de células viáveis foi realizada em triplicata para cada experimento: no momento da suspensão ser colocada no modelo de bexiga cateterizada, uma hora após e quando se verificava a oclusão do cateter.

Uma alíquota de 200 $\mu$ l foi retirada e transferida para um tubo (tubo 1) contendo 1,8ml de solução salina para ser realizada a determinação de células viáveis pela técnica da contagem de Westergren e Krasse (1978). O tubo 1 (diluição 1:10), foi então homogeneizado em agitador tipo "mixer" durante 20-30 segundos e assepticamente, por meio de uma pipeta de 1ml, transferiu-se 0,2ml da amostra para o tubo 2 (diluição 1:10<sup>2</sup>). Este processo foi repetido até o tubo 10 (diluição 1:10<sup>10</sup>). Após o preparo das diluições foi realizada a determinação do número de células viáveis: três placas de Petri contendo ágar Cled foram divididas em quatro partes com uma caneta de retroprojeter. As diluições foram identificadas como 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup> e 10<sup>10</sup>. O material do tubo 10 foi homogeneizado em "mixer" por 20-30 segundos e com uma pipeta de 0,2ml, transferiu-se assepticamente 0,04ml para o quadrante da placa identificado como a diluição 10<sup>10</sup> e assim consecutivamente até o tubo 1. Após a secagem do inóculo, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 37°C, durante 24 horas. Decorrido esse período, foram selecionadas para contagem as placas que apresentavam crescimento microbiano nas gotas entre 6 e 60 colônias, calculava-se a média aritmética simples das contagens e multiplicava-se o número encontrado por 50 para corrigir o volume para 1ml e pela recíproca da diluição correspondente.

#### 4.2.7. PREPARAÇÃO DOS SEGMENTOS DE CATETER PARA OBSERVAÇÃO POR MEIO DO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA (PIZZOLITTO et al., 2000)

Após a verificação do bloqueio do cateter, este era desinflado e preparado para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e de cada experimento, um cateter foi separado e 4 amostras foram cortadas a partir da ponta obtendo-se 3 segmentos de 2cm cada e foram realizados cortes longitudinais (conforme a figura 4):



**Figura 4:** Esquema representativo da segmentação do cateter para a obtenção de amostras que foram observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura: (A) representa a ponta do cateter; (1) segmento de 2 cm de comprimento iniciando a partir da ponta do cateter e compreendendo o ponto B; (B) "olho" do cateter; (2) segmento de 2 cm e 2 cm distante do ponto A; (3) segmento de 2 cm e 4 cm de distância do ponto A;

Estes segmentos foram fixados imediatamente após os cortes em solução de glutaraldeído a 2,5% por 15 minutos. A seguir foram desidratados seriadamente em etanol a 15, 30, 50, 70, 95 e 100% (15 minutos cada) e secos em centrifuga a vácuo (DNA mini-WIKA). Após esses procedimentos os segmentos do cateter foram colados sobre o porta amostras do microscópio (suporte de metal) e metalizados com ouro (Edwards S150) e a seguir foi realizada a observação pelo microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM,

modelo T330A). As soluções utilizadas para o preparo das amostras foram feitas previamente conforme descrito a seguir e armazenadas em geladeira.

#### Tampão Fosfato 0,2 M

##### Solução A

Fosfato monobásico de sódio (Merk)..... 2,76g  
 Água destilada.....q.s.p..... 100,00ml

##### Solução B

Fosfato dibásico de sódio (Merk)..... 7,17g  
 Água destilada..... q.s.p..... 100,0ml

#### Tampão Fosfato 0,2 M e pH 7,1

Solução A .....33,00ml  
 Solução B ..... 67,00ml

#### Tampão Fosfato 0,1M e pH 7,1

Tampão fosfato 0,2M e pH 7,1 ..... .50,0ml  
 Água destilada ..... .50,0ml

#### Solução Tampão 0,1 M-Glutaraldeído a 2,5%

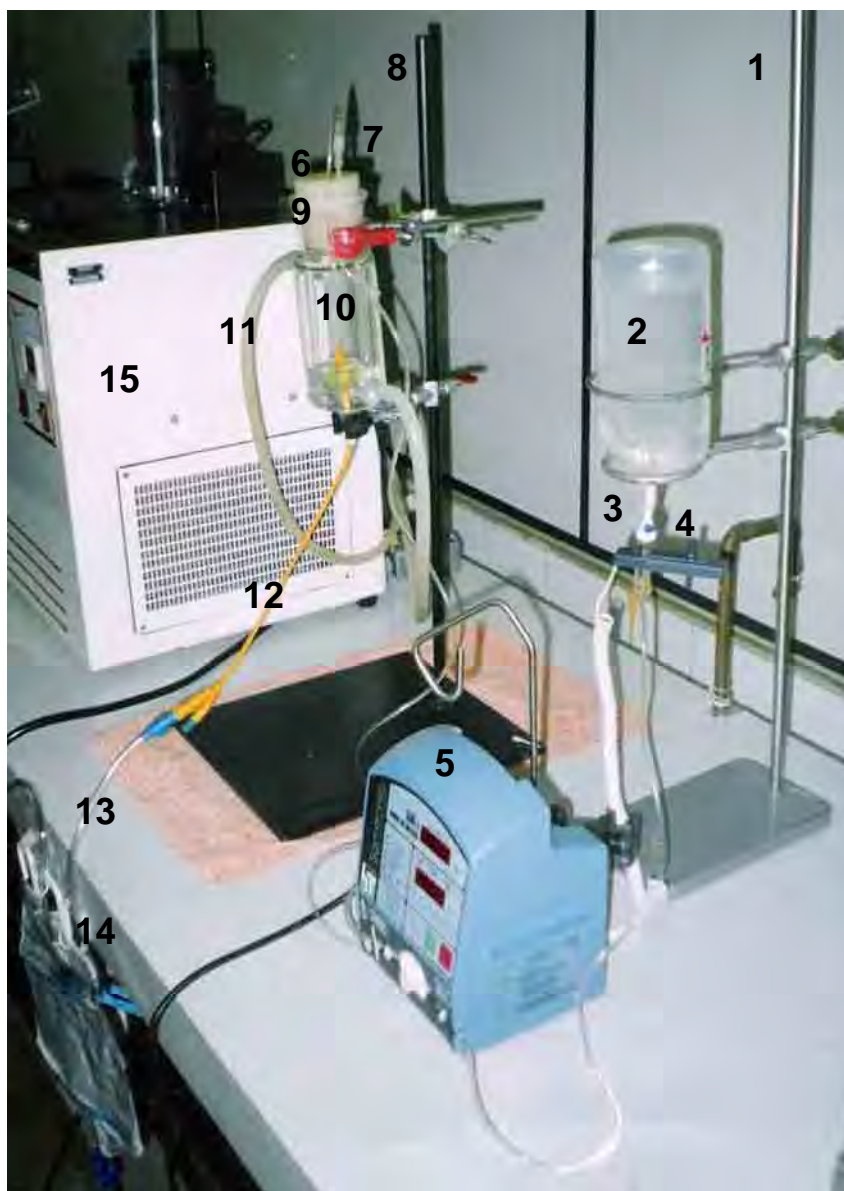
Tampão 0,1 M e pH 7,1 .....48,5ml  
 Glutaraldeído a 50% em solução aquosa (Fluka) .....2,5ml

#### **4.2.8. PERFIL DA ALTERAÇÃO NO PESO DOS SEGMENTOS DO CATETER**

Terminado os experimentos, três cateteres de cada grupo, foram segmentados em 10 amostras de 2cm cada, transferidos para tubos Eppendorf (previamente autoclavados, pesados e numerados) e pesados em balança analítica para observar a variação de peso úmido nos segmentos após o bloqueio do cateter. O peso de cada segmento de cateter foi obtido subtraindo-se o peso do Eppendorf com o segmento do peso do Eppendorf vazio. A significância do peso dos segmentos ( $n = 3$ ) foi analisada usando o Teste T de Student e ANOVA 1. Para a obtenção de segmentos controle foi realizado três novos experimentos utilizando-se urina AS, urina AT e urina humana UH. Os líquidos foram adicionados ao modelo, um de cada vez, conforme descrito no item 4.2.2. durante 30 horas. Após esse período o equipamento foi desligado, o cateter seccionado e os segmentos pesados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. MODELO DE BEXIGA ARTIFICIAL



**Figura 5:** Foto representativa do modelo da bexiga cateterizada: (1) suporte e garra metálica para prender o frasco de soro, (2) frasco de soro, (3) equipo para a bomba de infusão, (4) detector de gotas (5) bomba de infusão peristáltica, (6) tubo de vidro para a inserção da agulha do equipo, (7) agulha (8) suporte e garra para o frasco encamisado, (9) rolha de silicone, (10) frasco de vidro encamisado, (11) tubos para a saída e entrada de água ligados ao frasco encamisado (12) cateter de Foley, (13) tubo de conexão do cateter á bolsa de drenagem, (14) bolsa de drenagem, (15) banho ultratermostático.

Após a montagem do modelo como descrito anteriormente, a urina fluía ininterruptamente do reservatório para o frasco encamisado e deste para o cateter conectado à bolsa de drenagem até o momento em que o “olho” do cateter ficava completamente obstruído pelas incrustações impossibilitando a passagem de urina. A partir desse momento, o volume de urina no interior do frasco encamisado começava a aumentar demonstrando a oclusão total do “olho” do cateter e a interrupção do fluxo de urina do cateter para a bolsa de drenagem. As figuras 6, 7, 8 e 9 mostram este processo:



**Figura 6:** Início do experimento com a urina límpida antes da introdução do inóculo

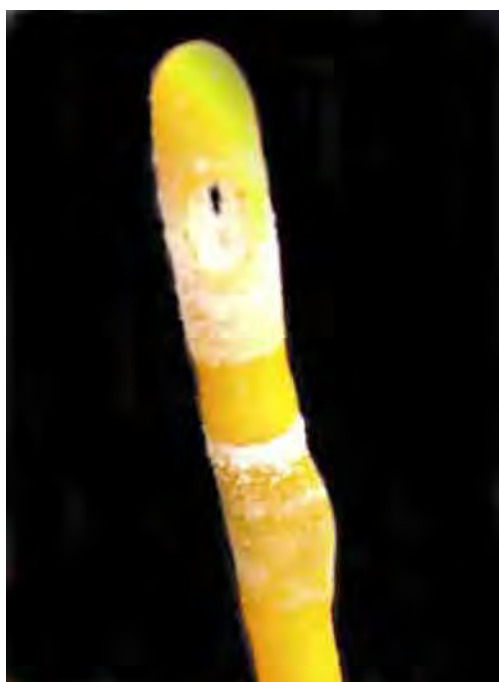


**Figura 7:** Algumas horas (5 horas) após a introdução do inóculo já se verificava a turvação do meio com a urina fluindo pelo “olho” do cateter





**Figura 8:** Oclusão do “olho” do cateter, a urina não flui mais para a bolsa de drenagem e começa a recobrir o cateter.



**Figura 9:** Cateter removido. As incrustações responsáveis pelo bloqueio do cateter são visíveis e o “olho” do cateter mostra-se recoberto por elas

## 5.2. BLOQUEIO DO CATETER URETRAL PELA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *P. mirabilis* POR URINA ARTIFICIAL AS

Neste experimento o pH da urina inicial alterou-se de 6,1 para > 8,0 em um período de tempo inferior a 48 horas como mostrado na tabela 1. O número de células viáveis de *P. mirabilis* presentes no momento do bloqueio do cateter foi maior que no início do experimento (Tabela 2). Este fato foi comprovado com a aplicação do teste T de Student, que houve uma alteração significativa no número de células viáveis de *P. mirabilis* no início e no final do experimento  $p < 0,05$ .

