



**Universidade de Aveiro** Departamento de Química

**Ano 2014**

**Bruno Filipe  
Teixeira Pereira**

**Estudo de biofilmes mistos em modelos de  
cateteres urinários**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob orientação da Doutora Luísa Serafim, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor Nuno Azevedo, Investigador Auxiliar do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

**o júri**

presidente

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Rebelo Barreto Xavier  
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof. Dr. Filipe José Menezes Mergulhão  
Professor Auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal  
Professora Auxiliar Convidada da Universidade de Aveiro

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores, Professora Doutora Luísa Serafim e Doutor Nuno Azevedo, pelo apoio, orientação, paciência e conhecimentos transmitidos ao longo de todo o trabalho.

À Doutora Carina Almeida por todos os conselhos e orientação.

À aluna de doutoramento Andreia Azevedo pela paciência, técnicas e cuidados ensinados e por todo o acompanhamento ao longo do trabalho.

À Doutora Ana Nicolau pela ajuda na obtenção das imagens de microscopia confocal.

À aluna de doutoramento Luciana Gomes, pela cedência dos cupões de PEO.

Aos membros do BEL pela boa disposição transmitida todos os dias, pelos conselhos e ajudas sempre que precisei.

À Patrícia por todo o apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

E quero agradecer especialmente aos meus pais que fizeram imensos sacrifícios para que pudesse alcançar esta etapa.

**palavras-chave**

Infeções do Trato Urinário Associadas a Cateteres, Biofilme, Hibridação Fluorescente *in-situ*, Ácido Nucleico Bloqueado, RNA-2'O-metil.

**resumo**

As infecções do trato urinário associadas a cateteres (CAUTI) são o principal tipo de infecções adquiridas em hospital. Estas infecções resultam, na sua maioria, de biofilmes que se formam na superfície dos cateteres, no entanto pouco é conhecido sobre a dinâmica dos biofilmes e sobre as interações entre as diferentes espécies presentes.

O objetivo deste trabalho foi estudar a interação entre as espécies *Escherichia coli* e *Achromobacter xylosoxidans* utilizando hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para discriminar entre as duas espécies em biofilmes mistos, comparando a dinâmica populacional em biofilmes simples e mistos e o comportamento em dois materiais usados no fabrico de cateteres urinários: silicone e poli (óxido de etileno).

Através de contagens de células cultiváveis em biofilmes simples e mistos verificou-se que *A. xylosoxidans* não afetou significativamente o crescimento de *E. coli*, no entanto esta última prejudicou o crescimento de *A. xylosoxidans* durante as primeiras 24h, favorecendo-o a partir das 48h.

Neste trabalho foi realizada uma primeira abordagem ao estudo de biofilmes associados a CAUTI utilizando sondas de LNA e 2'OMe em protocolos de FISH, tendo-se verificado a existência de interações entre espécies patogénicas e não patogénicas que podem alterar o crescimento destas. Provou-se que o método de FISH pode ser usado para estudar a distribuição populacional em biofilmes mistos e que as sondas de LNA e 2'OMe podem ser usadas nestes biofilmes pois permitem a discriminação das espécies presentes.

**Keywords**

Catheter Associated Urinary Tract Infections, Biofilm, Fluorescence in situ Hybridization, Locked Nucleic Acid, 2' O-methyl RNA

**abstract**

Catheter associated urinary tract infections (CAUTI) are the main kind of hospital acquired infections. These infections arise mostly of biofilms formed on the catheter's surface, however little is known about biofilm's dynamics and the interactions between the different species in the biofilm.

The purpose of this work was to study the interaction between the species *Escherichia coli* and *Achromobacter xylosoxidans*, applying fluorescence in situ hybridization (FISH) for discriminating between the two species in mixed biofilms, comparing simple and mixed biofilm population dynamic and the behavior in two materials used in urinary catheter: silicon and poly (ethylene oxide).

Through cultivable cells counting in simple and mixed biofilms it was found that *A. xylosoxidans* did not affect the growth of *E. coli*, however *E. coli* impairs *A. xylosoxidans* growth during the first 24 hours, and helps it after 48 hours.

In this work a first approach to the study of mixed biofilms associated with CAUTI using LNA and 2'OMe probes in FISH protocols was made and it was verified the existence of interactions between pathogenic and non-pathogenic species that can change their growth. It was proved that the FISH method can be used to study the population distribution in mixed biofilms and that the LNA and 2'OMe probes can be used in these biofilms as they allow the discrimination between the present species.

## Índice

Índice .....	1
Índice de Figuras .....	3
Índice de Tabelas.....	5
Lista de Abreviaturas .....	6
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1. Infecções Nosocomiais.....	3
2.1.1. Infecções do Trato Urinário .....	3
2.1.1.1. Rotas de infecção em CAUTI .....	4
2.2. Cateteres de Foley .....	5
2.2.1. Materiais de fabrico dos cateteres de Foley .....	6
2.2.2. Revestimentos de cateteres .....	7
2.2.2.1. Revestimentos com substâncias antibacterianas .....	7
2.2.2.2. Revestimentos poliméricos.....	8
2.3. Biofilmes.....	10
2.3.1. Matriz extracelular dos biofilmes .....	10
2.3.2. Formação e desenvolvimento de biofilmes em CAUTI .....	13
2.3.3. Biofilmes cristalinos .....	16
2.4. Hibridação Fluorescente <i>in Situ</i> .....	18
2.4.1. Análogos de Ácidos Nucleicos .....	22
2.4.1.1. Ácidos nucleicos bloqueados ( <i>locked nucleic acid</i> – LNA).....	23
2.4.1.2. RNA 2'-O-metil (2'OMe).....	26
3. Materiais e Métodos .....	28
3.1. Microrganismos.....	28
3.2. Meios de Cultura .....	28
3.3. Formação e estudo de biofilmes simples e mistos .....	29
3.4. Hibridação fluorescente <i>in situ</i> - FISH.....	30
3.4.1. Sondas de LNA e 2'OMe .....	30
3.4.2. Otimização do protocolo de FISH.....	31
3.4.2.1. Otimização em lâmina.....	31
3.4.2.2. Otimização em Suspensão.....	32
3.5. Otimização das condições de sonicação.....	33
3.6. Análise Estatística .....	34

<b>4. Resultados e Discussão</b> .....	35
<b>4.1. Otimização protocolo de FISH em lâmina</b> .....	35
<b>4.2. Otimização do protocolo de FISH em suspensão</b> .....	37
<b>4.3. Otimização das condições de sonicação</b> .....	39
<b>4.4. Formação e estudo de biofilmes simples e mistos</b> .....	42
<b>5. Conclusões e Trabalho Futuro</b> .....	52
<b>5.1. Conclusões</b> .....	52
<b>5.2. Propostas de trabalho futuro</b> .....	53
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	55

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Locais mais comuns de infecções nosocomiais .....	3
<b>Figura 2</b> – Rotas de entrada de uropatogênicos ao trato urinário cateterizado.....	5
<b>Figura 3</b> – Cateter de Foley de látex.....	6
<b>Figura 4</b> – Imagem de SEM da superfície exterior de um cateter revestido por PTFE... 8	
<b>Figura 5</b> – Imagens de SEM de biofilmes formados em cateteres urinários .....	13
<b>Figura 6</b> – Imagens de SEM que mostram a extensão da encrustação em cateteres .....	16
<b>Figura 7</b> – Descrição geral do protocolo de FISH.....	19
<b>Figura 8</b> – Esquema simplificado das etapas de hibridação e detecção de CARD-FISH	22
<b>Figura 9</b> – Estruturas do DNA, RNA, LNA e 2'OMe .....	24
<b>Figura 10</b> – LNA representado por $\beta$ -D-LNA e a sua família molecular.....	25
<b>Figura 11</b> – Intensidade de fluorescência das diferentes sondas testadas a diferentes temperaturas.....	36
<b>Figura 12</b> – Imagens de microscopia de epifluorescência de amostras mistas de <i>E. coli</i> e <i>A. xylosoxidans</i> após protocolo de FISH em lâmina. ....	37
<b>Figura 13</b> – Intensidade de fluorescência obtida realizando o protocolo de FISH em lâmina e em suspensão a 57°C para as sondas selecionadas. ....	38
<b>Figura 14</b> – Imagens de microscopia de epifluorescência de uma amostra mista de <i>E. coli</i> e <i>A. xylosoxidans</i> após protocolo de FISH em suspensão realizado a 57°C.....	38
<b>Figura 15</b> – Perda de cultivabilidade celular nas diferentes condições de sonicação testadas .....	39
<b>Figura 16</b> – Imagens de microscopia de epifluorescência de biofilmes mistos formados em silicone antes e após sonicação.....	41
<b>Figura 17</b> – Cultivabilidade celular de <i>E. coli</i> e <i>A. xylosoxidans</i> em biofilmes simples e mistos formados em cupões de silicone ao longo de 192 horas. ....	42
<b>Figura 18</b> – Cultivabilidade celular de <i>E. coli</i> e <i>A. xylosoxidans</i> em biofilmes simples e mistos formados em cupões de PEO ao longo de 192 horas. ....	44
<b>Figura 19</b> – Imagens de microscopia de epifluorescência de suspensões celulares marcadas com FISH obtidas após sonicação de biofilmes mistos formados em cupões de silicone.....	45
<b>Figura 20</b> – Imagens de microscopia de epifluorescência de culturas celulares de <i>E. coli</i> e <i>A. xylosoxidans</i> cultivadas em AUM e marcadas realizando o protocolo de FISH em suspensão.....	47



<b>Figura 21</b> – Imagem de microscopia de epifluorescência de uma suspensão celular obtida após sonicação de um biofilme misto.....	47
<b>Figura 22</b> – Imagem de microscopia de epifluorescência de uma suspensão celular marcada com FISH, obtida após sonicação de biofilmes mistos formados em cupões de silicone.....	48
<b>Figura 23</b> – Imagens de microscopia confocal de biofilmes simples e mistos com 192h formados em cupões de silicone.....	50
<b>Figura 24</b> – Imagens de microscopia confocal de biofilmes simples e mistos com 192h formados em cupões de PEO.....	51

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> – Sumário de estudos de cateteres urinários revestidos com substâncias antimicrobinas .....	9
<b>Tabela 2</b> – Funções dos componentes das EPS nos biofilmes bacterianos .....	11
<b>Tabela 3</b> – Principais diferenças entre o LNA e o PNA .....	25
<b>Tabela 4</b> – Composição do meio de urina artificial (1L).....	29
<b>Tabela 5</b> – Sondas de LNA/2'OMe utilizadas.....	31

## Lista de Abreviaturas

2'OMe	RNA-2'O-metil
AUM	Meio de urina artificial
CAUTI	Infeções do trato urinário associadas a cateteres
CFU	Unidades formadoras de colónias
CY3	Cianina 3
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
D.O.	Densidade ótica
eDNA	DNA extracelular
FAM	Fluoresceína
FISH	Hibridação fluorescente <i>in situ</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
LNA	Ácido nucleico bloqueado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEO	Poli (óxido de etileno)
PI	Iodeto de propídio
PNA	Ácido nucleico peptídico
PS	Fosforotioato
UTI	Infeções do trato urinário

## 1. Introdução

Cerca de 25-40% de todas as infecções nosocomiais, ou seja, infecções adquiridas após admissão num hospital, correspondem a infecções do trato urinário (*urinary tract infections* - UTI) [1], encontrando-se cerca de 80% das UTI associadas à utilização de cateteres urinários (*catheter associated urinary tract infections* - CAUTI) [2]. Apesar da baixa mortalidade associada às CAUTI [3], estas infecções aumentam significativamente os custos de tratamento, contribuindo também para a disseminação de bactérias multirresistentes [4].

O agente patogénico mais comumente isolado destas infecções é a bactéria *E. coli* [4]. Os microrganismos presentes nas CAUTI crescem maioritariamente em biofilmes, tanto dentro como fora do cateter, onde as comunidades microbianas, compostas tanto de espécies patogénicas, como *E. coli*, e espécies não-patogénicas, como *A. xylosoxidans*, encontram-se depositadas numa superfície e inseridas numa matriz polimérica extracelular. Esta matriz aumenta a resistência da comunidade a antibióticos e protege-a de dessecação, oxidantes, radiação e outros agentes adversos [5].