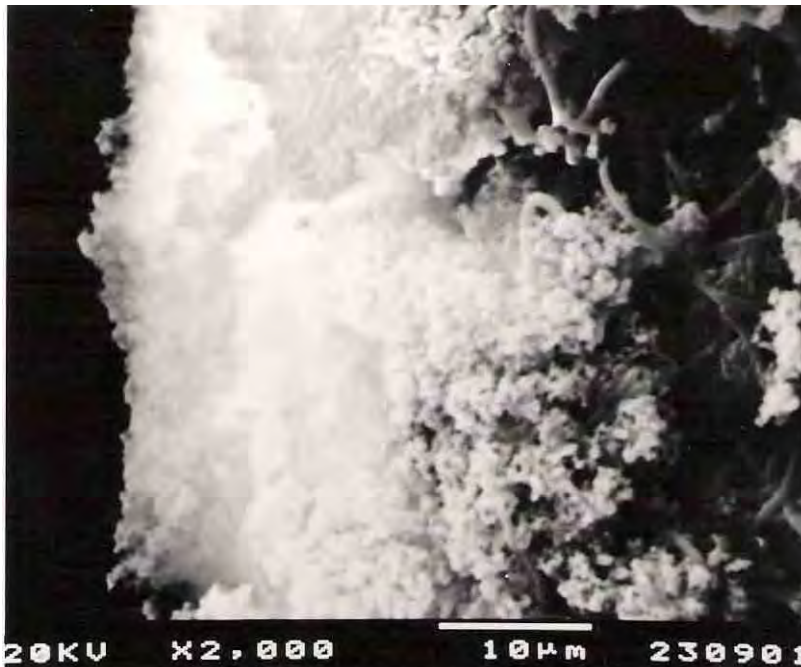
Tabela 1: pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados na urina artificial AS

Cateter	pH da urina no início do experimento	Tempo de bloqueio (horas)	pH da urina no bloqueio
1	6,1	27,20	> 8
2	6,1	28,30	> 8
3	6,1	28,10	> 8
<b>Média</b>	6,1	27:50	> 8

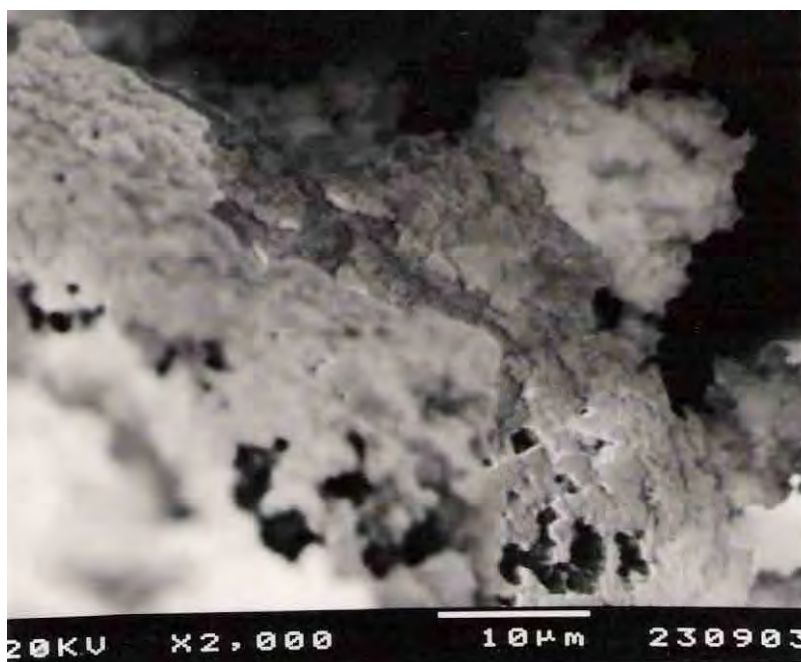
Tabela 2: Número de microrganismos no inóculo, no início e no final do experimento com a urina artificial AS

Cateter	Número de células viáveis no inóculo (UFC/ml)	Número de células viáveis no início do experimento (UFC/ml)	Número de células viáveis no bloqueio (UFC/ml)
1	$3,91 \times 10^8$	$2,80 \times 10^6$	$2,80 \times 10^8$
2	$2,25 \times 10^8$	$2,20 \times 10^6$	$1,30 \times 10^8$
3	$2,30 \times 10^8$	$2,20 \times 10^6$	$1,30 \times 10^8$
<b>Média</b>	$2,80 \times 10^8$	$2,40 \times 10^6$	$1,80 \times 10^8$

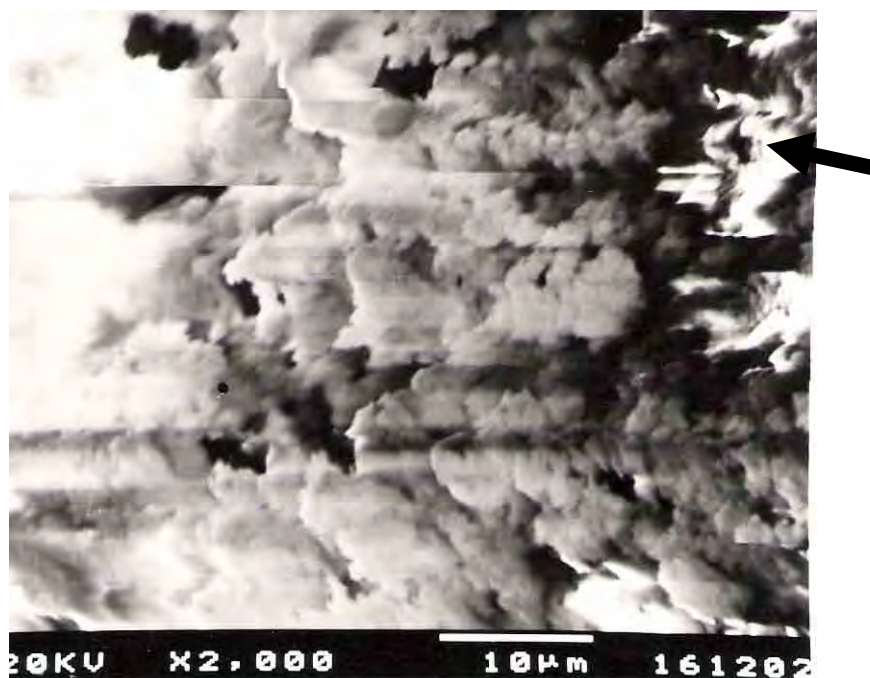
### 5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SEGMENTOS DO CATETER URETRAL APÓS A CANALIZAÇÃO DA URINA AS



**Figura 10:** Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (“olho”do cateter) após 27horas e 20 min. No lado esquerdo da micrografia observa-se um biofilme extenso e do lado direito (canto superior) alguns bacilos pleomorficos (x2000).



**Figura 11:** Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (balão de retenção, 2cm da ponta) após 27horas e 20 min. Observa-se o biofilme por toda a superfície (x2000).



**Figura 12:** Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (4cm da ponta) após 27horas e 20 min. O biofilme recobriu toda a superfície do cateter (x2000).



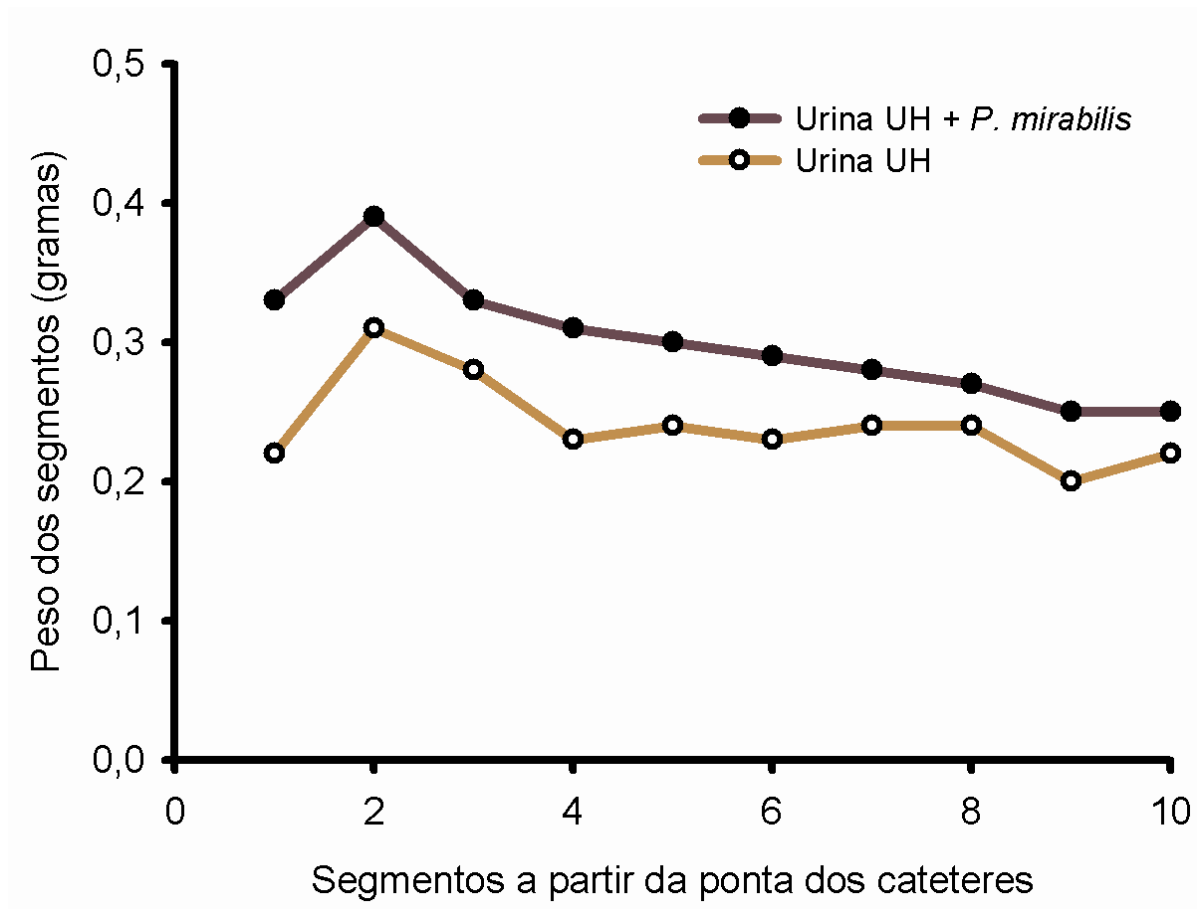
**Figura 13:** Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (4cm da ponta) após 27horas e 20 min. Maior aumento da região marcada pela seta na figura 12. No centro inferior da foto são visíveis dois bacilos isolados (x5000)

#### 5.4. NO PESO DOS SEGMENTOS DOS CATETERES APÓS A CANALIZAÇÃO DA URINA AS COM E SEM A INOCULAÇÃO DE *P. mirabilis*

Nestes resultados foram observados a variação no peso de dez segmentos dos cateteres ( $n = 3$ ) antes e após a canalização da urina AS com e sem a inoculação de *P. mirabilis*. Houve uma diferença significativa quando aplicada a ANOVA 1  $p < 0,05$  (Tabela 3, Figura 14). A urina AS sem a inoculação do *P. mirabilis* fluiu do reservatório para o frasco encamisado por 30 horas. Não ocorreu alteração do pH da urina durante todo o experimento e não houve o bloqueio do cateter.

Tabela 3: Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina AS com e sem o inóculo de *P. mirabilis*

Segmento	Peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina AS sem o <i>P. mirabilis</i> (n=1)	Média de peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina AS com o <i>P. mirabilis</i> (n=3)
1	0,2219	0,3067
2	0,3184	0,3877
3	0,2684	0,2911
4	0,2202	0,2743
5	0,2372	0,3008
6	0,2294	0,3069
7	0,2369	0,2775
8	0,2243	0,2525
9	0,1934	0,2394
10	0,2135	0,2385



**Figura 14:** Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina AS e da urina AS contaminada com o *P. mirabilis*.  
Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$  ANOVA 1

## 5.5. BLOQUEIO DO CATETER URETRAL PELA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *P. mirabilis* POR URINA ARTIFICIAL AT

Neste experimento foi mostrado que o pH da urina inicial elevou-se de 5 para > 8 em um período de tempo inferior a 12 horas como mostrado na tabela 4. O número de células viáveis de *P. mirabilis* presentes no momento do bloqueio do cateter foi maior que no início do experimento (Tabela 5). Este fato foi comprovado com a aplicação do teste T de Student que houve uma alteração significativa no número de células viáveis de *P. mirabilis* no início e no final do experimento  $p < 0,05$ .

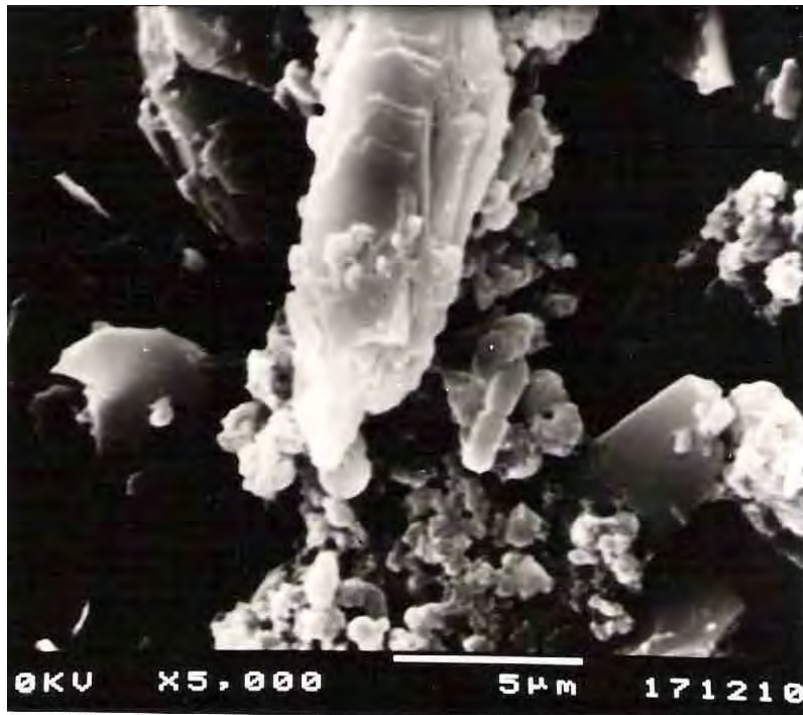
Tabela 4: pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados na urina artificial AT

Cateter	pH da urina no início do experimento	Tempo de bloqueio (horas)	pH da urina no bloqueio
1	5	9:50	> 8
2	5	10:29	> 8
3	5	10:36	> 8
<b>Média</b>	5	10:13	> 8

Tabela 5: Número de microrganismos no inóculo, início e final do experimento com a urina artificial AT

Cateter	Número de células viáveis no inóculo (UFC/ml)	Número de células viáveis no início do experimento (UFC/ml)	Número de células viáveis no bloqueio (UFC/ml)
1	$6,50 \times 10^8$	$4,80 \times 10^6$	$4,47 \times 10^8$
2	$4,30 \times 10^8$	$2,20 \times 10^6$	$2,30 \times 10^8$
3	$4,00 \times 10^8$	$2,30 \times 10^6$	$2,30 \times 10^8$
<b>Média</b>	$4,90 \times 10^8$	$3,00 \times 10^6$	$2,14 \times 10^8$

## 5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SEGMENTOS DO CATETER URETRAL APÓS A CANALIZAÇÃO DA URINA AT

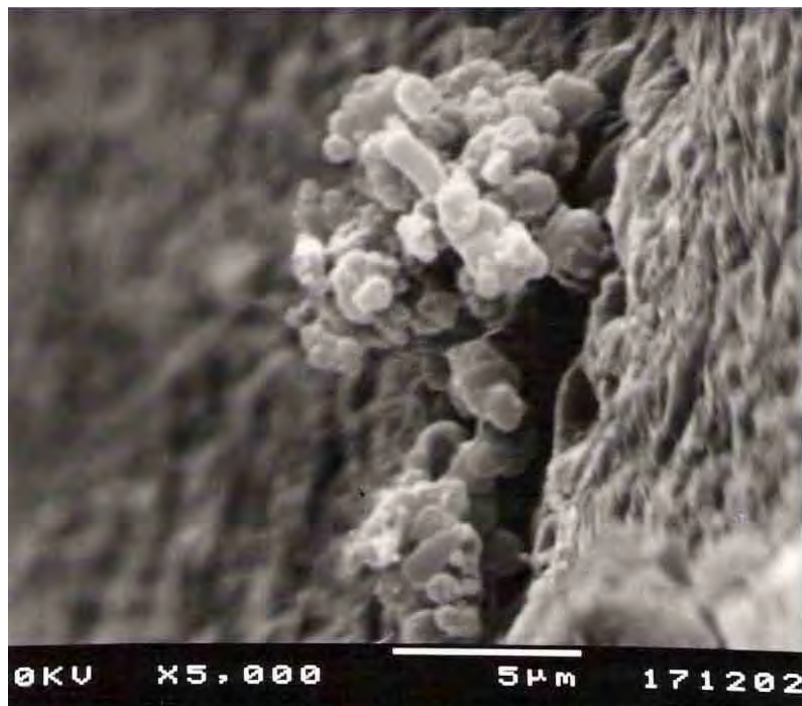


**Figura 15:** Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (“olho” do cateter) após 9 horas e 50 min. No centro observa-se uma formação de cristal, biofilme e bacilos isolados (x5000).

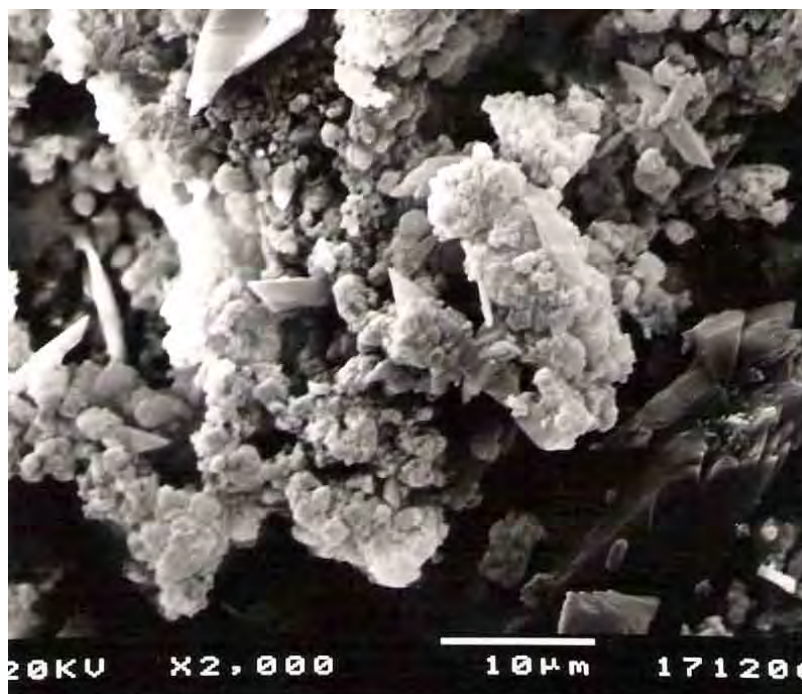


**Figura 16:** Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (2cm da ponta) após 9 horas e 50 min. Observa-se biofilmes esparsos no canto superior à direita e no lado esquerdo. Na margem superior e inferior nota-se duas formações de cristais (x5000).





**Figura 17:** Eletromicrografia do 3º segmento (4cm da ponta) após 9 horas e 50 min. Ao centro vê-se bacilo e depósitos de cristais (x5000).



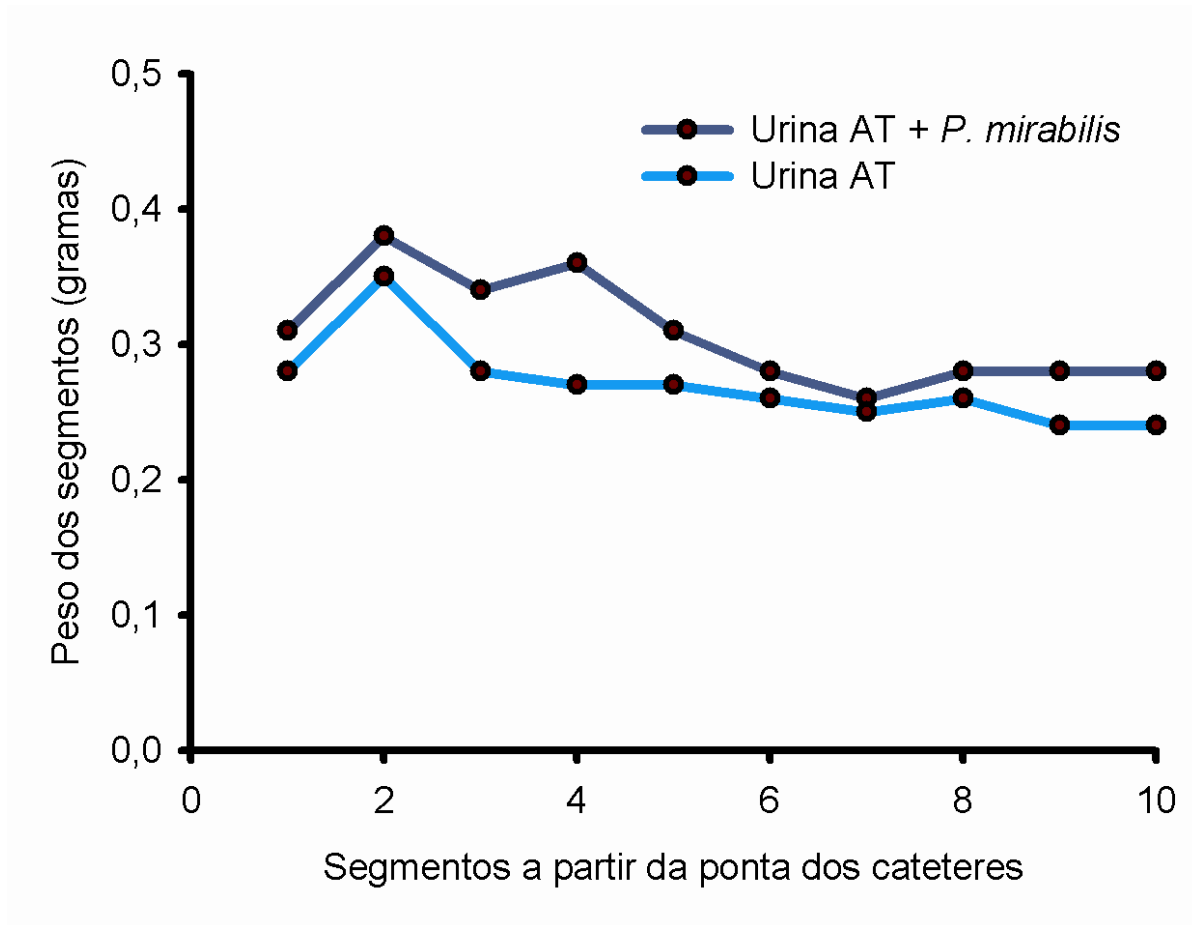
**Figura 18:** Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (4cm da ponta) após 9 horas e 50 min. Nesta micrografia pode-se observar biofilme e cristais (x2000).

### 5.7. PESO DOS SEGMENTOS DOS CATETERES APÓS A CANALIZAÇÃO COM A URINA AT COM E SEM A INOCULAÇÃO DE *P. mirabilis*

Foi observada a variação no peso de dez segmentos dos cateteres ( $n = 3$ ) antes e após a canalização da urina AT com e sem a inoculação com *P. mirabilis*. Houve uma diferença significativa quando aplicada a ANOVA 1  $p < 0,05$  (Tabela 6, Figura 19). A urina AT sem a inoculação do *P. mirabilis*. A urina AT sem a inoculação do *P. mirabilis* fluiu do reservatório para o frasco encamisado por 30 horas. Não ocorreu alteração do pH da urina durante todo o experimento e não houve o bloqueio do cateter.

Tabela 6: Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina AT com e sem o inóculo de *P. mirabilis*

Segmento	Peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina AT (n=1)	Média de peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina AT com o inóculo (n=3)
1	0,2804	0,3148
2	0,3468	0,3763
3	0,2809	0,3447
4	0,2706	0,3585
5	0,2746	0,3071
6	0,2583	0,2797
7	0,2481	0,2599
8	0,2583	0,2832
9	0,2372	0,2845
10	0,2373	0,2783



**figura 19:** Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina AT e da urina AT contaminada com o *P. mirabilis*.  
Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$  ANOVA 1

## 5.8. BLOQUEIO DO CATETER URETRAL PELA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *P. mirabilis* POR URINA HUMANA UH

Este experimento mostra que o pH da urina inicial alterou-se de 6,1 para > 8 em um período de tempo inferior ou igual a 28 horas como mostrado na tabela 7. O número de células viáveis de *P. mirabilis* presentes no momento do bloqueio do cateter foi maior que no início do experimento (Tabela 8). Este fato foi comprovado com a aplicação do teste T de Student, pelo qual foi constatado que houve uma alteração significativa no número de células viáveis de *P. mirabilis* no início e no final do experimento  $p < 0,05$ .

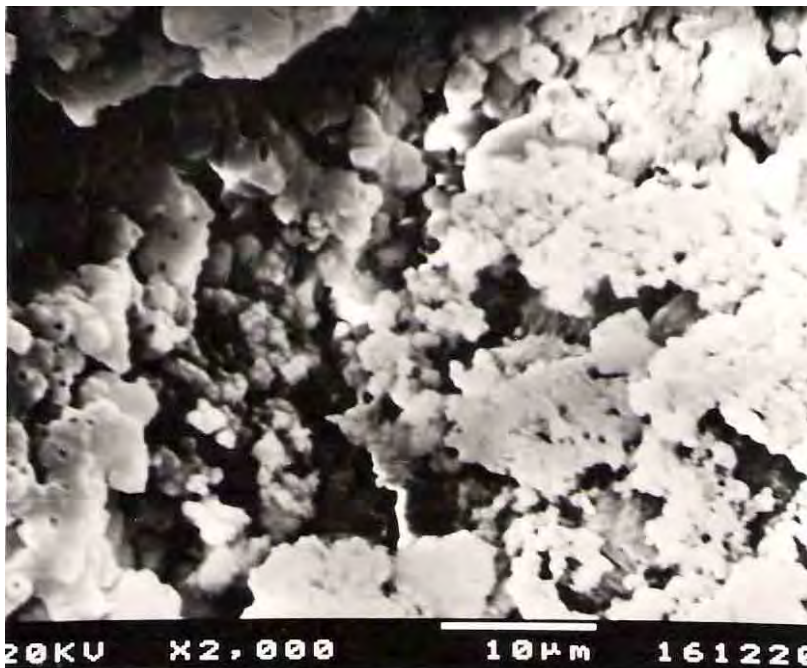
Tabela 7: pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio de três cateteres testados com urina artificial UH.