De forma a desenvolver tratamentos mais eficazes e procedimentos que permitam diminuir a incidência de CAUTI, é necessário compreender as interações na comunidade microbiana e a dinâmica populacional dos biofilmes, utilizando técnicas capazes de distinguir entre as diferentes espécies presentes como a hibridação fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* - FISH). Esta técnica baseia-se no emparelhamento de sondas de DNA ou RNA marcadas com fluoróforos com um alvo específico na célula, tipicamente rRNA [6]. Estas sondas apresentam diversos problemas como a degradação por endonucleases assim como a sua baixa afinidade e especificidade [7]. Para ultrapassar estas questões foram desenvolvidos diversos análogos de ácidos nucleicos, entre os quais o ácido nucleico bloqueado (*locked nucleic acid* - LNA) e o RNA-2'O-metil (*2' O-methyl RNA* - 2'OMe). No LNA existe uma ponte de metileno entre o oxigénio 2' e o carbono 4' do anel de ribose, o que aumenta a especificidade e afinidade das sondas de LNA, diminuindo também a sua suscetibilidade a nucleases. O 2'OMe apresenta um grupo metilo no oxigénio 2', o que também confere uma maior afinidade das sondas para o RNA, não se verificando esse efeito para o DNA, e aumentando também a resistência das sondas à ação das endonucleases [8]. Uma vez que estes dois análogos apresentam o mesmo esqueleto fosfodiéster, é possível sintetizar sondas contendo simultaneamente LNA e 2'OMe.

Este trabalho tem como objetivo estudar a interação entre *E. coli* e *A. xylosoxidans* em biofilmes mistos, de forma a clarificar o papel dos microrganismos não patogénicos em CAUTI. Pretende-se verificar se a espécie não patogénica *A. xylosoxidans* altera o crescimento da *E. coli*. Para isso serão formados biofilmes simples e mistos em meio de urina sintética em condições estáticas, de forma a entender o tipo de interações que ocorrem entre as duas espécies. Será também comparada a formação e desenvolvimento dos biofilmes em dois materiais de fabrico dos cateteres urinários: silicone e poli (óxido de etileno) (*poly (ethylene oxide)* - PEO), utilizando-se estes materiais nas culturas, de forma aos biofilmes se formarem na sua superfície. A intervalos de tempo definidos os biofilmes serão analisados através da quantificação de células cultiváveis e recorrendo a FISH utilizando sondas de LNA e de 2'OMe. Pretende-se, através de FISH, quantificar as duas espécies assim como analisar a sua distribuição nos biofilmes.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Infecções Nosocomiais

Uma infecção nosocomial pode ser definida como: “Uma infecção adquirida num hospital por um paciente que tenha sido admitido por uma razão que não essa infecção”[9]. Na Europa, cerca de 6,1% dos pacientes internados desenvolvem infecções nosocomiais, sendo a prevalência em Portugal de 10,6% [10], afetando diversos locais do corpo humano, como se pode ver na Figura 1.

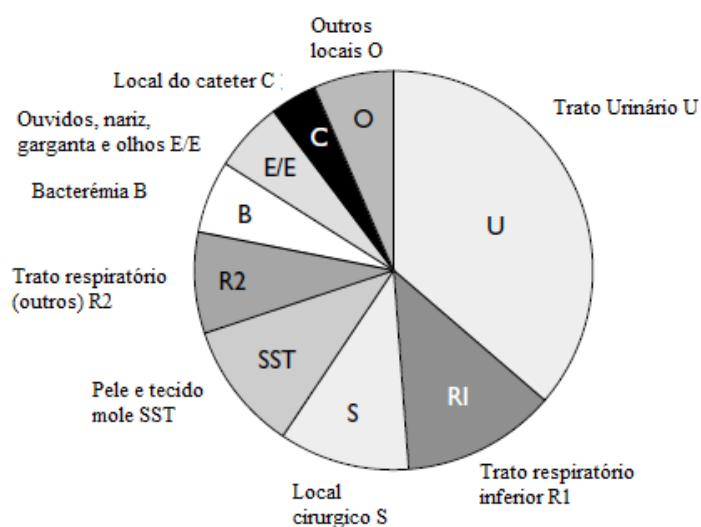


Figura 1 - Locais mais comuns de infecções nosocomiais [11]

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as infecções nosocomiais são responsáveis por um aumento de 7 mil milhões de euros nos custos anuais dos serviços de saúde na Europa, principalmente devido ao aumento do tempo de internamento que ascende aos 16 milhões de dias extras, e um aumento de 6,5 mil milhões de dólares nos EUA. Estas infecções aumentam também as taxas de mortalidade sendo responsáveis por 37000 mortes anuais na Europa e 99000 nos EUA [12].

#### 2.1.1. Infecções do Trato Urinário

A infecção nosocomial mais comum é a infecção do trato urinário (*urinary tract infection* – UTI), representando cerca de 25-40% de todas as infecções nosocomiais [1]. Nos hospitais, as infecções encontram-se frequentemente associadas à utilização de dispositivos invasivos, como ventiladores e cateteres [13], encontrando-se cerca de 80% das UTI associadas à utilização de cateteres urinários (*cateter associated urinary tract*

*infection* – CAUTI) [2]. Os cateteres urinários são usados quando o paciente não consegue controlar o fluxo de urina, seja por incontinência ou retenção da urina pós-operação [14], estimando-se que 10-25% dos pacientes internados sejam cateterizados durante a sua estadia no hospital [4]. Apesar das CAUTI não resultarem num excesso de mortalidade [3], aumentam os casos de bacterémia (presença de bactérias no sangue), o tempo de internamento e os custos de tratamento [4], contribuindo também para a distribuição de bactérias multirresistentes.

Cerca de 25% dos pacientes sujeitos a algaliação de curta duração (<7 dias) apresentam CAUTI, aumentando 5%, diariamente, o risco de contração. Assim, a probabilidade de adquirir CAUTI em algaliações de longa duração (>30 dias) é praticamente de 100% [15].

As CAUTI podem causar febre, uretrite e cistite ou ter consequências mais graves como pielonefrite, formação de cálculos e bacteriúria (presença de bactérias na urina), e caso não sejam tratadas podem causar choque séptico e até morte [16], no entanto a maioria das CAUTI é assintomática [17]. Assim, são normalmente diagnosticadas apenas quando se realiza uma análise à urina, considerando-se a ocorrência de infeção quando são detetadas  $\geq 10^5$  cfu/ml urina em pacientes não algaliados e  $\geq 10^3$  cfu/ml urina em amostras por cateterismo [18]. Em algaliações de curta duração, o uropatogénico bacteriano mais comum é a bactéria *E.coli*, presente em cerca de 39% das infeções [4]. Outras bactérias comuns em CAUTI são *Pseudomonas aeruginosa* (22%), *Enterococcus* spp. (15%), *Acinetobacter acinus* (11%), *Klebsiella* spp. (11%), e *Proteus* spp. (11%) [19]. Algumas espécies de leveduras também foram identificadas, sendo responsáveis por 3-32% dos casos de CAUTI [4]. *Candida albicans* é a levedura mais comum mas *C. glabrata*, *C. tropicalis* entre outras, também ocorrem [17]. Enquanto nas algaliações de curta duração, a bacteriúria deve-se maioritariamente a uma única espécie, nas algaliações de longa duração cerca de 95% das bacteriúrias são poli-microbianas.

#### **2.1.1.1. Rotas de infeção em CAUTI**

O mecanismo que leva a CAUTI ainda está envolto em discussão, no entanto existem algumas hipóteses para o mesmo, indicadas na Figura 2: no momento da algaliação, microrganismos presentes na uretra são transportados para a bexiga pelo cateter; crescimento de microrganismos na camada mucosa entre a uretra e o cateter, até atingirem a bexiga; crescimento de microrganismos no saco coletor, migrando depois pelo lúmen do cateter até à bexiga [20] e refluxo de urina contaminada do coletor para a bexiga quando os cateteres não são manuseados de forma correta ou existem aberturas no sistema. [17].

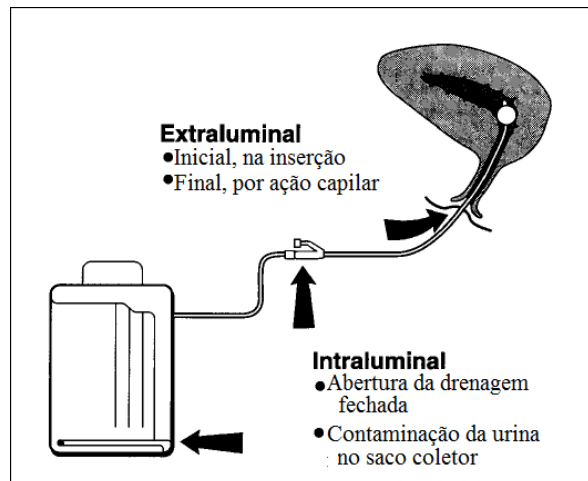


Figura 2 - Rotas de entrada de uropatogênicos ao trato urinário cateterizado [21]

Os dois últimos mecanismos dependem de uma contaminação da urina por parte de trabalhadores do serviço de saúde durante o manuseamento dos cateteres, sendo a ascensão dos microrganismos pelo lúmen do cateter mais importante no caso de organismos gram-negativos uma vez que na sua maioria proliferam na água (*water-borne*) [22].

Segundo um estudo de 1999 de Tambyah *et al.*, cerca de dois terços das infecções verificadas deveram-se a organismos que ascenderam à bexiga pelo exterior do cateter, uma vez que foram detetados primeiro em amostras do cateter e só depois em amostras do saco coletor [22]. No entanto, um estudo mais recente realizado por Barford *et al.* aponta para a contaminação durante a inserção do cateter como o mecanismo de infecção [23]. Neste estudo, verificou-se a presença de bactérias na ponta do cateter apenas um dia após a ligação, sendo a distribuição de CFU homogênea no exterior do cateter nos primeiros 5 dias, o que é consistente com uma distribuição homogênea das bactérias comensais da região periuretral ao longo da uretra. O fluxo de urina transporta algumas bactérias para o lúmen do cateter onde estas aderem, explicando porque é que em estudos anteriores [22] se detetaram bactérias primeiro no lúmen do cateter e só depois no saco coletor.

## 2.2. Cateteres de Foley

O cateter urinário mais usado atualmente é o cateter de Foley [24], representado na Figura 3.



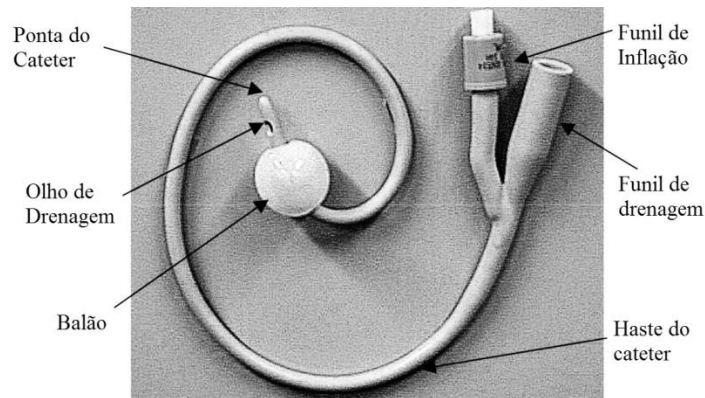


Figura 3 - Cateter de Foley de látex [25]

Desenvolvido por Frederick B. Foley na década de 30, era fabricado em látex [26], e consistia num cateter que era mantido em posição graças a um balão inflamado na bexiga. Nos modelos iniciais, os cateteres eram ligados a tubos coletores que conduziam a urina para um balde colocado ao lado da cama, sendo por isso designados por sistema de cateter aberto. Na década de 60, sacos coletores foram adicionados, permitindo manter a urina isolada do ambiente não estéril [14], baixando a incidência de infecção bacteriana de 97% para cerca de 8-15% [27]. Apesar do *design* ter mudado pouco desde essa altura, o cateter de Foley sofreu várias mudanças de material.