Cateter	pH da urina no início do experimento	Tempo de bloqueio (horas)	pH da urina no bloqueio
1	6,1	27:50	> 8
2	6,1	27:45	> 8
3	6,1	28:00	> 8
<b>Média</b>	6,1	27:50	> 8

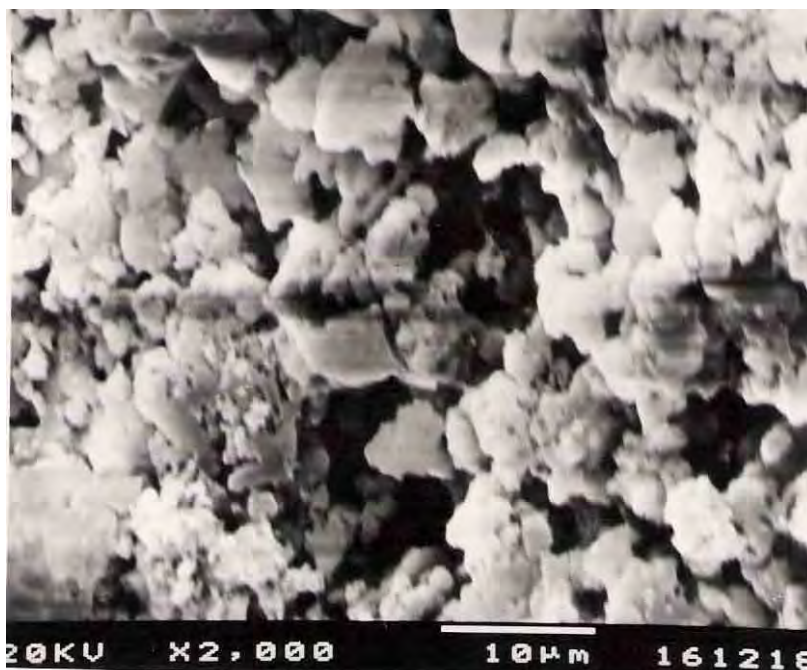
Tabela 8: Número de microrganismos no início e no final do experimento com a urina artificial UH

Cateter	Número de células viáveis no inóculo (UFC/ml)	Número de células viáveis no início do experimento (UFC/ml)	Número de células viáveis no bloqueio (UFC/ml)
1	$3,00 \times 10^8$	$2,70 \times 10^6$	$2,73 \times 10^8$
2	$2,98 \times 10^8$	$2,30 \times 10^6$	$2,40 \times 10^8$
3	$2,25 \times 10^8$	$2,30 \times 10^6$	$1,30 \times 10^8$
<b>Média</b>	$2,73 \times 10^8$	$2,40 \times 10^6$	$2,14 \times 10^8$

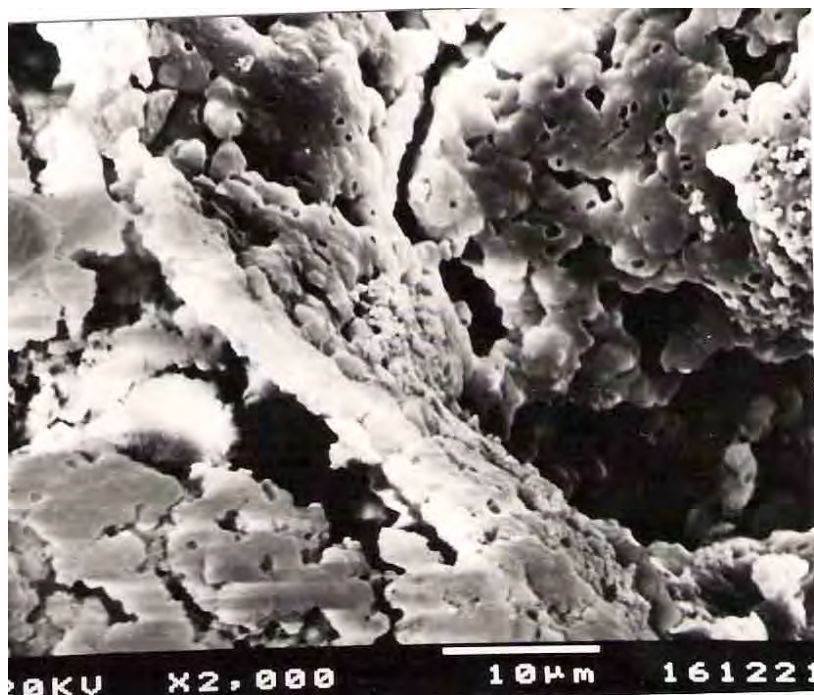
5.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE SEGMENTOS DO CATETER URETRAL APÓS A CANALIZAÇÃO DA URINA UH



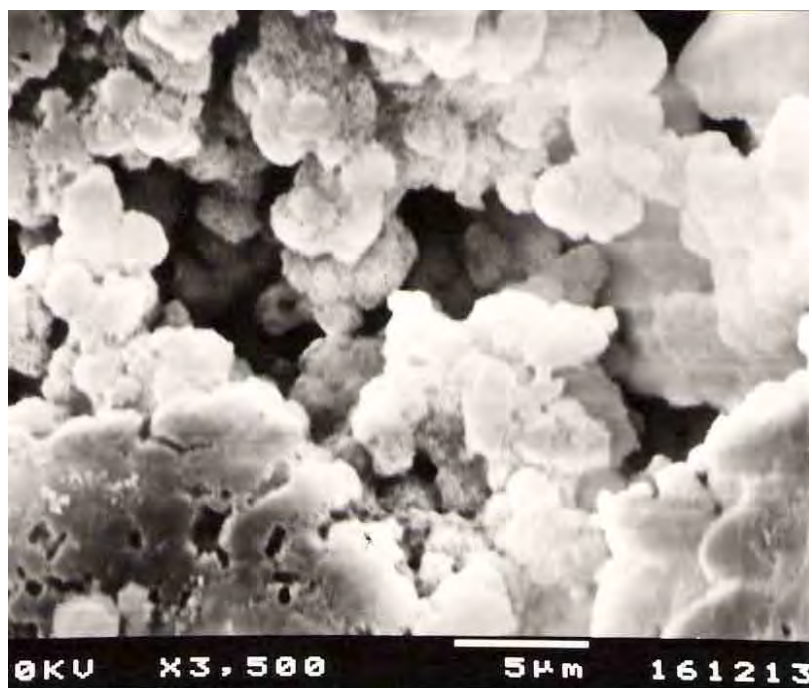
**Figura 20:** Eletromicrografia do 1º segmento do cateter (“olho” do cateter) após 27horas e 50min. O biofilme recobre quase que totalmente a superfície (x2000)



**Figura 21:** Eletromicrografia do 2º segmento do cateter (2cm da ponta) após 27horas e 50min. Presença de biofilme recobrando a superfície do cateter (x2000).



**Figura 22:** Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (4cm da ponta) após 27horas e 50min. O biofilme recobre totalmente a superfície (x2000).



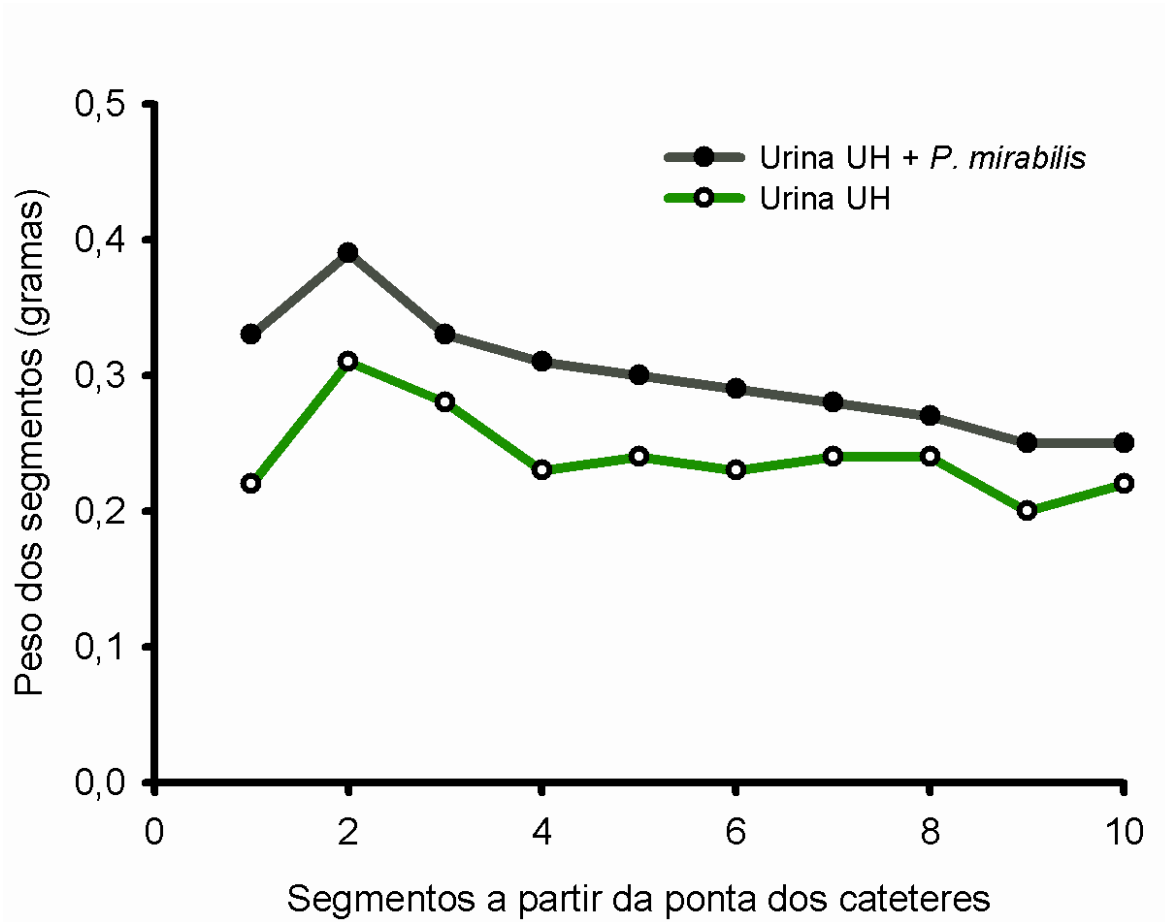
**Figura 23:** Eletromicrografia do 3º segmento do cateter (4cm da ponta) após 27horas e 50min. Pode-se notar a altura do biofilme (x3500).

### 5.10. PESO DOS SEGMENTOS DOS CATETERES APÓS A CANALIZAÇÃO DA URINA UH COM E SEM A INOCULAÇÃO DE *P. mirabilis*

Nestes resultados foram comparados a variação no peso de dez segmentos dos cateteres (n = 3) antes e após a canalização da urina UH com sem a inoculação de *P. mirabilis*. Comparando-se os pesos dos segmentos verificou-se que houve uma diferença significativa quando aplicada a ANOVA 1 p <0,05 ( Tabela 9, figura 24). A urina UH sem a inoculação do *P. mirabilis*. A urina UH sem a inoculação do *P. mirabilis* fluiu do reservatório para o frasco encamisado por 30 horas. O pH da urina manteve-se em 6,1 durante todo o experimento e não houve o bloqueio do cateter.

Tabela 9: Peso dos 10 segmentos dos cateteres após os experimentos com a urina UH com e sem o inóculo de *P. mirabilis*

Segmento	Peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina UH (n=1)	Média de peso dos segmentos (gramas) após a canalização da urina UH com o <i>P. mirabilis</i> (n=3)
1	0,2249	0,3271
2	0,3082	0,3850
3	0,2830	0,3337
4	0,2342	0,3075
5	0,2389	0,2997
6	0,2255	0,2864
7	0,2367	0,2810
8	0,2352	0,2729
9	0,2010	0,2540
10	0,2224	0,2452



**Figura 24:** Peso dos segmentos dos cateteres após a canalização da urina UH e da urina UH contaminada com o *P. mirabilis*.  
Diferença estatisticamente significativa  $p < 0,05$  ANOVA 1



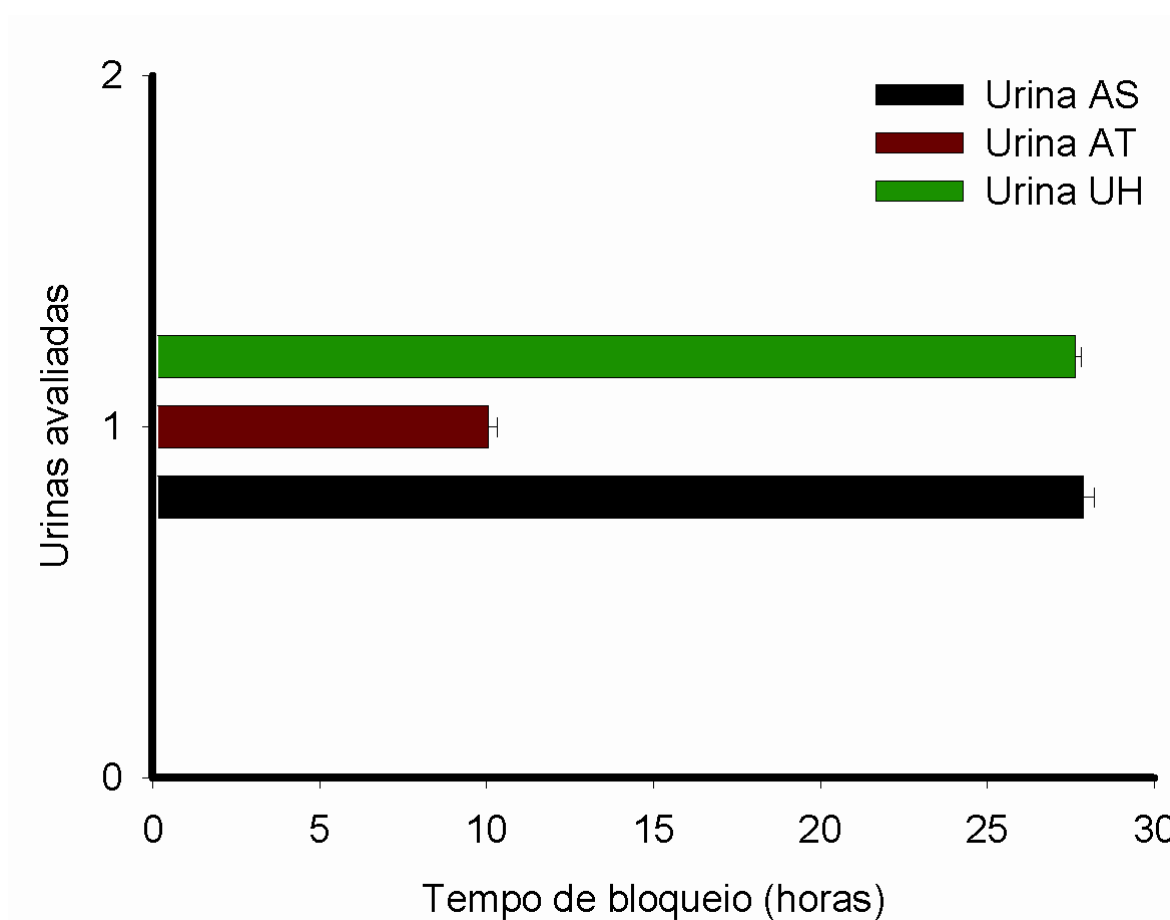
### 5.11 MÉDIA DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS URINAS ARTIFICIAIS AS, AT E URINA HUMANA UH

Comparando-se o tempo de bloqueio dos cateteres que canalizaram a urina AS vs urina AT os mesmos foram significativamente diferentes quando comparados pela ANOVA 1 seguida do Newman-Keuls post hoc teste  $p < 0,05$ . Comparando-se a média do tempo de bloqueio entre a urina AS e urina UH não foi observada diferença significativa  $p > 0,05$ . Comparando-se a média de tempo de bloqueio da urina UH vs urina AT a diferença foi significativa para  $p < 0,05$ . (Tabela 10, figura 25). O número de células viáveis inoculadas nas urinas AS, AT e UH e o número de células viáveis de *P. mirabilis* no momento do bloqueio do cateter não foi significativamente diferente quando comparadas pela ANOVA 1  $p > 0,05$  (Tabela 11).

Tabela 10: pH da urina inicial e final e tempo de bloqueio dos cateteres testados com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH.

Urina	pH das urinas no início do experimento	Tempo de bloqueio (horas) (SD)	pH das urinas no bloqueio
AS	6,1	27,867±0,586	> 8
AT	5,0	10,050±0,478	> 8
UH	6,1	27,650±0,304	> 8

Os valores dados são a média de três replicatas de cada experimento



**Fig. 25:** Média do tempo de bloqueio das urinas AS, AT e UH contaminadas com *P. mirabilis*.  
\*Média de três replicatas

Tabela 11: Média do número de microrganismos no inóculo, início e no final do experimento com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH.

<b>Urina</b>	<b>Número de células viáveis no inóculo (UFC/ml)</b>	<b>Número de células viáveis no início do experimento (UFC/ml)</b>	<b>Número de células viáveis no bloqueio (UFC/ml)</b>
<b>AS</b>	$2,80 \times 10^8$	$2,40 \times 10^6$	$1,80 \times 10^8$
<b>AT</b>	$4,93 \times 10^8$	$3,00 \times 10^6$	$3,02 \times 10^8$
<b>UH</b>	$2,73 \times 10^8$	$2,40 \times 10^6$	$2,14 \times 10^8$

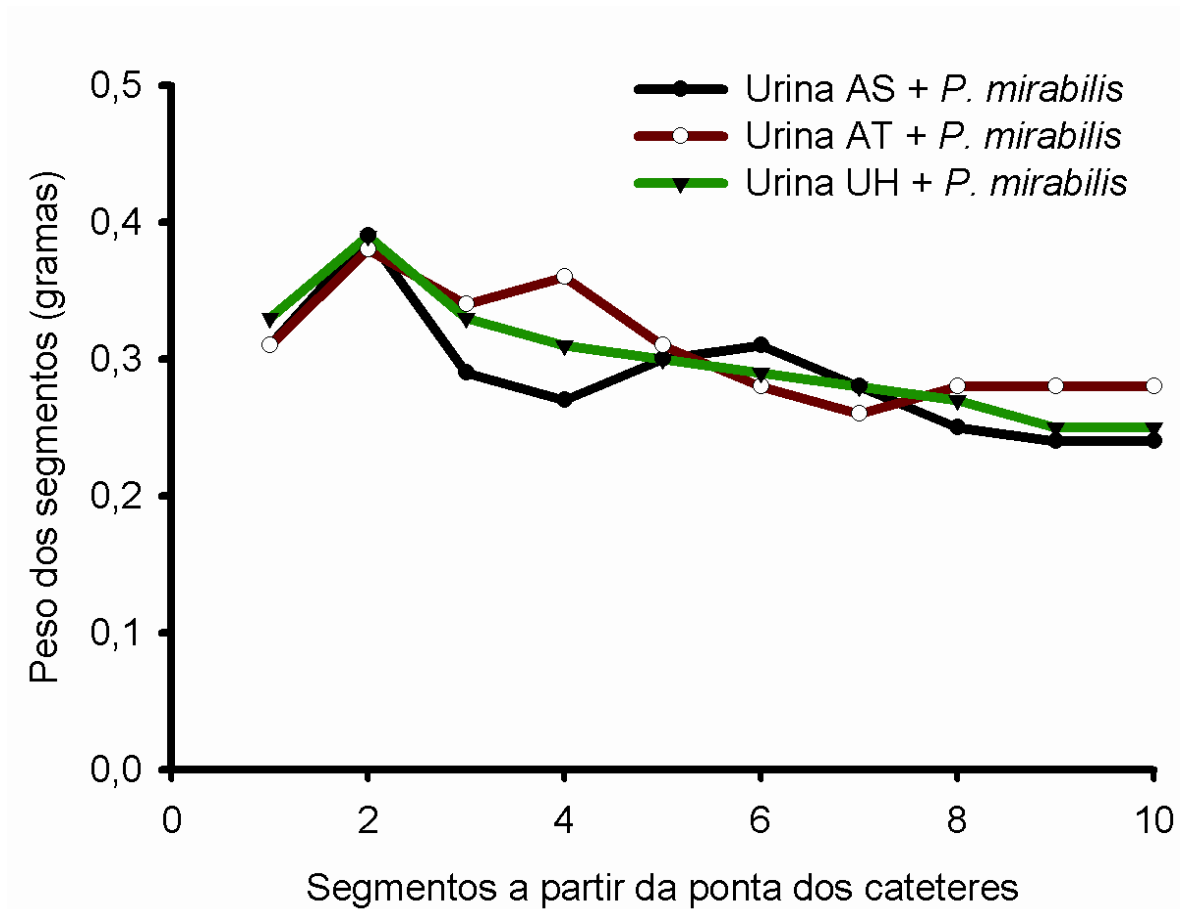
Os valores dados são a média de três replicatas de cada experimento

## 5.12. PESO DOS SEGMENTOS DOS CATETERES APÓS A CANALIZAÇÃO DAS URINAS AS, AT E UH APÓS A INOCULAÇÃO DE *P. mirabilis*

Foram comparados a variação no peso de dez segmentos dos cateteres (n = 9) após a canalização com as urinas AS, AT e o pool de urina humana UH contaminadas com o *P. mirabilis*. Comparando-se os pesos dos segmentos verificou-se que não houve diferença significativa quando aplicada a ANOVA 1 p > 0, 05 ( Tabela 12, Figura 26).

Tabela 12: Peso dos segmentos dos cateteres após os experimentos com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH após a contaminação com o *P. mirabilis*

Segmento	Média de peso (gramas) dos segmentos após a canalização da urina AS (n=3)	Média de peso (gramas) dos segmentos após a canalização da urina AT (n=3)	Média de peso (gramas) dos segmentos após a canalização da urina UH (n=3)
1	0,3067	0,3148	0,3271
2	0,3877	0,3763	0,3850
3	0,2911	0,3447	0,3337
4	0,2743	0,3585	0,3075
5	0,3008	0,3071	0,2997
6	0,3069	0,2797	0,2864
7	0,2775	0,2599	0,2810
8	0,2525	0,2832	0,2729
9	0,2394	0,2845	0,2540
10	0,2385	0,2783	0,2452



**Figura 26** Distribuição das incrustações no comprimento dos cateteres com as urinas artificiais AS e AT e com o pool de urina humana UH após a contaminação com o *P. mirabilis*.

## 7. DISCUSSÃO

O estudo da formação de incrustações nos cateteres urinários pode ser realizadas em modelos *in vivo* ou *in vitro*. A formação de incrustações foi observada por Ohkawa et al. (1990), Stickler et al. (1993), Koeler-Ockmore e Feneley (1996) em cateteres removidos de pacientes hospitalizados. Os modelos animais também são muito utilizados (MIYAKE et al., 1998; CHOONG et al., 2000; HILDEBRANDT et al., 2001). A variabilidade dos modelos humanos em termos de dieta, ingestão de líquidos, constituintes urinários e a infecção por uma ampla gama de microrganismos, dificulta o estudo da formação de incrustações nos biomateriais utilizados na manufatura dos cateteres (TIDD et al., 1976; NACEY et al., 1985; CHOONG et al., 2000). Os modelos animais são mais constantes em termos da sua reprodutividade, dieta e ingestão de líquidos, no entanto, os constituintes urinários são variáveis, pois os animais podem desenvolver infecção por micróbios diferentes dos que causam infecção em humanos (CORMIO et al., 1996) e a análise bioquímica das incrustações mostram que são distintas daquelas formadas nos seres humanos (SHAW et al., 2005). Os testes *in vitro* facilitam a comparação dos materiais para a formação de incrustações, pois proporcionam um ambiente adequado para o estudo da formação de incrustações nos materiais, uma vez que os resultados não são influenciados pela dieta do paciente, medicação, ou por diferenças metabólicas individuais (CHOONG et al., 2000). Vários modelos *in vitro* são objeto de estudo para a formação de incrustações nos biomateriais usados na manufatura dos cateteres urinários. Estes modelos são classificados como de fluxo estático ou contínuo. Os modelos de fluxo estático foram usados por diversos pesquisadores como Griffith et al.

(1976) e Hedelin et al. (1990). Assim, no modelo estático, as amostras a serem avaliadas eram colocadas em um recipiente contendo urina e esta era trocada em intervalos regulares. Apesar de possibilitarem o estudo de um grande número de amostras de diferentes materiais ao mesmo tempo em condições padronizadas de temperatura, bem como uma população definida de microrganismos, pode-se considerar que esse modelo não é o ideal, pois o mesmo não permite um fluxo contínuo de urina, ao contrário das condições a que os cateteres são expostos *in vivo*. Neste modelo, a estagnação do fluido ao redor do biomaterial aumenta a possibilidade de formação de incrustações. Ao contrário do modelo de fluxo estático, no modelo de fluxo dinâmico, o fluxo constante de urina sobre as amostras pode desalojar parte das incrustações. Este fato pode reduzir a massa de incrustações depositadas na superfície dos biomateriais mimetizando com maior acurácia o trato urinário (GORMAN et al., 2003). Os modelos de fluxo contínuo para o estudo da formação de incrustações nos materiais podem ser como o modelo desenvolvido por Tunney et al. (1997) baseado no Modified Robbins Device (MRD) onde discos das amostras são colocadas horizontalmente em recipiente e uma bomba permite um fluxo constante de urina sobre as amostras. Este modelo possibilita o estudo de diversos materiais utilizados na manufatura dos cateteres (TUNNEY et al., 1999; GORMAN et al., 2003). Stickler et al. (1999) desenvolveram um modelo *in vitro* em que a urina é bombeada para o frasco no qual o cateter inflado está inserido. O modelo utilizado no presente estudo foi o desenvolvido por Stickler e colaboradores. Este modelo possibilitou observar a formação de incrustações por *P. mirabilis* nos cateteres sob condições

nas quais o cateter é mantido com o balão inflado como *in situ* e com um fluxo urinário fisiológico constante de 0,5ml/min (Figuras 5-9).

Neste estudo utilizou-se três urinas de diferentes formulações. A primeira urina a ser avaliada foi a urina artificial AS cuja formulação seguiu a preconizada por Stickler et al. (1999). A composição dessa urina foi baseada na utilizada por Griffith et al. (1976) contendo onze sais em concentrações equivalentes a encontradas na urina de 24 horas de homens saudáveis, utilizando no lugar da creatinina a gelatina. Na presente pesquisa, a urina artificial AS possibilitou a estabilização do *P. mirabilis* e a manutenção em  $10^8$ UFC/ml até o final dos experimentos (Tabela 2). Stickler et al. (1998) utilizaram um modelo de fluxo dinâmico para estudar a formação de incrustações nos cateteres uretrais utilizando a urina artificial AS contaminada com microrganismos produtores de urease: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Providencia rettgeri*. Assim, foi possível observar que a urina AS possibilitou o desenvolvimento e a manutenção de uma ampla gama de espécies microbianas encontrados no trato urinário em concentrações de  $10^8$  UFC/ml por 24 horas. O tempo médio de bloqueio após a canalização da urina AS pelos cateteres (látex siliconizado 14F, RÜSCH) foi de 27 horas e 50min (Tabela 1). Os resultados acima foram compatíveis com os observados por Morris et al. (1997) que avaliaram o tempo de bloqueio nos cateteres uretrais manufaturados com diferentes materiais e de várias marcas utilizando o modelo de fluxo dinâmico da bexiga cateterizada. O tempo de bloqueio dos cateteres de látex siliconizado fabricados pela Warne, Simpla, Rüsck, Eschmann e Bard (14F) variou de 22 a aproximadamente 43 horas. O



tempo de bloqueio do cateter de látex siliconizado Rüşh foi de aproximadamente 27-28 horas semelhante ao tempo de bloqueio obtido na pesquisa de 27 horas e 50min (Tabela 1). O pH da urina foi verificado antes da contaminação com *P. mirabilis* e no momento do bloqueio do cateter e a urina estava alcalina com alteração do pH de 6,1 para > 8,0 (Tabela 1) em decorrência da hidrólise da uréia pela urease bacteriana. Este resultado confirma o de outros pesquisadores com a mesma formulação de urina e utilizando o mesmo modelo de fluxo dinâmico da bexiga cateterizada (STICKLER et al., 1998; MORRIS e STICKLER, 2001).