### 2.2.1. Materiais de fabrico dos cateteres de Foley

Como já referido, os primeiros cateteres de Foley eram fabricados em látex por ser um material barato, facilmente processado e moldado [25]. A dificuldade em reproduzir as propriedades desejáveis do látex fizeram com que, apesar dos problemas com a biocompatibilidade, uma vez que pode causar alergias, este material continue a ser um dos materiais de fabrico mais usados nos cateteres [28]. Uma alternativa ao látex é o silicone, que apresenta uma grande biocompatibilidade, o que reduz a toxicidade e reações alérgicas. Possui também características físicas desejáveis para o fabrico de cateteres. Por ser mais rígido que o látex, permite fabricar cateteres com uma parede mais fina, reduzindo o diâmetro externo. No entanto esta maior rigidez pode levar a um maior desconforto, havendo pacientes que preferem os de látex, apesar do maior diâmetro [25]. Uma outra desvantagem do uso de silicone é a rápida deflação do balão dos cateteres, que pode resultar numa saída prematura [24]. Estudos avaliando a capacidade de cateteres de silicone à adesão bacteriana produziram resultados contraditórios, uns concluíram que os

cateteres de silicone são os mais resistentes [29], enquanto outros consideram não existir diferença entre cateteres de silicone e de látex [30].

### **2.2.2. Revestimentos de cateteres**

De forma a tentar impedir o desenvolvimento de CAUTI, foram criados diversos tipos de revestimentos que podem ser aplicados aos cateteres independentemente do seu material de fabrico. Estes revestimentos podem ser constituídos por substâncias com propriedades antibacterianas, ou com materiais capazes de libertar de forma controlada e continua tais substâncias, como antibióticos.

#### **2.2.2.1. Revestimentos com substâncias antibacterianas**

Cateteres revestidos com EVA (*poly (ethylene-co-vinyl acetate)*) e com EVA/ PEO (*poly (ethylene oxide)*) impregnadas com gentamicina libertaram de uma forma contínua, durante 7 dias, este antibiótico, mantendo durante esse tempo a sua atividade antibacteriana [31]. Como a gentamicina se liberta rapidamente da superfície do cateter devido à sua natureza hidrofílica, a mesma matriz foi impregnada com norfloxacin. Devido à sua natureza hidrofóbica, ocorreu a libertação deste antibiótico durante 30 dias. No entanto, a sua atividade antibacteriana apenas se verificou por 10 dias [32]. Um estudo com cateteres impregnados com o antibiótico nitrofurazona mostrou a sua eficácia na redução da incidência de CAUTI mas apenas em algalias compreendidas entre 5 e 7 dias [33]. Apesar dos resultados positivos na diminuição da incidência de CAUTI, a libertação continuada de antibióticos acarreta grandes riscos de seleção de estirpes resistentes ao manter uma pressão seletiva no ambiente dos cateteres. Como tal, a incorporação de outras substâncias antimicrobianas que não antibióticos também foi estudada.

A prata é reconhecida pelas suas propriedades antissépticas. Vários estudos testaram a sua capacidade de diminuir a incidência de CAUTI, no entanto os resultados obtidos são contraditórios, havendo estudos que afirmam um efeito positivo, enquanto outros não verificaram diferenças [30, 34, 35]. Ao comparar revestimentos com óxido de prata e revestimentos com liga de prata, estes últimos aparentam ter uma maior eficácia no adiamento das CAUTI, presumivelmente devido à sua capacidade de permanecer no cateter por mais tempo [25]. Apesar das contradições e do risco de argiria, o fato das propriedades antibacterianas dos iões de prata serem conhecidos faz com que a sua incorporação em cateteres continue a ser estudada.

### 2.2.2.2. Revestimentos poliméricos

Além dos revestimentos com substâncias antimicrobianas, os cateteres também têm sido fabricados com vários tipos de revestimentos poliméricos, sendo os mais comuns o politetrafluoretileno (PTFE), hidrogéis e silicone, aplicando-se este último a cateteres de látex. Os hidrogéis são polímeros capazes de absorver uma grande quantidade de água [36]. Apesar desta absorção não alterar a forma do hidrogel, forma-se um filme fino de água na superfície de contacto, melhorando a lubrificação e a suavidade da superfície, e diminuindo as dificuldades da inserção do cateter [37]. Quando estes revestimentos são aplicados a cateteres de látex, devido à diferença nos módulos elásticos destes dois materiais, os hidrogéis são propensos a rachar, podendo causar ferimentos ao paciente e originando locais para a adesão bacteriana [38]. Estudos relativos à eficácia destes revestimentos são contraditórios, tanto isoladamente como em conjugação com outras alterações já referidas como revestimento com liga de prata [25, 39, 40].

Um dos materiais com uma maior biocompatibilidade que se conhece é o PTFE, que tem sido aplicado como revestimento dos cateteres de forma a minimizar o desconforto do paciente graças à sua baixa fricção e propriedades auto-lubrificantes [41]. Apesar de estudos iniciais concluírem que devido aos revestimentos com PTFE serem lisos, a incidência de incrustação diminuía [24], estudos mais recentes contrariam estes resultados, demonstrando que apesar de serem mais lisos que outros revestimentos, o PTFE apresenta uma superfície irregular, como se mostra na Figura 4, não havendo provas que o revestimento com PTFE seja menos suscetível que um cateter de látex [39].

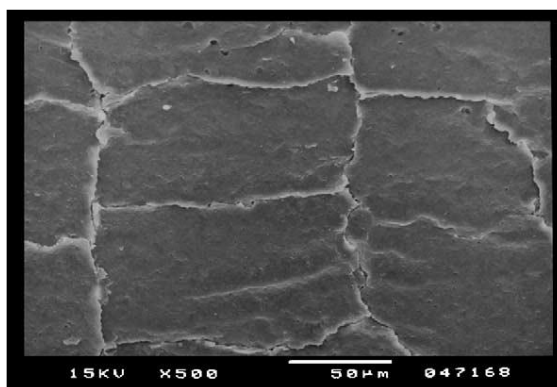


Figura 4 - Imagem de SEM da superfície exterior de um cateter revestido por PTFE [21]

Apesar de algumas das soluções indicadas serem aparentemente bem-sucedidas em diminuir a incidência de CAUTI em algaliasções de curto prazo, a longo prazo os problemas mantêm-se [42]. Alguns resultados obtidos com diferentes tipos de revestimentos estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Sumário de estudos de cateteres urinários revestidos com substâncias antimicrobinas (adaptado de [4]).

<b>Tipo de cateter</b>	<b>Grupo de Controle</b>	<b>Impacto antimicrobiano dos cateteres</b>
Revestido com liga de prata e impregnado com nitrofurazona	PTFE não revestido	Sem diferenças nas CAUTI
Impregnado com nitrofurazona	Silicone não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Revestido por liga de prata	Não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Silicone revestido por hidrogel e impregnado em prata	Silicone revestido por hidrogel	Sem diferenças nas taxas de bacteriúria
Liga de prata, revestido por hidrogel	Látex não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Revestido por nitrofurazona	Silicone não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria em pacientes com cateteres durante 5-7 dias
Impregnado em nitrofurazona	Silicone não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Liga de prata e revestido por hidrogel	Não revestido	Sem diferenças nas taxas de bacteriúria
Impregnado em liga de prata	Látex não revestido	Taxas mais baixas de UTI
Revestido com prata	Não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Liga de prata e revestido por hidrogel	Não revestido	Sem diferenças nas taxas de bacteriúria
Liga de prata e revestido por hidrogel	Látex não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria
Revestimento de prata	Silicone não revestido e látex não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria ( vs silicone); Sem diferenças nas taxas de bacteriúria ( vs látex)
Liga de prata e revestido por hidrogel	Não revestido e com revestimento de hidrogel	Taxas mais baixas de bacteriúria ( vs não revestido); Sem diferenças nas taxas de bacteriúria (vs revestido por hidrogel)
Revestimento de liga de prata	Látex não revestido	Taxas mais baixas de bacteriúria

A existência de diversos tipos de cateteres demonstra que nenhum dos desenvolvidos até ao momento seja melhor em prevenir a incidência de CAUTI e os problemas associados.

### **2.3. Biofilmes**

Na maioria dos ambientes naturais, a principal forma em que os microrganismos se encontram é através da associação com uma superfície numa estrutura designada biofilme [43]. Os microrganismos passam do crescimento planctónico para biofilme em resposta a condições adversas do meio, envolvendo várias vias de sinalização que resultam na alteração da expressão genética das células, o que leva a uma alteração das moléculas da superfície, o modo como os nutrientes são utilizados e expressão de fatores de virulência [44]. No biofilme, as bactérias encontram-se rodeadas pela matriz [45], que constitui cerca de 90% do peso seco do biofilme [45].

#### **2.3.1. Matriz extracelular dos biofilmes**

A matriz é constituída por substâncias extracelulares maioritariamente produzidas pelas próprias bactérias, consistindo em diversos polímeros como proteínas, fibras adesivas e DNA extracelular (eDNA). No seu conjunto estas estruturas designam-se por substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances* – EPS), e funcionam como suporte para a estrutura do biofilme [44, 46, 47].

As EPS mantêm as células bastante próximas, permitindo interações intensas, como comunicação intercelular e troca de DNA, promovendo a difusão de resistência a drogas e outros fatores de virulência [45, 48], protegendo simultaneamente as células de dessecação, oxidantes, radiação, predação, antibióticos, defesas do hospedeiro e de outros agentes adversos [5].

As enzimas extracelulares são retidas na matriz devido às suas interações com os polissacarídeos [49], gerando um sistema digestivo externo, que degrada os biopolímeros em produtos que podem ser absorvidos e usados como fonte de carbono e de energia. Algumas enzimas são capazes de degradar EPS estruturais, promovendo a libertação de bactérias do biofilme. Na matriz ficam também retidos os componentes de células lisadas, incluindo eDNA, permitindo a sua utilização como fonte de nutrientes e promovendo a transferência horizontal de genes [45]. O eDNA está presente na matriz como um componente integral e benéfico da mesma, como demonstrado em biofilmes de *S.*

*epidermidis* nos quais o eDNA resultante da autólise de uma subpopulação da bactéria, promove a formação do biofilme para a restante população [50]. As EPS também podem servir como fontes de nutrientes, em momentos de maior escassez, no entanto a sua grande diversidade torna difícil a sua total degradação. As proteínas não enzimáticas na matriz estão envolvidas na formação e estabilização da rede de polissacarídeos e são o ponto de ligação entre a superfície celular e as EPS. As principais funções dos componentes das EPS apresentam-se na Tabela 2.

Tabela 2- Funções dos componentes das EPS nos biofilmes bacterianos [45].

<b>Função</b>	<b>Relevância para os biofilmes</b>	<b>Componentes das EPS envolvidos</b>
Adesão	Permite os primeiros passos na colonização de superfícies abióticas e bióticas por células planctónicas e a ligação a longo prazo de biofilmes inteiro a superfícies	Polissacarídeos, DNA e moléculas anfipáticas
Agregação de células bacterianas	Permite a formação de pontes entre células, a imobilização temporária de populações bacterianas, o desenvolvimento de grandes densidades celulares e reconhecimento célula-célula	Polissacarídeos e DNA
Coesão dos biofilmes	Forma uma rede polimérica hidratada, mediando a estabilidade mecânica dos biofilmes, e através da estrutura dos EPS determina a arquitetura do biofilme e permite comunicação célula-célula	Polissacarídeos neutros e carregados, proteínas e DNA
Retenção de água	Mantem um microambiente hidratado em redor dos organismos do biofilme, protegendo-os da dessecação.	Polissacarídeos hidrofílicos e possivelmente, proteínas
Barreira Protetora	Confere resistência à defesa específica e não específica do hospedeiro e confere tolerância a diversos agentes microbianos. Protege a nitrogenase de cianobactérias de efeitos do oxigénio e protege de protozoários	Polissacarídeos e proteínas
Sorção de compostos orgânicos	Permite a acumulação de nutrientes do ambiente e sorção de xenobióticos	Polissacarídeos hidrofóbicos carregados e proteínas
Sorção de iões inorgânicos	Promove a formação de géis de polissacarídeos, troca de iões, formação de minerais e a acumulação de iões metálicos tóxicos	Polissacarídeos carregados e proteínas
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas para adquirir nutrientes e	Proteínas

	degradação de EPS estruturais, permitindo a libertação de células dos biofilmes	
Fonte de Nutrientes	Fornece uma fonte de carbono, azoto, e compostos contendo fósforo para utilização da comunidade do biofilme	Potencialmente todos os componentes da EPS
Troca de informação genética	Facilita a troca horizontal de genes entre células do biofilme	DNA
Recetor ou dador eletrónico	Permite atividade redox no biofilme	Proteínas e possivelmente substâncias húmicas
Exportação de componentes celulares	Liberta material celular como resultado do <i>turnover</i> metabólico	Vesículas membranares contendo ácidos nucleicos, lipopolissacarídeos e fosfolípidos
Reservatório de energia excessiva	Armazena carbonos em excesso em rácios carbono:azoto não equilibrados	Polissacarídeos
Ligação a proteínas	Resulta na acumulação, retenção e estabilização das enzimas através da sua interação com polissacarídeos	Polissacarídeos e enzimas

A composição dos EPS varia muito, dependendo das espécies presentes, assim como das condições a que estão sujeitas, o que dificulta a sua análise [51]. A arquitetura do biofilme depende das espécies presentes, como se pode ver na Figura 5, assim como dos exopolissacarídeos e proteínas produzidas, e também condições hidrodinâmicas, concentração de nutrientes, mobilidade celular e comunicação extracelular [45]. Apesar da complexa composição dos EPS, a água é o principal constituinte da matriz, fornecendo um ambiente altamente hidratado que seca mais lentamente que o meio, protegendo as células de flutuações no potencial hídrico [45].