A segunda urina avaliada foi a urina artificial AT cuja formulação seguiu a preconizada por Tunney et al. (1999) e Gorman (2003). A composição dessa urina foi baseada na utilizada por Cox et al. (1988) contém concentrações elevadas de  $\text{Ca}^{+2}$ ;  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{PO}^{+2}$  e acrescida de ovalbumina de galinha. A alteração realizada na formulação dessa urina foi a diminuição da concentração de ovalbumina de galinha. Cox et al. (1989b) utilizou 20g/l de solução; Tunney et al. (1999) 2g/l e Gorman et al. (2003) 0,4g/l. A urina artificial AT utilizada na presente pesquisa possibilitou o desenvolvimento do *P. mirabilis* em  $10^8$ UFC/ml no momento do bloqueio do cateter (Tabela 5). O tempo médio de bloqueio após a canalização da urina AT pelos cateteres (látex siliconizado 14F, RÜSCH) foi de 10 horas e 13min (Tabela 4). O pH da urina foi verificado antes da contaminação com *P. mirabilis* e no momento do bloqueio do cateter a urina estava alcalina com o pH > 8,0 (Tabela 4). Essa formulação de urina artificial foi utilizada por muitos pesquisadores como Cox et al. (1989b), Tunney et al. (1996) e Gorman et al. (2003) no estudo da capacidade de inibição de formação de incrustações dos diversos biomateriais. Cox et al. (1989b) avaliaram 90 amostras (6cm cada)

seccionadas de cateteres manufacturados com silicone e látex revestidos com hidrogel mantidas por 18 semanas em um modelo *in vitro* de fluxo dinâmico e observaram que o pH da solução foi inicialmente de 5,3 e após o a adição de urease sintética elevou-se para valores maiores que 8,0 em poucas horas. Tunney et al. (1997) utilizaram essa urina adicionada de urease de “*jack bean*” (feijão de porco) para avaliar a formação de incrustações em amostras de silicone e poliuretano utilizando um modelo semelhante ao MRD (Modified Robbins Device) e observaram a formação de incrustações em ambos os materiais. Park et al. (2002) avaliaram a formação de incrustações em cateteres com revestimentos de hidrogéis desenvolvidos pelos mesmos e em cateteres comerciais de látex revestido com silicone (Rüsch 18F) utilizando a urina proposta por Tunney et al. (1999) contaminada com *P. mirabilis* ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) em um modelo de fluxo dinâmico semelhante ao desenvolvido por Stickler et al. (1999). Os cateteres comerciais foram bloqueados em  $7,8 \pm 2,8$  horas, um tempo de bloqueio semelhante foram obtidos utilizando a urina AT (10:13 horas). A concentração de microrganismos no inóculo inicial nessa pesquisa (Tabela 5), foi semelhante ao utilizado por Park et al. (2002), entretanto o número de células viáveis não foi determinado no momento do bloqueio do cateter.

O terceiro grupo de experimentos foi realizado utilizando-se um pool de urina humana de 24 horas coletadas de três voluntários. A urina humana é utilizada por vários pesquisadores para verificar a formação das incrustações. Hugosson et al. (1990) estudaram a formação de incrustações na urina da manhã coletada de sete voluntários. Cada urina foi adicionada de urease (“*jack bean*” urease E.C. 3.5.1.5. Sigma, St. Louis, USA) e incubada separadamente por 4

horas em tubos de vidro contendo uma pérola de vidro imersa na solução. Observaram que na urina de alguns indivíduos com pH entre 7,5-8,5 não ocorria a formação de incrustações e que em alguns indivíduos ocorria a formação de incrustações com valores de pH urinário abaixo de 6,3. Choong et al. (2000) estudaram a formação de incrustações nos cateteres em modelo de fluxo dinâmico utilizando urina humana coletada de um voluntário e de um pool de urina humana e observaram que não houve diferença na formação de incrustações entre esses dois procedimentos. Na presente pesquisa, a urina humana UH possibilitou a manutenção *P. mirabilis* em  $10^8$ UFC/ml até o final do experimento (Tabela 9) de acordo com o observado por outros pesquisadores (MORRIS e STICKLER, 1998a; STICKLER et al., 2002). O tempo médio de bloqueio após a canalização da urina UH pelos cateteres (látex siliconizado 14F, RÜSCH) foi de 27horas e 50min (Tabela 8). O pH da urina foi verificado antes da contaminação com *P. mirabilis* e no momento do bloqueio do cateter e mostrou uma elevação de 6,1 para > 8,0. Morris e Stickler (1998a) utilizaram um modelo de fluxo dinâmico para estudar a formação de incrustações nos cateteres uretrais da marca Bard manufaturados com látex com revestimentos de silicone, hidrogel e prata e cateter 100% de silicone utilizando a urina de seis voluntários homens contaminada com  $3,7 \times 10^8$ UFC/ml de *P. mirabilis*. Nesse trabalho eles observaram que todos os cateteres foram bloqueados em até 48 horas. A população média de microrganismos determinada no momento do bloqueio do cateter foi de  $2,8 \times 10^8$ UFC/ml e o pH final foi superior a 8,0. O tempo médio para o bloqueio dos cateteres de látex revestidos com silicone foi de 38 horas. O número de células viáveis determinado no inóculo inicial e no momento da oclusão dos cateteres e o

pH inicial e final da urina observados nos resultados da presente pesquisa (Tabela 7 e 8) foram semelhantes. No entanto, o tempo médio para a oclusão dos cateteres foi maior. Essa diferença entre os resultados pode ser atribuída ao fato de que os cateteres utilizados em nossa pesquisa foram fabricados pela Rüsck enquanto Morris e Stickeler (1998) utilizaram cateteres de látex siliconizado de diferentes marcas como Bard, Simpla e Eschmann que bloquearam em 34, 28 e 44 horas respectivamente. Em um trabalho anterior de Morris et al. (1997), utilizando urina artificial, sobre qual dos cateteres urinários disponíveis comercialmente não ocorria a formação de incrustação e o bloqueio pelo biofilme de *P. mirabilis* foi observado que o tempo médio para o bloqueio dos cateteres de látex siliconizado da Bard (14F) foi de aproximadamente 37 horas enquanto os cateteres de látex siliconizado da Rüsck foram bloqueados em 27-28 horas. O tempo médio para o bloqueio dos cateteres de látex siliconizado Bard foi de 38 horas após a canalização com a urina artificial contaminada com o *P. mirabilis* e de aproximadamente 37 horas após a canalização com a urina humana contaminada com o *P. mirabilis*. O tempo médio de oclusão dos cateteres da marca Bard foi o mesmo para os dois tipos de urina.

No presente estudo foi utilizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observar a formação de incrustações nos segmentos dos cateteres após a canalização com as urinas AS, AT e UH contaminadas com o *P. mirabilis*. A observação dos biofilmes formados nos cateteres urinários por MEV tem sido usada por muitos pesquisadores como Cox et al. (1989a), Stickler et al. (1993), Nickel et al. (1994), Stickler et al. (2003b), Chakravarti et al. (2005). No entanto, sabe-se que a preparação das amostras pode distorcer as estruturas do biofilme.

O biofilme formado pelo *P. mirabilis* na urina representa uma oportunidade para o estudo do mesmo, uma vez que como o pH do biofilme torna-se alcalino, o fosfato de cálcio deposita-se entre as células do biofilme e cria um “molde de gesso” (*plaster-cast*), impedindo a distorção do biofilme no momento da preparação das amostras (STICKLER, 2005).

A MEV dos segmentos dos cateteres canalizados com a urina AS contaminada com *P. mirabilis* mostrou a formação de biofilme nos três segmentos iniciais do cateter (Figuras 10-12). A figura 10 mostra que as incrustações desenvolveram-se extensivamente na região do olho do cateter (segmento 1) conforme foi observado por Stickler et al. (2003b). Nas eletromicrografias dos segmentos 2 e 3 pode-se observar a formação do biofilme recobrimo toda a superfície do cateter (Figuras 11 e 12). No segmento 3 também foram encontrados bacilos isolados sobre a superfície do cateter (Figura 13).

A MEV dos segmentos dos cateteres canalizados com a urina AT contaminada com *P. mirabilis* mostrou a formação de biofilme nos três segmentos (Figuras 15-18). As eletromicrografias 15,16 e 18 mostram a presença de cristais e bactérias associados. Na figura 17 observa-se a formação de um biofilme isolado sob a superfície interna do cateter de aspecto irregular. A associação de cristais e bactérias descritas acima também foram observadas por diversos pesquisadores com Gepi-Attee e Feneley (1997) e Tunney et al. (1997) após a utilização da urina AT acrescida de urease comercial. A presença de cristais e bactérias também foi observada por Park et al. (2002) na região do olho do cateter.

A MEV dos segmentos dos cateteres canalizados com a urina UH contaminada com *P. mirabilis* mostrou a presença do biofilme nos três segmentos (Figuras 20-23) o que está de acordo com as observações de Stickler et al. (1998), Morris e Stickler (1998a) e Jones et al. (2005).

As eletromicrografias dos segmentos dos cateteres mostraram a formação de biofilme por *P. mirabilis* após a canalização com os três tipos de urina usadas nessa pesquisa. Para os experimentos realizados com as urinas AS, AT e UH sem a contaminação com o *P. mirabilis* não ocorreu elevação do pH do meio durante o período de 30 horas nem o bloqueio do cateter. Griffith et al. (1976) observaram que não ocorreu a alcalinização das urinas artificiais e humanas nem a formação de incrustações nas perolas de vidro imersas nas urinas sem a presença da urease artificial ou da contaminação com um microrganismo produtor de urease como o *P. mirabilis*.

Na presente pesquisa observou-se que o peso dos segmentos dos cateteres foi significativamente diferente quando canalizados com as urinas AS, AT e UH contaminadas com o *P. mirabilis* quando comparados com o peso dos cateteres canalizados com as urinas AS, AT e UH sem a contaminação com o *P. mirabilis* (Figura 14, Figura 19 e Figura 24) o que está de acordo com as observações de Sarangapani et al. (1995). O aumento no peso dos cateteres foi maior nos doze centímetros iniciais do cateter o que pode ser causado pela maior formação de incrustações nos segmentos iniciais do cateter conforme observado por Kunin et al. (1987) e Morris et al. (1997).

Os dados obtidos mostram que o tempo de bloqueio dos cateteres urinários canalizados com as urina AS e UH contaminadas com o *P. mirabilis* não foram

estatisticamente diferentes (Tabela 10), resultados esses que são concordantes com os obtidos por Morris e Stickler (1998a) ao compararem o tempo de bloqueio de diversos cateteres da marca Bard utilizando urina artificial da mesma composição que a AS e um pool de urina humana. Os cateteres canalizados com a urina AT contaminada com o *P. mirabilis* apresentaram um tempo de bloqueio menor (Tabela 10). Provavelmente este resultado pode ser devido a composição da urina AT que apresenta concentrações em g/l de cálcio e magnésio muito maiores do que a encontradas na urina humana de 24 horas e na urina AS na adição de ovalbumina de galinha. De acordo com Hugosson et al. (1990) as concentrações de cálcio e magnésio presentes na urina afetam a formação de incrustações e a *chicken ovalalbumin* induz a formação de incrustações de acordo com Choong et al. (2000). Contudo, quando os pesos dos segmentos dos cateteres após a canalização com as urinas AS, AT e UH contaminadas com o *P. mirabilis* foram comparados não houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles (Tabela 12, Figura 26).

O estudo da formação de incrustações e a avaliação de biomateriais para uso no trato urinário requerem avaliações *in vitro* e modelos apropriados são necessários. Muitos pesquisadores têm desenvolvido novos modelos para o estudo das incrustações (SARANGAPANI et al., 1995; STICKLER et al., 1999; TUNNEY et al., 1999; CHOONG et al., 2000), entretanto pouca atenção tem sido dada a composição das urinas utilizadas nessas pesquisas (BURNS e FINLAYSON, 1980). Hugosson et al. (1990) observaram que a composição da urina influencia na formação de cálculos de fosfato amoníaco-magnésiano (estruvita) e fosfato de cálcio (carbonato apatita). Também, os fatores presentes

na urina humana, e que não estão presentes na urina artificial, podem influenciar o processo de incrustação (McLEAN et al., 1985; MORRIS e STICKLER, 1998a) iniciando, promovendo ou inibindo-a. O potencial da urina para a cristalização não está apenas relacionado com a concentração de algum componente particular, mas também com a presença ou ausência de outros componentes, tal como agentes inibidores ou promotores da cristalização do componente em questão (CHOONG et al., 2000; KÖNIGSBERGER e KÖNIGSBERGER; 2001). A urina é uma solução complexa cujas propriedades não são meramente a agregação das propriedades individuais de cada componente em uma solução simples, havendo uma grande interação entre os diversos componentes. As substâncias podem interagir sinergicamente promovendo alguns efeitos, ou interferindo e bloqueando efeitos individuais. A relação complexa de cada amostra de urina não depende apenas da composição integral da urina, incluindo a composição precisa de muitas macromoléculas diferentes que podem se ligar para precipitar íons, mas até o pH da amostra pode alterar o grau de ionização dos componentes urinários produzindo um novo grupo de interações e propriedades (CHOONG et al., 1999; CHOONG et al., 2000; SULLER et al., 2005). A urina artificial é deficiente em proteínas cruciais, algumas das quais ainda deverão ser identificadas e os efeitos de muitas delas ainda não foram completamente entendidos, mas pensa-se estarem envolvidos no processo de formação das incrustações.

A urina humana possibilita uma maior semelhança no estudo da formação das incrustações *in vitro* com o ambiente fisiológico em que elas se desenvolvem no trato urinário ela pode apresentar algumas dificuldades para a



sua utilização como a necessidade de doadores, a possibilidade da presença de microrganismos contaminantes e a variabilidade na sua composição.

A urina artificial tem a vantagem de que a sua composição pode ser controlada, e as variações intra e interexperimentais eliminadas pelo uso de uma composição constante (TUNNEY et al., 1999; CHOONG et al., 2000). Assim, a urina artificial pode ser utilizada para estimar a incrustação de um grande número de biomateriais simultaneamente (TUNNEY et al., 1996).

A composição das várias urinas é o fator principal que influencia o tempo de bloqueio dos cateteres de látex siliconizado. O pH urinário inicial (6,1: urinas AS, UH e 5,0 urina AT) não afetou o tempo de formação de incrustações e o bloqueio dos cateteres. Devido à maior concentração de cálcio, magnésio e fosfato na urina artificial AT, ela assegura uma medida mais confiável para testar a habilidade dos cateteres de Foley em resistir à formação de incrustações pelo *P. mirabilis*.

Novas pesquisas devem ser realizadas para estudar quais os fatores presentes na urina humana além das concentrações de cálcio e magnésio estão envolvidos no processo de formação de incrustações. Novos biomateriais para a manufatura dos cateteres devem ser desenvolvidos e avaliados quanto a resistência à formação de biofilme e incrustações quando expostos a supersaturação dos íons cálcio e magnésio.

## 7. CONCLUSÕES

O modelo proposto de bexiga artificial possibilitou observar as incrustações e o bloqueio nos cateteres de Foley estudados

As formulações de urinas artificiais e humana examinadas permitiram o crescimento do *Proteus mirabilis* em  $10^8$ UFC/ml

Houve o desenvolvimento de biofilme de *P. mirabilis* nas condições estudadas de fluxo dinâmico, temperatura e com a canalização das três urinas de diferentes formulações

O tempo de bloqueio dos cateteres após a canalização com as urinas artificial AS e humana UH contaminadas com o *P. mirabilis* não foram diferentes ( $p>0,05$ )

O tempo de bloqueio dos cateteres após a canalização com a urina artificial AT contaminada com o *P. mirabilis* foi diferente dos tempos de bloqueio dos cateteres após a canalização com as urinas AS e UH contaminadas com o *P. mirabilis* ( $p<0,05$ )

Não ocorreu o bloqueio dos cateteres na ausência do *P. mirabilis*

O peso dos segmentos dos cateteres foi diferente quando canalizados com as urinas AS, AT e UH contaminadas com o *P. mirabilis* e quando comparados com o peso dos cateteres canalizados com as urinas AS, AT e UH sem a contaminação com o *P. mirabilis* ( $p < 0,05$ )

O peso dos segmentos dos cateteres quando testados com o *P. mirabilis* foram estatisticamente iguais para os três tipos de urina ( $p > 0,05$ )

## 8. REFERÊNCIAS

BEESON, N. P. The case against the catheter. **Am. J. Med.**, v. 24, p. 1-3, 1958.

BEIKO, D. T.; KNUDSEN, B. E.; WATTERSON, J. D.; CADIEUX, P. A.; REID, G.; DENSTEDT, J. D. Urinary tract biomaterials. **J. Urol.**, v. 171, p. 2438-2444, 2004.

BICHLER, K.-H.; EIPPPER, E.; NABER, K.; BRAUN, V.; ZIMMERMAMM, R.; LAHME, S. Urinary infection stones. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 19, p. 488-498, 2002.

BIHL, G.; MEYERS, A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. **Lancet**, v. 358, p. 651-656, 2001.

BRAUDE, A. I.; SIEMIENSKI, J. Role of bacterial urease in experimental pyelonephritis. **J. Bacteriol.**, v. 80, p.171-9, 1960

BROCKLEHURST, J. C.; BROCKLEHURST, S. The management of indwelling catheters. **Br. J. Urol.**, v. 50, p. 102-5, 1978.

BROWN, T. R., 1901 apud BICHLER, K.-H. EIPPPER, E.; NABER, K.; BRAUN, V.; ZIMMERMAMM, R.; LAHME, S. Urinary infection stones. **Int J. Antimicrob. Agents.**, v. 19, p. 488-498, 2002.

BRUCE, A. W.; SIRA, S. S.; CLARK, A. F.; AWAD, S. A. The problem of catheter encrustation. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 111, p. 238-239, 1974.

BURNS, J. R.; FINLAYSON, B. A proposal for a standard reference artificial urine in *in vitro* urolithiasis experiments. **Invest. Urol.**, v. 18, p. 167-169, 1980.

BURR, R. G.; NUSEIBEH, I. The blocking urinary catheter: the role of variation in urine flow. **Br. J. Urol.**, v. 76, p. 61-65, 1995.

CHAKRAVARTI, A; GANGODAWILA, S.; LONG, M. J.; MORRIS, N. S; BLACKLOCK, A. R.; STICKLER, D. J. An electrified catheter to resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilm. **J. Urol.**, v. 174, p. 1129-1132, 2005.

CHOONG, S. K. S.; WHITFIELD, H. N. Biofilms and their role in infections in urology. **BJU Int.**, v. 86, p. 935-941, 2000a.

CHOONG, S. K. S.; WHITFIELD, H. N. Urinary encrustation of alloplastic materials, **J. Endourol.**, v. 14, p. 19-23, 2000b.

CHOONG, S. K. S.; WOOD, S.; WHITFIELD, H. N. A model to quantify encrustation on ureteric stents, urethral catheters and polymers intended for urological use. **BJU Int.**, v. 84, p. 414-421, 2000.

CHOONG, S. K. S.; HALSON, H. N.; WHITFIELD, H. N.; FRY, C.H. The physicochemical basis of urinary catheter encrustation. **BJU. Int.**, v. 83, p. 770-775, 1999.

CORMIO, L.; VUOPIO-VARKILA, J.; SIITONEN, A.; TALJA, M.; RUUTU, M. Bacterial adhesion and biofilm formation on various double-J stents *in vivo* and *in vitro*. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v. 30, p.19-24, 1996.

COKER, C.; POORE, C. A.; LI, X.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 1497-1505, 2000.

COX, A. J.; HULKINS, D. W. L.; SUTTON, T. M. Comparison of *in vitro* encrustation on silicone and hydrogel-coated latex catheters. **BJU.**, v. 61, p.156-161, 1988.

COX, A. J.; HULKINS, DAVIES K. E., IRLAM, J. C. (1987) apud TUNNEY, M. M.; BONNER, M. C.; KEANE, P. F.; GORMAN, S. P. Development of a model for assessment of biomaterial encrustation in the upper urinary tract. **Biomaterials**, v. 17, p. 1025-1029, 1996.

COX, A. J.; HULKINS, D. W. L.; SUTTON, T. M. Infection of catheterized patients: bacterial colonisation of encrusted Foley catheters shown by scanning electron microscopy. **Urol. Res.**, v. 17, p. 349-352, 1989a.

COX, A. J.; MILLINGTON, D. W.; HULKINS, D. W. L.; SUTTON, T. M. Resistance of catheters coated with a modified hydrogel to encrustation during an *in vitro* test. **Urol. Res.**, v. 17, p. 353-356, 1989b.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 277-281, 2001.

DUKES, C. Urinary tract infection after excision of the rectum; their cause and prevention. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 22, p. 259-270 1929.

DUMANSKI, A. J.; HEDELIN, H.; EDIN-LILJEGREN, A.; BEAUCHEMIN, D.; McLEAN, R. J. C. Unique ability of the *Proteus mirabilis* capsule to enhance mineral growth in infectious urinary calculi. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2998-3003, 1994.

ELVES, A. W.; FENELEY, R. C. Long-term urethral catheterization and the urine-biomaterial interface. **Br. J. Urol.**, v. 80, p. 1-5, 1997.

FINLAYSON, B.; DUBOIS, L. Kinetics of calcium oxalate deposition *in vitro*. **Invest. Urol.**, v. 10, p. 429-433, 1973.

GEPPI-ATTEE, S.; FENELEY, R. C. L. A modified semi-automated technique for *in vitro* assessment of encrustation of materials. **Proc. Inst. Mech. Eng. [H]**, v. 211, p. 475-478, 1997.

GETLIFFE, K. A. The use of bladder wash-outs to reduce urinary catheters encrustation. **Br. J. Urol.**, v. 73, p. 696-700, 1994.

GETLIFFE, K. Managing recurrent urinary catheter blockage: problems, promises, and practicalities. **J. Wound Ostomy Continence Nurs.**, v. 30, p. 146-151, 2003.

GETLIFFE, K.; MULHALL, A. B. The encrustation of indwelling catheters. **Br. J. Urol.**, v. 67, p. 337-341, 1991.

GLEESON, M. J.; GLUECK, J. A.; FELDMAN, L.; GRIFFITH, D. P.; NOON, G., 1989 apud CHOONG, S. K. S.; WOOD, S.; WHITFIELD, H. N. A model to quantify encrustation on ureteric stents, urethral catheters and polymers intended for urological use. **BJU Int.**, v. 84, p. 414-421, 2000.

GORMAN, S. P.; GARVIN, C. P.; QUIGLEY, F.; JONES, D. S. Design and validation of a dynamic flow model simulating encrustation of biomaterials in the urinary tract. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 55, p. 461-468, 2003.

GRIFFITH, D. P. Infection-induced renal calculi. **Kidney Int.**, v. 21, p. 422-430, 1982.

GRIFFITH, D. P.; MUSHER, D. M.; ITIN, C. Urease: the primary cause of infection induced urinary stones. **Invest. Urol.**, v. 13, p. 346-350, 1976.

GRIFFITH, D. P.; OSBORNE, C. A. Infection (urease) stones. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 13, p. 278-285, 1987.

HABASH, M. S.; REID, G. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 39, p. 887-898, 1999.

HAGER, B. H.; MAGATH, T. B. The etiology of encrusted cystitis with alkaline urine. **JAMA**, v. 85, p. 1352-1355, 1925.

HEDELIN, H. Uropathogens and urinary tract concretion formation and catheter encrustations. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 19, p. 484-487, 2002.

HEDELIN, H.; BRATT, C. G.; ECKERDAL, G.; LINCOLN, K. Relationship between urease-producing bacteria, urinary pH and encrustation on indwelling urinary catheters. **Br. J. Urol.**, v. 67, p. 527-531, 1991.

HEDELIN, H.; EDDELAND, A.; LARSSON, L.; PETTERSSON, S.; OHMAN, S. The composition of catheter encrustations, including the effects of allopurinol treatment. **Br. J. Urol.**, v. 56, p. 250-254, 1984.

HEDELIN, H.; EDIN-LILJEGREN, A.; GRENABO, L.; HUGOSSON, J.; LARSSON, P.; PETTERSSON, S.E. coli and urease-induced crystallisation in urine. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v. 24, p.57-61, 1990.

HEDELIN, H.; GRENABO, L.; PETTERSSON, S. Urease-induced crystallization in synthetic urine. **J. Urol.**, v. 133, p. 529-532, 1985.

HILDEBRANDT, P.; SAYYAD, M.; RZANY, A.; SCHALDACH, M.; SEITER, H. Prevention of surface encrustation of urological implants by coating with inhibitors. **Biomaterials**, v. 22, p. 503-507, 2001.

HOLMES, S. A. V.; CHENG, C.; WHITFIELD, H. N. The development of synthetic polymers that resist encrustation on exposure to urine. **B.J.U.**, v. 69, p. 651-655, 1992.

HUKINS, D. W.; HICKEY, D. S.; KENNEDY, A. P. Catheter encrustation by struvite. **Br. J. Urol.**, v.55, p. 304-305, 1983.

HUGOSSON, J.; GREABO, L.; HEDELIN, H.; PETTERSSON, S.; TARFUSSER, I. How variations in the composition of urine influence urease-induced crystalization. **Urol. Res.**, v. 18, p. 413-417, 1990.

JOHNSON, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; WILT, T. J. Systematic review: antimicrobial urinary catheters to prevent catheter-associated urinary tract infection in hospitalized patients. **Ann. Intern. Med.**, v. 144, p.116-126, 2006.

JONES, G. L.; MULLER, C. T.; O'REILLY, M.; STICKLER, D. J. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 57, p. 266-272, 2006.

JONES, G. L.; RUSSELL, A. D.; CALISKAN, Z.; STICKLER, D. J. A strategy for the control of catheter blockage by crystalline *Proteus mirabilis* biofilm using the antibacterial agent triclosan. **Eur. Urol.**, v. 48, p. 838-845, 2005.

KOHELER-OCKMORE, J.; FENELEY, R. C. Long-term catheterization of the bladder: prevalence and morbidity. **Br. J. Urol.**, v. 77 p. 347-511, 1996.

KÖNIGSBERGER, E.; KÖNIGSBERGER, L. C. Thermodynamic modeling of crystal deposition in humans. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, p. 785-797, 2001.

KUNIN C. M. Blockage of urinary catheters: role of microorganisms and constituents of the urine on formation of encrustations. **J. Clin. Epidemiol.**, v. 42, p. 835-842, 1989.

KUNIN, C. M. Nosocomial urinary tract infections and the indwelling catheter. What is new and what is true? **Chest**, v. 120, p. 10-12, 2001.

KUNIN, C. M.; CHIN, Q. F.; CHAMBERS S. Indwelling urinary catheters in the elderly. Relation of "catheter life" to formation of encrustations in patients with and without blocked catheters. **Am. J. Med.**, v. 82 p.405-411, 1987.