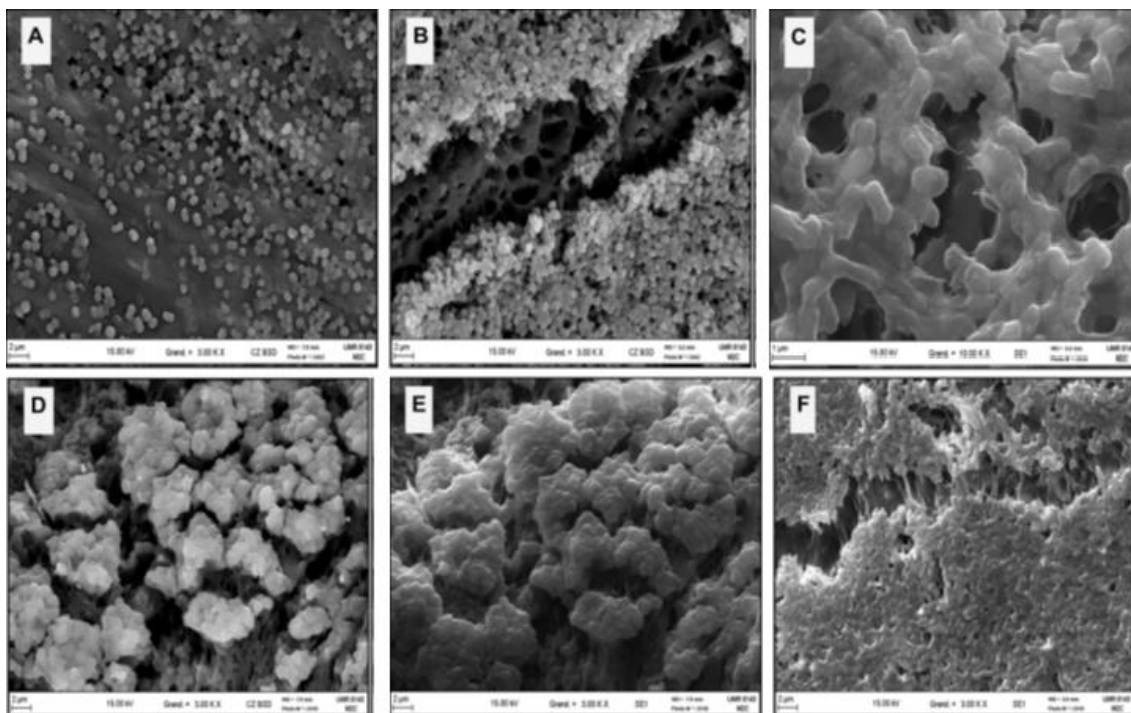


Figura 5 - Imagens de SEM de biofilmes formados em cateteres urinários. (A-C) Biofilmes de *Acinetobacter baumannii* (Ampliações originais: A, 1000x; B, 3000x; C, 10000x) (D e E) Biofilmes mistos de *Pseudomonas aeruginosa* e *A. baumannii*. (Ampliação original 3000x). (F) Biofilmes mistos de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Klebsiella ornithinolytica*. (Ampliação original 3000x). [15]

### 2.3.2. Formação e desenvolvimento de biofilmes em CAUTI

As bactérias associadas com CAUTI crescem em biofilmes aderidos à superfície do cateter [52]. Num primeiro instante, ocorre o condicionamento da superfície do cateter. Este processo consiste na deposição de polissacarídeos, minerais e proteínas da urina do hospedeiro, como a glicoproteína de Tamm-Horsfall, que facilitam a adesão das bactérias [53]. Esta adesão também ocorre no exterior do cateter, devido a interações com superfícies urogenitais do hospedeiro.

As estirpes de *E. coli* uropatogênicas (*uropathogenic E. coli* - UPEC) são os organismos mais frequentemente isolados em CAUTI. Estas podem ser classificadas em quatro grupos filogenéticos: A, B1, B2 e D, pertencendo aos grupos B2 e D as principais estirpes causadoras de CAUTI [54].

Para iniciar a formação de biofilmes, as UPEC têm que se ligar à superfície dos cateteres e do urotélio. A fímbria tipo 1 é o fator de virulência mais comum nas UPEC, expresso em pelo menos 80% das estirpes. É constituída pelas subunidades FimA, FimF, FimG e pela adesina FimH [55] e encontra-se associada a CAUTI recorrentes, uma vez que se encontra sobreexpressa na maioria das estirpes neste tipo de infecção, face a estirpes



presentes em infecções pontuais, sendo considerada fundamental para a interação das UPEC com as células do urotélio durante a colonização da bexiga [56]. Esta interação é feita através da FimH, uma adesina que reconhece e se liga à uroplaquina Ia e uroplaquina Ib em células uroteliais [57], reconhecendo também colagénio tipo I e IV, fibronectina e laminina [58]. Através da FimH, a fímbria tipo 1 é capaz de reconhecer e ligar-se à glicoproteína de Tamm-Horsfall, que se deposita durante o acondicionamento do cateter, estando por isso associada às interações iniciais com a superfície do cateter.

As fímbrias P são o segundo fator de virulência mais comum em UPEC e permitem a ligação às células epiteliais do rim, o que, juntamente com a sua presença em cerca de 80% das estirpes associadas a pielonefrite, apontam para a sua importância na virulência associada com pielonefrite [59]. As UPEC podem expressar outras adesinas como pili S [60], pili F1C [61], fímbria F9 [62] e adesinas Dr, estando estas últimas associadas a uma sobrevivência prolongada nas células epiteliais humanas [53].

Depois do biofilme estar estabelecido, as UPEC precisam de se adaptar ao ambiente do trato urinário e adquirir nutrientes graças a enzimas, toxinas como o CNF1, toxina autotransportadora secretada (*secreted autotransporter toxin* – Sat) e hemolisina, e sistemas de aquisição de nutrientes. Segundo um estudo, cerca de 37% dos isolados de UTI produziam CNF1 e Sat, enquanto menos de 1% dos isolados fecais produziam pelo menos um dos dois, revelando a virulência destes fatores [63]. A hemolisina provoca a lise das células do túbulo contorcido proximal do rim humano, libertando o ferro das células que depois é armazenado pela bactéria [64]. Os sistemas de aquisição de ferro, como recetores de sideróforos, são importantes fatores de virulência uma vez que este nutriente é limitante na urina [65].

Os flagelos das UPEC auxiliam a sua mobilidade, sendo importante para a ascensão do patogénico do cateter para a bexiga e daí para o ureter e rins. Apesar de não ser indispensável para a virulência nas UTI, a sua presença aumenta significativamente a persistência deste tipo de infeção [66]. São vários os fatores, além do flagelo, que auxiliam a formação de biofilmes pela UPEC como curlis, antigénio 43 e moléculas da matriz como celulose e ácido colânico [53]. Um estudo recente concluiu que os materiais dos cateteres, como silicone e silicone-látex, selecionam e promovem o crescimento das UPEC mais virulentas, enquanto as estirpes responsáveis por bacterémias assintomáticas formam melhor biofilmes em poliestireno e vidro [67].

Após a maturação do biofilme, o estabelecimento de UTI ocorre através da invasão das células do hospedeiro, graças a adesinas e toxinas como fímbrias tipo 1, adesinas Dr

e CNF1 [68-70]. A fímbria tipo 1 liga-se a recetores manosilados nas células superficiais do urotélio [71], provocando arranjos localizados da actina, o que leva à internalização da célula por fagocitose [72]. Apesar de poderem ser expelidas por sistemas de defesa da célula do hospedeiro, algumas bactérias conseguem permanecer na célula e migrar até ao citoplasma onde se replicam em estruturas designadas comunidades microbianas intracelulares (*intracellular bacterial communities* – IBC). Durante as primeiras 6 horas, as bactérias reproduzem-se rapidamente, resultando em pequenos grupos de bactérias fracamente associadas (IBC inicial). Depois, entre as 6 e 8 horas, a taxa de crescimento diminui drasticamente, duplicando o tempo de duplicação. Nesta fase, as bactérias encontram-se fortemente compactadas, formando uma esfera dentro da célula com uma estrutura semelhante aos biofilmes clássicos [73] (IBC maduros). Numa bexiga podem existir de 3 a 700 IBC clonais com cerca de  $10^5$  células, cada um [74]. As fibras da superfície bacteriana encerram as bactérias em compartimentos individualizados, enquanto os polissacarídeos formam cápsulas em torno das células ao longo de todo o processo de formação de IBC, protegendo-as dos neutrófilos [75, 76]. Conforme a IBC aumenta, começa a pressionar contra a membrana da célula, levando a que bactérias na periferia da IBC se desprendam e sejam libertadas para o lúmen da bexiga e recomecem o ciclo [77]. Apesar da falta de estudos que revelem a formação de IBC em seres humanos, UPEC retiradas de pacientes com UTI formaram IBC em seis estirpes diferentes de ratos, mostrando que este pode ser um fenómeno importante em seres humanos [78].

Estes biofilmes dificultam o diagnóstico de CAUTI uma vez que no exame citobacteriológico à urina apenas serão detetadas as bactérias no estado planctónico. Assim, apesar de no exame realizado o número de bactérias detetadas estar abaixo do limite considerado ( $10^3$  cfu/ml urina), a infeção pode já se encontrar num estado avançado devido à elevada quantidade de microrganismos presentes nos biofilmes [15].

### 2.3.3. Biofilmes cristalinos

A urina humana pode ter até 500 mM de ureia, e alguns uropatogênicos produtores de urease conseguem utiliza-la como fonte de azoto [79]. A hidrólise da ureia liberta amônia e iões carbonato, o que alcaliza o ambiente, provocando a precipitação de iões polivalentes que ficam aprisionados na matriz do biofilme, formando biofilmes cristalinos [80]. Os principais depósitos cristalinos que se formam são de estruvita e de uma forma de apatita. Estes biofilmes podem encontrar-se na superfície exterior do cateter, causando traumas à bexiga e uretra. Durante a retirada do cateter, fragmentos do biofilme podem permanecer na bexiga levando à formação de pedras. No caso dos biofilmes no lúmen do cateter, o seu crescimento pode bloquear completamente o fluxo de urina, como no exemplo da Figura 6, causando refluxo de urina contaminada, o que pode resultar em choque séptico [81]. Cerca de metade das algiações de longa duração sofrem incrustações devido à formação de biofilmes cristalinos [82].