KUNIN, C. M.; DOUTHITT, S.; DANCING, J.; ANDERSON, J.; MOESCHBERGER, M. The association between the use of urinary catheters and



morbidity and mortality among elderly patients in nursing homes. **Am. J. Epidemiol.** v. 135, p. 291-301, 1992.

LAWRENCE, E. L.; TURNER, I. G. Kink, flow and retention properties of urinary catheters part 2: Novel design. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.17, p. 153-159, 2006.

LI, X.; MOBLEY, H. L. T. Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 19, p. 461-465, 2002.

LI, X.; ZHAO, H.; LOCKATELL, C. V.; DRACHENBERG, C. B.; JOHNSON, D.; MOBLEY HL. Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 389-394, 2002.

MAKI, D. G.; TAMBYAH, P. A. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 342-347, 2001.

MATHUR, S.; SULLER, M. T.; STICKLER, D. J.; FENELEY, R. C. Prospective study of individuals with long-term urinary catheters colonized with *Proteus* species. **BJU Int.**, v. 97, p. 121-128, 2006.

McLEAN, R. J. C.; NICKEL, J. C.; NOKAES, V. C.; COSTERTON, J. W. An *in vitro* ultrastructural study of infectious kidney stone genesis. **Infect. Immun.**, v. 49, p. 805-811, 1985.

McLEAN, R. J. C.; STICKLER, D. J.; NICKEL, J. C. Biofilm mediated calculus formation in the urinary tract. **Cell. Mater.**, v. 6, p. 165-174, 1996.

MIYAKE, O.; YOSHIOKA, T.; YOSHIMURA, K.; HONDA, M.; YAMAGUCHI, S.; KOIDE, T.; OKUYAMA, A. expression of Tamm-Horsfall protein in stone-forming rat models. **Br. J. Urol.**, v. 81, p. 14-9, 1998.

MOBLEY, L. T.; BELAS, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. **Trends Microbiol.**, v. 3; p. 280-284, 1995.

MOBLEY, H. L.; WARREN, J.W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 2216-2217, 1987.

MOOG, F. P.; KARENBERG, A.; MOLL, F. The catheter and its use from Hippocrates to Galen. **J. Urol.**, v. 174, p. 1196-1198, 2005.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J. Does drinking cranberry juice produce urine inhibitory to the development of crystalline, catheter-blocking *Proteus mirabilis* biofilms? **BJU Int.**, v. 88, p. 192-197, 2001.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J. Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. **J. Hosp. Infect.**, v. 39, p. 227-234, 1998a.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J. The effect of urease inhibitors on the encrustation of urethral catheters. **Urol. Res.**, v. 26, p. 275-279, 1998b.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; McLEAN, R. J. C. The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. **World J. Urol.**, v. 17, p. 345-350, 1999.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J.; WINTERS, C. Wich indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms? **Br. J. Urol.**, v. 80, p. 58-63, 1997.

MORTON, A. R.; ILIESCU, E. A.; WILSON, J. W. Nephrology: 1. Investigation and treatment of recurrent kidney stones. **CMAJ**, v. 166, p. 213-218, 2002.

NACEY, J. N.; TULLOCH, A. G. S.; FERGUSON, A. F. Catheter-induced urethritis: a comparison between latex and silicone catheters in a prospective clinical trial. **Br. J. Urol.**, v. 57, p. 325-328, 1985.

NICKEL, J. C.; COSTERTON, W.; McLEAN, R. J. C.; OLSON, M. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infection. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 33, p. 31-41, 1994.

NORBERG, A.; NORBERG, B.; LUNDBECK, K.; PARKHEDE, U. Urinary pH and the indwelling catheter. **Ups. J. Med. Sci.**, v. 85, p.143-50, 1980.

OHKAWA, M.; SUGATA, T.; SAWAKI, M.; NAKASHIMA, T.; FUSE, H.; HISAZUMI, H. Bacterial and crystal adherence to the surfaces of indwelling urethral catheters. **J. Urol.**, v. 143, p.717-21, 1990.

PARK, J. H.; CHO, Y. W.; KWON, I. C.; JEONG, S. Y.; BAE, Y. H. Assessment of PEO/PTMO multiblock copolymer/segmented polyurethane blends as coating materials for urinary catheters: *in vitro* bacterial adhesion and encrustation behavior. **Biomaterials**, v. 23, p. 3991-4000, 2002.

PIZZOLITTO, E. L.; ITO, I. Y.; GUASTALDI, A. C. Corrosion induced by *Streptococcus mutans* (*in vitro*) observed on restorative dental materials. In: Microbial Corrosion. Proceedings of the International EFC Workshop. Edited by CAC Sequeira. Published for the European Federation of Corrosion by IOM Communications, Great Britain, n 29, p. 179-189, 2000.

PLATT, R.; POLK B. F., MURDOCK, B., ROSNER, B. Mortality associated with nosocomial urinary-tract infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 637-642, 1982.

REID, G.; BUSSCHER, H. I.; SHARMA, S.; MITTELMAN, M. W.; McINTYRE, S. Surface properties of catheters, stents and bacteria associated with urinary tract infections. **Surf. Sci. Rep.**, v. 21, p. 251-273, 1995.

ROBINSON J. Urethral catheter selection. **Nurs. Stand.**, v. 15, p. 39-42, 2001.

SABBUBA, N.; HUGHES, G.; STICKLER, D. J. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. **BJU Int.**, v. 89, p. 55-60, 2002.

SANTIN, M.; MOTTA, A.; DENYER, S. P; CANNAS, M. Effect of the urine conditioning film on ureteral stent encrustation and characterization of its protein composition. **Biomaterials**, v. 20, p. 1245-1251, 1999.

SARANGAPANI, S.; CAVEDON, K.; GAGE, D. An improved model for bacterial encrustation studies. **J. Biomed. Mater. Res.**, v 29, p. 1185-1191, 1995.

SCHIERHOLZ, J. M.; YÜCEL, N.; RUMP, A. F. E.; BEUTH, J.; PULVERER, G. Antiinfective and encrustation-inhibiting materials-myth and facts. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 19; p. 511-516; 2002.

SCHMITZ, W.; NOLDE, A.; MARKLEIN, G.; HESSE, A., 1993 apud TUNNEY, M. M.; KEANE, P. F.; GORMAN, S. P. Assessment of urinary tract biomaterial encrustation using a modified Robbins device continuous flow model. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 38, p. 87-93, 1997.

SEDOR, J.; MULHOLLAND, G. Hospital-acquired urinary tract infections associated with the indwelling catheter. **Urol. Clin. North. Am.**, v. 26, p. 821-828, 1999.

SHAW, G. L.; CHOONG, S. K.; FRY, C. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. **Urol. Res.**, v. 33, p. 17-23, 2005

SOFER, M.; DENSTEDT, J. Encrustation of biomaterials in the urinary tract. **Curr. Opin. Urol.**, v. 10, p. 563-569, 2000.

SRINIVASAN, V.; CLARK, S. Encrustation of catheter material *in vitro*. **J. Urol.**, v. 108, p. 473, 1972.

STARK, R. P.; MAKI, D. G. Bacteriuria in the catheterized patient. What quantitative level of bacteriuria is relevant? **N. Engl. J. Med.**, v. 311, p. 560-564, 1984.

STEGMAYR, B.; STEGMAYR, B. Crystal formation induced by uropathogenic bacteria. An *in vitro* study in human urine. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, v. 17, p. 197-203, 1983.

STICKLER, D. J. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, v. 92, p.163-170 2002.

STICKLER, D. Urinary catheters: ideal sites for the development of biofilm communities. **Microbiol. Today**, p. 22-25, 2005.

STICKLER, D. J.. EVANS, A.; MORRIS, N.S.; HUGHES, G. Strategies for the control of the catheter encrustation. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 19, p.499-506, 2002.

STICKLER, D. J.; GANDERTON, L.; KING, J.; NETTLETON, J.; WINTERS, C. *Proteus mirabilis* biofilms and encrustation of urethral catheters. **Urol. Res.**, v. 21, p. 407-411, 1993.

STICKLER, D. J.; JONES, G. L.; RUSSEL, A. D. Control of encrustation and blockage of Foley catheters. **Lancet**, v. 361, p. 1435-1437, 2003a.

STICKLER, D. J.; MORRIS, N. S.; MORENO, M-C.; SABBUBA, N. Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, p. 649-652, 1998.

STICKLER, D. J.; MORRIS, N. S.; WILLIAMS, T. J. An assessment of the ability of a silver-releasing device to prevent bacterial contamination of urethral catheter drainage systems. **Br. J. Urol.**, v. 78, p. 579-588, 1996.

STICKLER, D. J.; MORRIS, N. S.; WINTERS, C. Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. **Methods Enzymol.**, v. 310, p. 494-501, 1999.

STICKLER, D. J.; YOUNG, R.; JONES, C.; SABBUBA, N.; MORRIS, N. S. Why are Foley catheters so vulnerable to encrustation and blockage by crystalline bacterial biofilm? **Urol. Res.**, v. 31, p. 306-11. 2003b.

SULLER, M. T.; ANTHONY, V. J.; MATHUR, S.; FENELEY, R. C.; GREENMAN, J.; STICKLER, D. J. Factors modulating the pH at which calcium and magnesium phosphates precipitate from human urine. **Urol. Res.**, v.33, p. 254-260, 2005.

SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **J. Biol. Chem.**, v. 69, p. 435-441, 1926.

TAKEUCHI, H.; TAKAYAMA, H.; KONISHI, T.; TOMOYOSHI, T. Scanning electron microscopy detects bacteria within infection stones. **J. Urol.**, v. 132, p. 67-69, 1984.

TIDD, M. J.; GOW, J. G.; PENNINGTON, J. H.; SHELTON, J. SCOTT, R. Comparison of hydrophilic polymes-coated latex, uncoated latex and PVC indwelling balloon catheters in the prevention of urinary infection. **BJU**, v. 48, p. 285-291, 1976.

TORZEWSKA, A.; STACZEK, P.; RÓZALSKI, A. Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysaccharides. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, p. 471-477, 2003.

TUNNEY, M. M.; BONNER, M. C.; KEANE, P. F.; GORMAN, S. P. Development of a model for assessment of biomaterial encrustation in the upper urinary tract. **Biomaterials**, v. 17, p. 1025-1029, 1996.

TUNNEY, M. M.; JONES, D. S.; GORMAN, S. P. Biofilm and biofilm-related encrustation of urinary tract devices. **Methods Enzymol.**, v. 310, p. 558-566, 1999.

TUNNEY, M. M.; KEANE, P. F.; GORMAN, S. P. Assessment of urinary tract biomaterial encrustation using a modified Robbins device continuous flow model. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 38, p. 87-93, 1997.

WARREN, J. W. The catheter and urinary tract infection. **Med. Clin. North Am.**, v. 75, p. 481-492, 1991.

WARREN, J. W.; TENNEY, J. H.; HOOPEES, J. M.; MUNCIE, H. L.; ANTHONY, W. C. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. **J. Infect. Dis.**, v. 146, p. 719-723, 1982.

WESTERGREN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 7, p. 82-83, 1978.

WOLLASTON, W. H., 1797 apud BICHLER, K.-H.; EIPPPER, E.; NABER, K.; BRAUN, V.; ZIMMERMAMM, R.; LAHME, S. Urinary infection stones. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 19, p. 488-498, 2002.

## 9. ANEXOS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_ RG, \_\_\_\_\_ estado civil \_\_\_\_\_ idade  
 residente à: \_\_\_\_\_ . n° \_\_\_\_\_ bairro \_\_\_\_\_ cidade \_\_\_\_\_ telefone \_\_\_\_\_

Concordo em participar do estudo "**Avaliação de biofilme de *Proteus mirabilis* em modelo experimental de fluxo dinâmico**", como voluntário e declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

- ▶ Este trabalho tem por objetivo observar a formação de pedras na sonda vesical e verificar a quantidade de cálcio e magnésio na urina.
- ▶ A urina será utilizada em laboratório de análises clínicas.
- ▶ Estou sabendo que a minha participação na pesquisa é doar minha urina expelida em 24 horas e acondicionada em frasco fornecido pelo pesquisador
- ▶ O frasco dado a mim pelos pesquisadores é limpo e descartável
- ▶ Fui esclarecido que a realização da pesquisa não implica em riscos para mim, participante, uma vez que a urina será colhida por mim mesmo.
- ▶ Estarei contribuindo para o esclarecimento da formação de pedras em sondas.
- ▶ Estou ciente que serei esclarecido durante todo o decorrer da pesquisa sobre quaisquer dúvidas relacionadas a utilização da urina doada.
- ▶ Estou ciente que possuo plena liberdade para desistir da referida pesquisa, retirando o meu consentimento a qualquer momento, sem sofrer nenhuma penalização por isto.
- ▶ Estou ciente que os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras; porém será garantido o sigilo de minha identidade, assegurando a minha privacidade.

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara,.....de.....de .....

---

Assinatura do paciente ou responsável

---

*Assinatura do Pesquisador Responsável*

Observações:

Este protocolo de pesquisa foi analisado e recebeu parecer favorável à sua execução do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP.

Para solicitação de esclarecimentos entrar em contato com a pesquisadora responsável: Gabriela Maria Pavan de Arruda Camargo – telefones: 3301-6107 ou 3335-8105

Para notificação de qualquer situação de anormalidade que não puder ser resolvida pelo pesquisador, o sujeito da pesquisa deverá entrar em contato com o Comitê, pelo telefone: (0XX 16) 3301-6897.