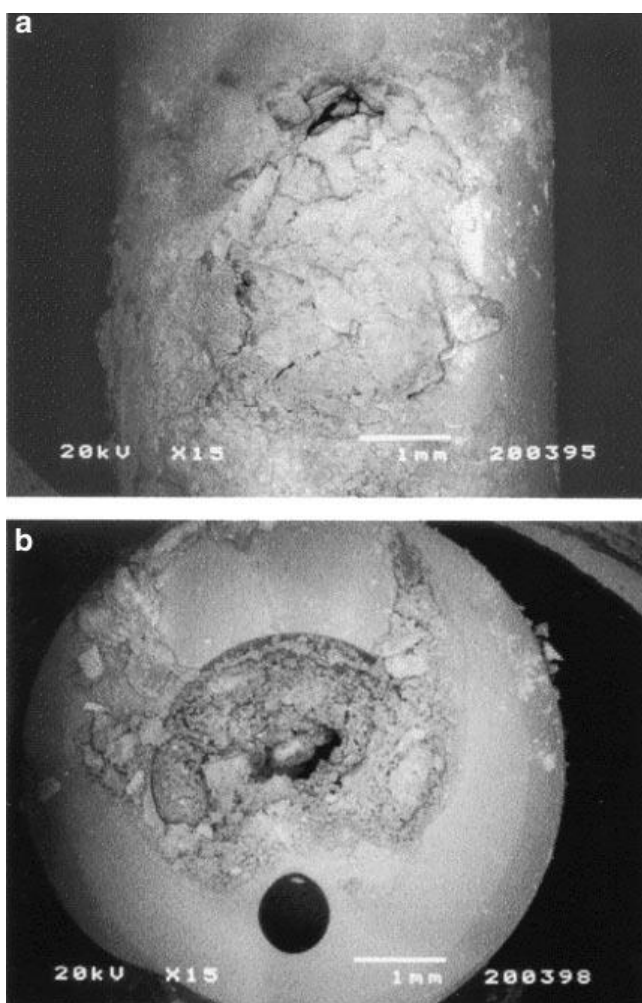


Figura 6 - Imagens de SEM que mostram a extensão da encrustação no olho de drenagem (a) e no lúmen do cateter (b). O cateter ficou bloqueado após 30 horas no modelo de bexiga infetada com *P. mirabilis*. [83]

Vários organismos produzem ureases, como *K. pneumoniae*, *M. morganii*, espécies de *Proteus* e de *Providencia* [81], no entanto a espécie mais frequentemente isolada dos biofilmes cristalinos é a *P. mirabilis*, cuja urease é capaz de hidrolisar ureia algumas vezes mais rapidamente que as de outras espécies [84]. Esta potente urease, juntamente com a sua frequente presença em biofilmes cristalinos, indicam que poderá ser a principal responsável pela formação destes biofilmes. A *P. mirabilis* não é, normalmente, um colonizador primário, estando praticamente ausente em pacientes com algalias de curta duração [85], no entanto encontra-se em cerca de 40% dos isolados obtidos de pacientes com algalias de longa duração [86]. Esta bactéria faz parte da flora intestinal normal dos humanos, e ao contrário do que acontece com a *E. coli*, na qual as estirpes causadoras de CAUTI apresentam diversos fatores ausentes nas estirpes comensais de *E. coli*, análises genéticas revelam que as estirpes comensais e as estirpes presentes nos biofilmes cristalinos isolados do mesmo paciente são iguais [87]. Este facto revela que a maioria dos pacientes sujeitos a algaliação de longa duração e que sofrem de incrustações no cateter provavelmente adquiriram infeções com *P. mirabilis* proveniente da sua própria flora intestinal.

Apesar dos cateteres de silicone apresentarem superfícies mais lisas que os de látex, ainda apresentam irregularidades, principalmente em torno dos orifícios, o que facilita a adesão das bactérias [88], não havendo neste momento nenhuma técnica eficaz para impedir a formação de biofilmes cristalinos [89]. O tempo que os cateteres demoram a bloquear varia imenso, podendo variar de 2 a 98 dias [90]. Isto pode ser explicado pelo conceito de pH de nucleação da urina (pH<sub>n</sub>), que corresponde ao pH ao qual a urina turva devido à saída de solução de microcristais de apatita e estruvita, tornando-se a urina turva com a subida do pH. A incrustação do cateter ocorre quando o pH da urina é superior ao pH<sub>n</sub> [91]. Este é o principal fator para prever a taxa de incrustação em pacientes algaliados e infetados com *P. mirabilis*, sendo esta mais lenta quanto maior for o pH<sub>n</sub> [92]. Uma estratégia para diminuir a taxa de incrustação dos cateteres consiste em diminuir o pH graças a uma alta ingestão de líquidos em pacientes algaliados, o que causa a diluição da urina, e a ingestão de, por exemplo, bebidas à base de limão o que aumenta a concentração de citrato na urina, que devido às suas propriedades quelantes mantêm iões polivalentes em solução [93, 94].

Outras espécies, como por exemplo a *P. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* que produzem uma enorme quantidade de expolissacarídeos, formam biofilmes mucosos, que são

capazes de impedir o fluxo de urina por bloqueamento dos cateteres, não sendo no entanto tao eficazes como os cristalinos neste bloqueamento [95].

Como já referido anteriormente, cerca de 95% das algaliações de longa duração resultam em CAUTI poli-microbianas, sendo os biofilmes compostos por espécies patogéneas e espécies não-patogéneas. Para estudar os biofilmes que se formam nos cateteres em pacientes com CAUTI são necessários métodos que além de identificar as espécies presentes, consigam também discriminá-las e que permitam a visualização das células de forma a permitir o estudo da organização das diferentes espécies no biofilme.

#### **2.4. Hibridação Fluorescente *in Situ***

Descrita pela primeira em 1969, a hibridação *in situ* (*in situ hybridization* – ISH) assentava, inicialmente, na utilização de RNA marcado radioativamente como sondas que hibridavam com a sequência de DNA alvo [96, 97]. Marcadas com os radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  e  $^{35}\text{S}$  [98], a marcação destas sondas apresentava diversos problemas, como a sua instabilidade, devido ao decaimento dos isótopos, fazendo com que a atividade das sondas não fosse constante. A baixa resolução da radiografia que obrigava a longos tempos de exposição de forma a se obterem sinais mensuráveis e a necessidade de medidas de precaução uma vez que se trabalhava com material radioativo [99]. De forma a colmatar estas desvantagens, foi realizado em 1980 o primeiro ensaio de ISH com sondas de RNA marcadas com um fluoróforo no terminal 3', designando-se por isso esta técnica hibridação fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* – FISH) [100]. Esta técnica apresenta diversas vantagens, pois é mais rápida, apresenta uma melhor resolução, as sondas utilizadas são bastante estáveis, podendo ser armazenadas por longos períodos de tempo, é mais segura, uma vez que não se trabalha com material radiativo e permite a deteção simultânea de vários alvos, usando-se para isso fluoróforos de cores diferentes [101]. A fluorescência emitida pelos fluoróforos é detetada utilizando microscópios de epifluorescência ou através de citometria de fluxo, podendo as sondas ser detetadas direta ou indiretamente [102]. Na deteção indireta, nucleótidos modificados são adicionados à sonda e identificados utilizando moléculas secundárias marcadas com fluorescência. Os nucleótidos mais usados encontram-se ligados a digoxigenina ou a biotina. Para serem detetados são utilizados anticorpos marcados com fluoróforos, que se ligam a estas moléculas. Nos nucleótidos marcados ligados a biotina, além dos anticorpos podem também ser usadas avidina ou estreptavidina fluorescentes [103]. Na deteção direta, um fluoróforo é ligado covalentemente à sonda. Para isso tanto a sonda como o fluoróforo

devem tolerar as condições de hibridação e de lavagem, sendo possível observar ao microscópio, logo após hibridação, a sonda hibridada [100] . Ao contrário de outros métodos de detecção, que utilizam por exemplo reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), o FISH combina a precisão de métodos moleculares com a informação visual do microscópio, permitindo a identificação de células no seu micro-habitat natural, ou mesmo em tecidos doentes, permitindo a análise do DNA no interior das células sem alterar a sua morfologia ou a integridade dos seus compartimentos [104].

Um protocolo de FISH apresenta, geralmente, 4 etapas (Figura 7): fixação e permeabilização da amostra, hibridação, lavagem e visualização dos resultados. Na primeira etapa o que se pretende é manter a integridade e forma das células e ao mesmo tempo permeabilizá-las de forma a permitir a difusão das sondas até ao seu alvo [105]. Apesar do formaldeído e do metanol serem os principais fixantes utilizados, não existe um protocolo universal de permeabilização devido às diferentes composições da parede celular [106]. Uma vez que a viabilidade celular se encontra associada à integridade membranar, após esta etapa, as células não se encontram viáveis. Durante a hibridação, as sondas de RNA ou DNA formam uma molécula de dupla cadeia com a sequência alvo graças ao emparelhamento de bases Watson-Crick devido à ação do calor, sendo removido o excesso de sonda ou sonda fracamente ligada no passo de lavagem [107].

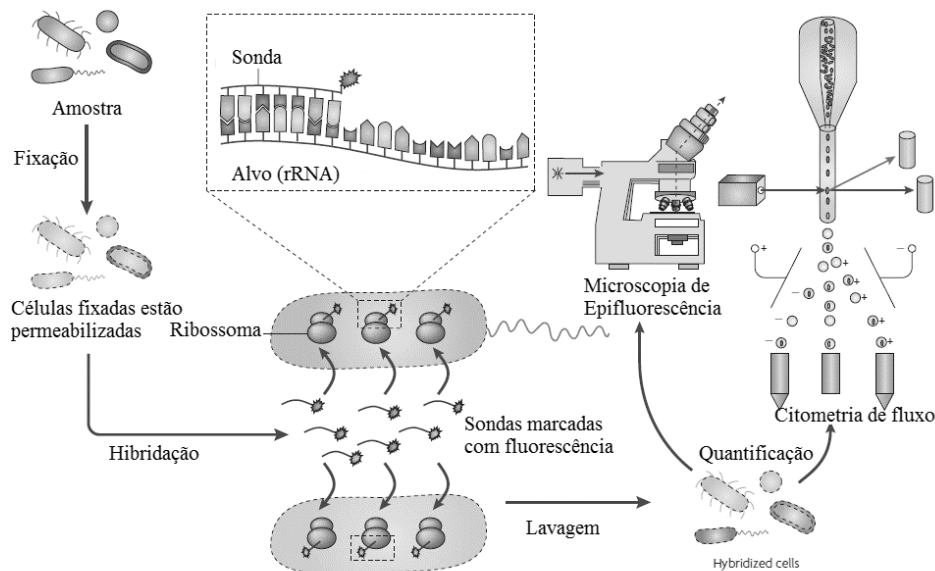


Figura 7 – Descrição geral do protocolo de FISH. [105]

A especificidade das sondas depende não só da complementaridade entre a sonda e a sequência alvo mas também da estringência nas etapas de hibridação e de lavagem. A estringência é uma medida arbitrária de especificidade e varia conforme a concentração de sal e formamida e pela temperatura usada. Aumentando a temperatura e a concentração de formamida, a estringência aumenta, enquanto o oposto se verifica para a concentração de sal [108]. Utilizando uma estringência baixa a sonda pode-se ligar não especificamente, no entanto ao usar uma estringência demasiado alta pode perder-se o sinal [102]. Durante a hibridação podem formar-se quatro tipos de ligação: sonda:sonda, alvo:alvo, híbridos estáveis, ou seja específicos e híbridos não estáveis, nomeadamente não específicos. Ao contrário dos três primeiros tipos, os híbridos não específicos são menos estáveis, e como tal a ligação pode ser quebrada usando um passo de lavagem com uma estringência mais elevada. As ligações alvo:alvo não são detetadas por não estarem marcadas mas diminuem os locais aos quais as sondas se podem ligar e as ligações sonda:sonda como não se encontram ligadas à superfície onde se realiza a hibridação, são removidas durante a lavagem [107]. Na maioria dos protocolos de FISH, é comum realizar-se a hibridação com uma estringência baixa, de forma a facilitar a formação de ligações, sejam elas específicas ou não, e usar uma estringência crescente em diferentes passos de lavagem, de forma a se obter no final apenas as ligações específicas [108].

A maioria dos ensaios de FISH apresentam como alvo sequências de rRNA 16S ou 23S. Estas moléculas são o alvo preferencial pois são elementos funcionais e estruturais chave no funcionamento celular [6]. Cada ribossoma contém uma molécula de rRNA 16S e uma de rRNA 23S com cerca de 1600 e 3000 nucleótidos, respetivamente e cada célula procariótica apresenta desde alguns milhares até às centenas de milhar de ribossomas. Isto permite a hibridação de um grande número de sondas em cada célula, potenciando o sinal [105]. Além disso, estas moléculas encontram-se altamente conservadas entre espécies relacionadas, podendo-se identificar uma única espécie microbiana ou um grupo filogenético maior, dependendo do grau de conservação da região alvo da sonda [109].

As sondas, tipicamente de DNA, são sintetizadas normalmente com 15-30 pares de base. No desenho de uma sonda, além da sequência, é necessário ter em atenção a sua energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), que descreve a estabilidade do híbrido DNA-RNA formado e se correlaciona com o brilho da sonda hibridada. Assim este parâmetro é utilizado como um indicador da eficiência da hibridação e quanto mais negativo o seu valor, maior a concentração do híbrido, e como tal maior o sinal obtido. Durante o desenho da sonda, a  $\Delta G^\circ$  deverá ser maior que -13 Kcal/mol de forma a maximizar a possibilidade de se obter

uma sensibilidade satisfatória [110, 111]. Mesmo utilizando sondas corretamente desenhadas, por vezes não ocorre hibridação, ou a fluorescência resultante é muito baixa. Normalmente esta situação deve-se a uma permeabilização deficiente das células, inacessibilidade da sonda devido à estrutura do RNA ou a um baixo conteúdo ribossomal [105]. Quando o problema se encontra na permeabilização, torna-se necessária uma otimização empírica deste passo. A estrutura tridimensional do ribossoma não é relevante para a acessibilidade da sonda uma vez que os ensaios de FISH são realizados em condições altamente desnaturantes, no entanto a estrutura secundária influencia a eficiência da hibridação. Apesar de algumas regiões do rRNA se encontrarem bastante acessíveis, noutras regiões a hibridação apresenta uma baixa eficiência. Normalmente estas regiões de baixa eficiência são aquelas que apresentam variabilidade entre espécies e são por isso importantes para o desenho de sondas específicas para uma espécie [112]. Uma maneira de tornar estas regiões mais acessíveis às sondas utilizadas é a utilização de oligonucleotídeos não marcados, designados de *helpers*. Estes *helpers* são mais eficazes quando se ligam a regiões adjacentes à sequência alvo, podendo aumentar a fluorescência 4 vezes ou em alguns casos até 25 vezes [112].

O conteúdo ribossomal de uma célula é bastante variável. Durante a fase exponencial, a *E. coli* apresenta em média 72000 ribossomas, no entanto quando o tempo de duplicação aumenta de 24 para 100 minutos, o número de ribossomas cai para cerca de 6800 [113]. Além disso, em bactérias tipicamente encontradas no solo, água, etc., existe uma restrição do espaço devido ao seu pequeno tamanho, existindo apenas algumas centenas de ribossomas nestas células [114]. Foram criadas algumas variações do FISH tradicional de forma a conseguir aumentar o sinal, mesmo em células com baixo conteúdo ribossomal. Uma das variações que está a ser cada vez mais usada é a deposição reportada por catálise (*catalysed reported deposition* – CARD-FISH). Nesta técnica, que se encontra esquematizada na Figura 8, a sonda encontra-se covalentemente ligada à peroxidase de rábano-silvestre (*horseradish peroxidase* – HRP). Após hibridação, são fornecidas tiramidas marcadas fluorescentemente, que são ativadas pela HRP, ligando-se permanentemente à célula, o que aumenta a fluorescência detetada, o que faz com que esta técnica tenha um método de deteção indireto. A amplificação do sinal relativamente a uma sonda marcada com um fluoróforo é baseada na radicalização de múltiplas tiramidas por uma única HRP. No entanto esta técnica ainda apresenta uma eficiência de deteção de células menor que o FISH, sendo necessária uma otimização do passo de



fixação, uma vez que a HRP é cerca de 60 vezes maior que os fluoróforos tipicamente usados [115].

Todavia, a razão do baixo sinal de muitas das sondas de DNA prende-se com a baixa afinidade entre as sondas e o alvo, devido a  $\Delta G^\circ$  acima do aconselhado [110]. Uma das soluções consiste na elongação da sonda, o que permite aumentar a sua afinidade e consequentemente o sinal obtido, no entanto existem dúvidas da capacidade das sondas em distinguir diferenças num único nucleótido entre a sonda e o alvo, o que afeta a especificidade destas sondas [116].

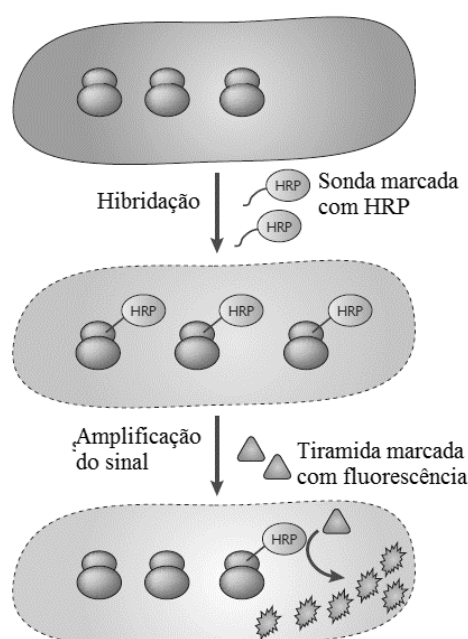


Figura 8 – Esquema simplificado das etapas de hibridação e detecção de CARD-FISH [105].

#### 2.4.1. Análogos de Ácidos Nucleicos

De forma a ultrapassar as limitações dos ácidos nucleicos naturais, têm sido desenhados análogo dos ácidos nucleicos, que podem ser classificados em três tipos: análogos com bases não naturais, análogos com açúcares modificados e análogos com alterações no esqueleto fosfodiéster. O fosforotioato (*phosphorothioate* – PS) é um dos análogos mais utilizados atualmente, onde um dos oxigénios não envolvido na ligação fosfodiéster é substituído por um enxofre. Esta alteração destabiliza o emparelhamento entre bases, mas torna as sondas resistente a ação de nucleases. Apesar da sua toxicidade,

estes análogos são bastante usados em estudos *antisense* (AS) [117]. Um dos primeiros análogos desenvolvidos foi o ácido nucleico peptídico (*peptide nucleic acid* – PNA). Este consiste num esqueleto peptídico formado por unidades de N-2(aminoetil)-glicina, apresentando as suas nucleobases a mesma configuração e distâncias intermoleculares que aquelas do DNA, permitindo ao PNA hibridar com o DNA seguindo as regras de emparelhamento de bases de Watson-Crick [118]. Como este análogo não apresenta carga, não existem repulsões electrostáticas com o DNA ou RNA, resultando em maior estabilidade térmica, em maior afinidade de sondas de PNA, causando hibridações mais fortes, independentemente da concentração salina e em hibridações mais específicas. Por outro lado, o facto de ter carga neutra faz com que o PNA seja pouco solúvel em água [119-121].

#### 2.4.1.1. Ácidos nucleicos bloqueados (*locked nucleic acid* – LNA)

Os ácidos nucleicos bloqueados (*locked nucleic acid* – LNA) são análogos derivados do RNA, nos quais uma ponte de metileno liga o oxigénio 2' ao carbono 4' do anel da ribose (Figura 9). Uma vez que as bases do LNA estão ligadas pelo mesmo esqueleto de fosfato que pode ser encontrado no DNA e no RNA, pode ser sintetizado usando o método da fosforamidita, comumente usado para sintetizar oligonucleotídeos, possibilitando a incorporação de nucleótidos de LNA numa cadeia de DNA ou RNA [122]. A ponte de metileno do LNA bloqueia-o numa conformação tipo N, o que reduz a flexibilidade conformacional da ribose e aumenta a organização local do esqueleto de fosfato, o que fortalece as interações das bases empacotadas, conferindo ao LNA uma alta afinidade para a sequência complementar [123]. De facto, a incorporação de um nucleótido de LNA numa cadeia de DNA é capaz de aumentar a temperatura de *melting* de 2 a 9°C, dependendo de vários fatores, como a base do nucleótido, uma vez que as purinas causam um maior aumento, do tamanho da cadeia, pois quanto maior a cadeia, menos se faz sentir o efeito da modificação de um nucleótido, entre outros. No entanto este aumento não é aditivo, uma vez que se verifica uma estabilização quando aproximadamente 50% da cadeia se encontra substituída por nucleótidos de LNA [122]. Os nucleótidos de DNA vizinhos do nucleótido de LNA sofrem uma alteração na conformação dos seus açúcares, uma vez que apresentam cerca de metade das populações na conformação tipo N, ao invés de uma população maioritariamente tipo S, típica numa cadeia de DNA, contribuindo para o aumento da afinidade [123]. No entanto, esta alteração da conformação nos nucleótidos vizinhos não se verifica no caso dos açúcares terminais [116].

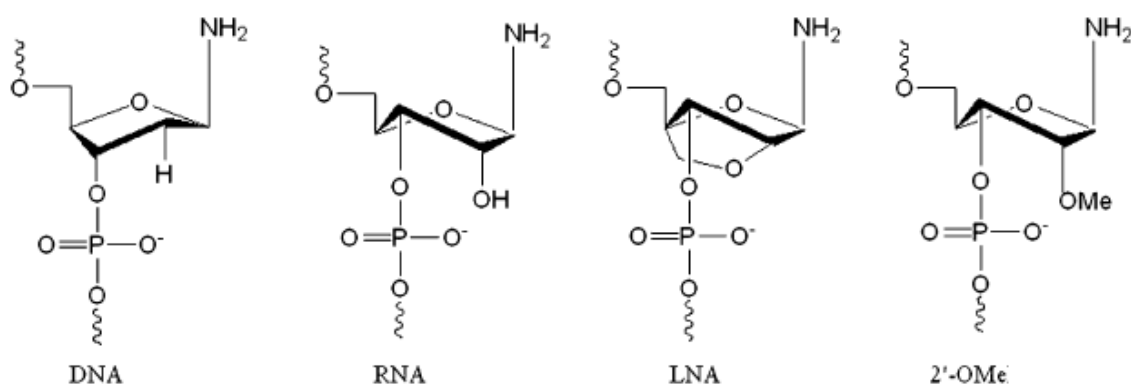


Figura 9 - Estruturas do DNA, RNA, LNA e 2'OMe [8]

Os oligonucleotídeos de LNA:DNA são menos suscetíveis à ação de endonucleases do que o DNA, bastando apenas um nucleótido de LNA na penúltima posição do terminal 3' para se obter uma resistência total à ação exonucleotídica 3'→5' das DNA polimerases Vent, Pfu e T7 e à exonuclease III [124], enquanto cadeias completamente modificadas por LNA são altamente resistentes às endonucleases do soro do sangue e à fosfodiesterase do veneno de cobra [125].

Como o LNA apresenta o esqueleto de fosfato carregado, permite a utilização de métodos convencionais de transfeção usados em oligonucleotídeos como o FuGENE 6 ou PolyFect [117]. A baixa toxicidade do LNA também é uma outra das suas vantagens. Estudos com roedores demonstraram uma alta tolerância a um tratamento contínuo com oligonucleotídeos de LNA, ocorrendo sinais de baixa toxicidade em doses acima da ótima. Esta característica atribui-se à alta afinidade e especificidade do LNA, o que permite utilizar oligonucleotídeos menores, provocando uma menor interação com as proteínas do soro do sangue [126, 127], existindo também indícios que o LNA poderá ser um mau imunoestimulador [117]. Quando comparado com o DNA, as purinas de LNA melhoram a capacidade de discriminar diferenças numa base entre duas cadeias (*mismatch*), enquanto que para as pirimidinas não existe uma diferença significativa entre a capacidade discriminatória das duas moléculas [128]. Na tabela , encontram-se indicadas as principais diferenças entre o LNA e o análogo mais utilizado, atualmente, em protocolos de FISH, o PNA.

Tabela 3 - Principais diferenças entre o LNA e o PNA [117, 121, 122, 129].

PNA	LNA
Sem carga	Apresenta carga
Síntese baseada em protocolos padrão de síntese péptidos (mais caro)	Síntese pelo método da fosforamidita (mais barato)
Sondas constituídas unicamente por PNA	Permite a criação de sondas contendo simultaneamente nucleótidos de DNA, RNA, LNA, 2'OMe e outros análogos,
Pouco solúvel em água	Bastante solúvel em água
Reconhecem duplex de DNA, sendo capaz de formar triplex	Emparelha com DNA e RNA em cadeia simples

Diversos análogos estruturais do LNA foram sintetizados, mantendo-se em todos a ponte de metileno que liga o oxigênio 2' ao carbono 4', formando a família do LNA (Figura 10). Apesar da maioria dos membros apresentarem uma grande afinidade para o RNA, nenhum apresenta uma maior afinidade que o  $\beta$ -D-LNA, o primeiro LNA sintetizado (correspondente ao LNA referido ao longo de todo o trabalho).

As diferenças estruturais dos diferentes membros traduzem-se em diferenças, por exemplo, no seu perfil farmacocinético, permitindo a síntese de oligonucleotídeos de LNA com os perfis desejados [117].

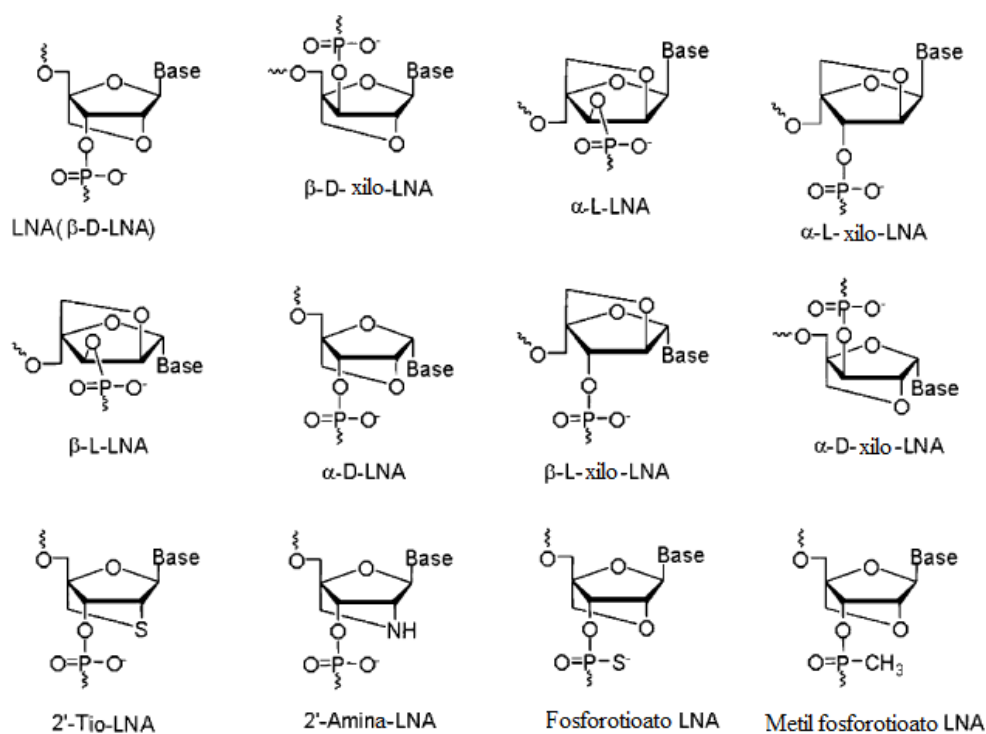


Figura 10 – LNA representado por  $\beta$ -D-LNA e a sua família molecular [117].

Devido às suas propriedades, o LNA tem sido usado em FISH, substituindo-se normalmente alguns nucleótidos da sonda por LNA de forma a aumentar a afinidade para o alvo e reduzir o tamanho da sonda [7]. O aumento da eficiência de sondas de LNA deve-se à sua alta afinidade para o RNA, o que possibilita a utilização sondas mais pequenas, o que melhora a permeabilidade celular e aumenta a acessibilidade ao alvo [130]. Estudos comparando sondas com diferentes substituições de LNA indicam que ocorre um aumento do sinal conforme o número de substituições aumente, sendo este o principal fator para o aumento da eficiência da hibridação. No entanto, um número elevado de substituições resulta numa hibridação não específica devido a uma afinidade muito elevada [131, 132]. Assim são recomendadas algumas especificações para a criação de sondas de LNA eficientes, como a introdução de nucleotídeos de LNA nos locais onde a especificidade e discriminação são necessários, evitar utilizar mais de quatro nucleotídeos de LNA seguidos, exceto em sondas bastante pequenas, uma vez que a hibridação torna-se muito forte e pode ser não específica e evitar regiões de auto-complementaridade entre nucleótidos de LNA e de complementaridade com outros oligonucleotídeos contendo LNA que sejam utilizados simultaneamente [129]. Oligonucleotídeos com LNA foram usados com sucesso em ensaios FISH para, por exemplo, detetar os endossimbiontes *Portiera* e *Arsenophonus* do inseto *Bemisia tabaci* [133], para monitorizar a expressão de três RNAs não codificantes (6S, CsrB e TPP-2) em *Vibrio campbellii* durante as diferentes fases de crescimento [134], para avaliar o aumento de RNA viral em células infetadas com o vírus Sindbis [135], para revelar um diferente padrão de expressão no hipotálamo do micro RNA miR-7<sup>a</sup> [136] e para detetar o padrão temporal e espacial de expressão de 115 micro RNAs conservados de vertebrados em embriões de peixe zebra [137].

#### **2.4.1.2. RNA 2'-O-metil (2'OMe)**

Um outro grupo de oligonucleotídeos promissor é o grupo dos oligoribonucleotídeos 2'-O-alquil. Um dos membros deste grupo é o RNA 2'-O-metil (2'OMe), no qual se encontra ligado um grupo metilo ao oxigénio 2', o que faz a ribose adotar uma conformação tipo N, tal como o LNA [138] (Figura 9). Uma vez que o esqueleto de fosfato do 2'OMe se mantém inalterado, este pode ser sintetizado utilizando os métodos convencionais de síntese de oligonucleotídeos, permitindo a síntese de oligonucleotídeos de DNA:2'OMe e de LNA:2'OMe. Este análogo apresenta uma alta afinidade para o RNA, aumentando a

temperatura de *melting* de híbridos 2'OMe-RNA face a híbridos de DNA-RNA, ocorrendo uma diminuição da temperatura de *melting* em híbridos com DNA [139], revelando que o 2'OMe forma híbridos mais estáveis com o RNA do que com o DNA. Assim o tamanho do oligonucleotídeo de 2'OMe pode ser ajustada de forma a este hibridar com um RNA alvo mas não com o DNA correspondente [138]. Devido à sua alta afinidade, os oligonucleotídeos 2'OMe podem ser desenhados com um tamanho menor e podem hibridar eficazmente em regiões de dupla cadeia do RNA [138]. Este análogo também apresenta uma grande estabilidade *in vivo*, resistência a nucleases e é biocompatível [8]. Apesar do 2'OMe ter sido bastante usado em AS, começam a surgir ensaios em que é utilizado em sondas de FISH, principalmente em conjugação com LNA [140, 141].

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas as espécies *Escherichia coli* CECT 434 (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Espanha), e *Achromobacter xylosoxidans* B3, gentilmente cedida por Steinbüchel A. (Bayer AG, Alemanha).

#### 3.2. Meios de Cultura

Ao longo deste trabalho foram utilizados diversos meios de cultura. O meio de TSB (*tryptic soy broth*) (17 g/l caseína (digestão pancreática), 3 g/l peptona de soja (digestão papaica), 5g/l cloreto de sódio, 2,5 g/l fosfato dipotássico e 2,5 g/l glucose) foi preparado dissolvendo 30 g de TSB (Oxoid, Espanha) em 1L de água ultra pura. Para preparar o meio de TSA (*tryptic soy agar*) (17 g/l caseína (digestão pancreática), 3 g/l peptona de soja (digestão papaica), 5g/l cloreto de sódio, 2,5 g/l fosfato dipotássico, 2,5 g/l dextrose e 15 g/l de agar) 30 g de TSB (Oxoid, Espanha) e 15 g de agar (Merck, Portugal) foram dissolvidos em 1L de água ultra pura.

Durante a formação de biofilmes as células foram incubadas em meio de urina artificial (*artificial urine medium* – AUM). Para preparar este meio, foi seguida a formulação indicada na Tabela 4 em 1L de água ultra pura. Depois de dissolvidos todos os compostos, o pH foi ajustado a 6,5 utilizando ácido sulfúrico. Uma vez que o AUM forma precipitado ao ser autoclavado, este foi filtrado com um acrodisco de 0,2 µm de tamanho de poro (GE Healthcare Europe GMBH, Portugal) para um recipiente autoclavado.

De forma a ser possível quantificar as células cultiváveis nos biofilmes mistos, foram preparados meios seletivos para cada uma das espécies. O meio de agar de Mac Conkey (20 g/l peptona, 10 g/l lactose, 1,5 g/l sais biliares nº3, 5 g/l cloreto de sódio, 0,03 g/l vermelho neutro, 0,001 cristal violeta, 15 g/l agar) foi preparado dissolvendo 51,5 g de de agar Mac Conkey (Liofilchem, Itália) em 1L de água ultra pura, enquanto o meio de agar de cetrimida (20 g/l de peptona de gelatina, 1,4 g/l de cloreto de magnésio, 10 g/l sulfato de potássio, 0,3 g/l cetrimida e 13,6 g/l agar) foi preparado dissolvendo 44,5 g de agar de cetrimida (Merck, Portugal) em 1L de água ultra pura.

Tabela 4 - Composição do meio de urina artificial (1L)

<b>Reagentes</b>	<b>Quantidade</b>
Peptona (Liofilchem, Itália)	1 g
Extrato de Levedura (Liofilchem, Itália)	0.05 g
Ácido láctico (Fluka, Portugal)	1.1 mM
Ácido cítrico (Scharlab S.L., Espanha)	0.4 g
Bicarbonato de sódio (Merck, Portugal)	2.1 g
Ureia (VWR, Portugal)	10 g
Ácido úrico (VWR Portugal)	0.07 g
Creatinina (VWR Portugal)	0.8 g
Cloreto de cálcio.2H <sub>2</sub> O (Merck, Portugal)	0.37 g
Cloreto de sódio (Merck, Portugal)	5.2 g
Sulfato de ferro II.7H <sub>2</sub> O (VWR, Portugal)	0.0012g
Sulfato de magnésio.7H <sub>2</sub> O (Merck, Portugal)	0.49 g
Sulfato de sódio (Merck, Portugal)	1.42 g
Fosfato monopotássico (VWR, Portugal)	0.95 g
Fosfato dipotássico (Merck, Portugal)	1.2 g
Cloreto de amónio (Merck, Portugal)	1.3 g

### 3.3. Formação e estudo de biofilmes simples e mistos

De forma a estudar a interação entre as duas espécies em estudo, foram formados biofilmes simples num modelo de cateteres urinários utilizando cupões de 2x2cm de dois materiais usados em cateteres, silicone e PEO. Os cupões de silicone foram lavados numa solução de 5% (v/v) de detergente comercial (Fipadel – Químicos e Detergentes, Lda, Portugal) e água ultra pura pré-aquecida por 30 minutos. Seguiram-se lavagens em água ultra pura de forma a remover os resíduos de detergente e foram deixados a secar ao ar. Foram depois imersos em etanol 90% (v/v) por 30 minutos seguindo-se uma lavagem com água ultra pura e outra secagem ao ar. Por fim foram autoclavados a 70°C por 20 minutos. No caso dos cupões de PEO, estes foram diretamente esterilizados usando radiação ultra-violeta por 3 horas. Depois de estéreis, os cupões foram transferidos para microplacas de 6 poços.

Para formar os diferentes inóculos culturas puras de cada bactéria foram cultivadas em TSA *overnight* seguido de um crescimento em AUM por 16-18 horas a 37°C com 150 rpm.. Após crescimento, as suspensões foram diluídas de forma a se obter uma D.O. equivalente a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/ml. 6ml de cada suspensão foram adicionados a diferentes microplacas contendo os cupões e incubadas a 37°C sem



agitação. A cada 48 horas, o meio de cada poço foi removido, os cupões lavados 3x com 6 ml de solução salina 0.85% (m/v) e adicionados 6 ml de AUM fresco. Às 2, 4, 24, 48, 96 e 192h foi retirado um cupão de cada biofilme, transferido para uma nova microplaca, lavado 3x com 10 ml de solução salina 0.85% (m/v) e sonicado em 9 ml de água ultrapura por 10 segundos com uma amplitude de 25%. Da suspensão celular obtida foram feitas contagens de CFUs de forma a avaliar a cultivabilidade celular. No caso dos biofilmes simples, as colónias foram contadas em placas em TSA após incubação a 37°C *overnight* para *E. coli* e após 48 horas para *A. xylosoxidans*.

De forma a ser possível discriminar entre as CFUs de cada espécie, nos biofilmes mistos foi necessário utilizar meios seletivos. Assim, as CFUs de *E. coli* foram quantificadas em placas de agar de Mac Conkey, após incubação a 37°C *overnight*, e as CFUs de *A. xylosoxidans* em placas de agar de Cetrimida após incubação a 37°C por 48 horas.

De forma a quantificar as células presentes nos biofilmes, da suspensão de celular obtida após sonicação dos cupões, foram recolhidas amostras que foram fixas e hibridadas seguindo o protocolo de FISH em suspensão. De forma a verificar se todas as células foram marcadas durante o protocolo de FISH, as células foram também marcadas com um marcador universal, o iodeto de propídio (*propidium iodide* - PI). As diferentes amostras foram quantificadas por citometria de fluxo (Beckman Coulter Epics XL, EUA, equipado com um laser de 488 nm).

De forma a avaliar a distribuição espacial das células e a estrutura dos biofilmes, às 192 horas um biofilme de cada condição foi fixo diretamente no cupão e visualizado recorrendo à microscopia confocal (FluoView FV 1000, Olympus, Portugal). Para isso foi transferido para uma nova microplaca de 6 poços, lavado 3x com 10 ml de solução salina 0.85% (m/v) e seco a 60°C por 15 minutos. Foi depois fixo com 3 ml metanol 100% (v/v) por 10 minutos, seguindo-se o protocolo de FISH em lâmina, usando-se volumes suficientes de cada solução para cobrir a superfície e 100 µl de solução de hibridação.

### **3.4. Hibridação fluorescente *in situ* - FISH**

#### **3.4.1. Sondas de LNA e 2'OMe**

De forma a discriminar e estudar a distribuição espacial das diferentes espécies em biofilmes, foi utilizado a técnica de FISH. Neste trabalho foram utilizadas as sondas (RiboTask ApS, Dinamarca) apresentadas na Tabela 5. Os nucleótidos de LNA encontram-se assinalados como IA, IC, IG e IT, enquanto os de 2'OMe encontram-se

como mA, mC, mG e mU. Os fluorocromos usados foram a fluoresceína (FAM) e a cianina 3 (CY3). As temperaturas de *melting* teóricas foram calculadas para cada sonda utilizando uma ferramenta *online* [142].

Tabela 5 – Sondas de LNA/2'OMe utilizadas.

Bactéria	Nome da sonda	Sequência (5'-3')	T <i>melting</i> teórica (°C)
<i>E. coli</i>	NAC6112	5' FAM - lGmCmClTmCmAlGmCmClTmUmGlA - 3'	66,5
	NAC6120	5' FAM - lCmAmClGmCmClTmCmAlGmCmClTmUmGlA - 3'	81,2
<i>A. xylooxidans</i>	NAC6113	5' CY3 - lAmAmAlTmGmClAmGmUITmCmClA - 3'	49,7
	NAC6122	5' CY3 - lAmAmAlTmGmClAmGmUITmCmClAmAmAlG - 3'	55,3

Para estudar as duas espécies no biofilme é necessário que as sondas funcionem nas mesmas condições. De forma a aumentar a possibilidade de determinar as condições em que sondas funcionam foram testadas duas sondas de diferentes tamanhos, 13 e 16 nucleótidos, para cada espécie, mantendo o desenho das sondas e o alvo.

### 3.4.2. Otimização do protocolo de FISH

Uma vez que o objetivo foi utilizar estas sondas para discriminar as duas espécies em biofilmes mistos, foi necessário selecionar uma temperatura para a qual se obtivesse um sinal positivo para ambas. Para isso a otimização foi inicialmente realizada em lâminas de vidro (VWR, Portugal) com 3 poços cada, nos quais todos os passos do protocolo de FISH foram realizados nas células aderidas nessas lâminas seguindo-se a otimização em suspensão, onde todos os passos do protocolo de FISH foram realizados em células em suspensão. A realização de otimização em lâmina em primeiro lugar prende-se ao facto de o volume de sonda utilizada em cada ensaio ser inferior quando comparado com o volume utilizado em suspensão e uma vez que o volume de sonda disponível é limitado, optou-se então pela otimização em lâmina.

#### 3.4.2.1. Otimização em lâmina

Para realizar estes ensaios de otimização, culturas de puras de *E. coli* e *A. xylooxidans* foram cultivadas em TSA e mantidas a 37°C *overnight*. Foram preparadas suspensões de cada espécie com uma D.O. equivalente a uma concentração de  $1 \times 10^8$  células/ml, e transferidos 20 µL para cada poço de uma lâmina de vidro de 3 poços que foram secas à chama. De seguida as células foram fixas com uma solução de paraformaldeído 4% (m/v)

(Sigma, Portugal) por 15 minutos e depois com etanol 50% (v/v) por mais 15 minutos e deixadas a secar ao ar. Para o passo de hibridação, foram adicionados 20 µL de solução de hibridação (50 mM Tris-HCl (Sigma, Portugal), 900 mM NaCl (Merck, Portugal), 500 mM Ureia (VWR, Portugal) e 200 nM de cada sonda) em cada poço e estes cobertos por uma lamela. As lâminas foram colocadas na estufa por 90 minutos, mantendo-se um ambiente húmido. Após hibridação, as células foram lavadas em solução de lavagem (5 mM Tris Base (Sigma, Portugal), 15 mM Cloreto de Sódio, 1 % (v/v) Triton-X (Sigma, Portugal)) por 30 minutos à mesma temperatura à qual se fez a hibridação. Depois de secas foram obtidas imagens de cada poço num microscópio de epifluorescência (DMLB2, Leica, Alemanha), utilizando filtros capazes de detetar as duas sondas (3N2.1 para a sonda 6122 e I3 para a sonda 6120). A intensidade da fluorescência foi quantificada através do *software* Image J (v1.47, Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, EUA). As imagens de biofilmes mistos foram obtidas sobrepondo as imagens obtidas nos dois filtros.

#### **3.4.2.2. Otimização em Suspensão**

Após a otimização em lâmina, foi feita a otimização em suspensão, uma vez que o protocolo de FISH nas amostras de biofilmes foi realizado em suspensão. Neste protocolo foram usadas as condições ideais determinadas durante a otimização em lâmina de forma a comprovar se os resultados se mantinham ao usar células em suspensão. Para isso, culturas de puras de *E. coli* e *A. xylosoxidans* foram cultivadas em TSA e incubadas *overnight* a 37°C. Foram preparadas suspensões de cada espécie com uma D.O. equivalente a  $1 \times 10^8$  células/ml, e transferido 1 ml para um eppendorff. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 10000G. Depois de remover o sobrenadante as células foram fixas, ressuspensando-as em 400 µL de solução de paraformaldeído 4% (m/v) por 60 minutos. Foram depois centrifugadas nas condições já referidas e ressuspensas em 500 µL etanol 50% (v/v) por, pelo menos, 30 minutos a -20°C. Nestas condições, as células fixas podem ser armazenadas por 4 a 6 meses. Para o passo de hibridação, a 100 µL da suspensão de células fixas foram adicionados 100 µL de solução de hibridação 2x e estas colocadas a hibridar por 90 minutos. Após hibridação, as amostras foram centrifugadas e as células ressuspensas em 500 µL de solução de lavagem por 30 minutos à mesma temperatura à qual se fez a hibridação. Após a lavagem, as amostras foram centrifugadas e as células ressuspensas em 500 µl de água ultra pura. 20 µL desta suspensão foram transferidos para cada poço de uma lâmina de vidro de 3 poços e secas na estufa. Depois

de secas foram obtidas imagens de cada poço num microscópio de epifluorescência e a intensidade da fluorescência foi quantificada através do *software* Image J.

Como referido mais adiante, foi necessário realizar um protocolo de FISH em suspensão utilizando uma sonda de PNA específica para *E. coli* (5'-CGCCTCAGCCTTGA-3' marcada com o fluorocromo Alexa fluor 488). Os diversos passos do protocolo de FISH mantiveram-se inalterados, alterando-se apenas a solução de hibridação. Para a sonda de PNA foi usada uma solução de hibridação descrita num estudo anterior [143], contendo 10% (m/v) sulfato de dextrano, 10 mM cloreto de sódio, 30% (v/v) formamida, 0,1% (m/v) pirofosfato de sódio, 0,2% (m/v) polivinilpirrolidona, 0,2% (m/v) ficol, 5 mM Di-sódio EDTA, 0,1% (v/v) tritonX-100 e 50 mM Tris-HCl. Os passos de hibridação e lavagem foram realizados a 57°C.

Foram também realizados ensaios onde se acrescentou um passo prévio de fixação com metanol 100% (v/v) em amostras de biofilmes sonicados, Este passo extra foi realizado centrifugando a amostra de biofilme sonicado a 10000G por 5 minutos e ressuspendendo em 500 µl de metanol 100% (v/v). As células foram fixas em 3 condições: durante 10 minutos à temperatura ambiente, durante 40 minutos à temperatura ambiente e durante 40 minutos a -20°C. Após nova centrifugação, o protocolo de FISH foi seguido normalmente.

### **3.5. Otimização das condições de sonicação**

De forma a avaliar a cultivabilidade celular e o número de células nos biofilmes formados, foi necessário destacar as células da superfície onde o biofilme se formou mas mantendo as células viáveis. O método selecionado para destacar as células foi a sonicação (Sonopuls HD 2200, Bandelin, Alemanha). De forma a determinar as condições que resultavam em maior destacamento e em menor perda de cultivabilidade foram testados tempos de sonicação de 5, 10, 20 e 40 segundos e amplitudes de 10, 15 20 e 25%. Culturas puras de cada espécie foram cultivadas em TSA *overnight* a 37°C. De seguida foram cultivadas em TSB por 16-18h a 37°C com uma agitação de 150 rpm (Agitorb 200 ICP, Norconcessus, Portugal). Utilizando a cultura celular obtida, a D.O. foi acertada para o equivalente a  $1 \times 10^8$  células/ml e 800 µL desta suspensão foram transferidos para cada poço de uma microplaca de 48 poços. Para cada condição de sonicação foram contadas as CFUs em placas de TSA após incubação a 37°C *overnight* e 48 horas para *E. coli* e *A. xylooxidans*, respetivamente.

Sabendo a perda de cultivabilidade celular em cada condição, foram formados biofilmes mistos de *E. coli* e *A. xylooxidans* em cupões de silicone (Neves & Neves, Lda, Portugal) que foram sonicados nas condições mais agressivas mas que resultaram numa perda de cultivabilidade inferior em 1 log, de forma a aumentar a possibilidade de destacar completamente o biofilme, sem no entanto danificar significativamente as células. De forma a verificar a presença de biofilme na superfície do cupão, após sonicação foi realizada uma marcação com DAPI (dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole) (Merck, Alemanha), um marcador fluorescente bastante específico para o DNA [144]. Assim, à superfície de cada cupão foi adicionada uma gota de DAPI e esta foi coberta por uma lamela. Após 10 minutos de incubação no escuro, os cupões foram lavados com água ultra pura e o cupão observado no microscópio de epifluorescência (filtro A). De forma a avaliar a capacidade de destacamento, os cupões sonicados foram comparados com cupões não sonicados contendo biofilmes marcados com as sondas 6120 e 6122, após realização do protocolo de FISH em cupão.

### **3.6. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism, v5.0 (Graphpad Software, Inc, EUA) usando teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Foram considerados significativos os resultados com  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Otimização protocolo de FISH em lâmina

Tradicionalmente, a técnica de FISH baseia-se na utilização de pequenas cadeias de DNA como sondas, no entanto, neste trabalho foram utilizadas sondas que apresentam nucleótidos de LNA intercalados por dois nucleótidos de 2'OMe, dois análogos de ácidos nucleicos com maior afinidade para o RNA, o alvo destas sondas, do que as tradicionais sondas de DNA. Além destas alterações, todos os nucleótidos das sondas são PS, apresentando um dos oxigénios não envolvidos na ligação fosfodiéster substituído por um enxofre, de forma a aumentar a resistência à ação de endonucleases

Como o objetivo deste trabalho foi estudar biofilmes mistos, foi necessário determinar uma temperatura de hibridação à qual as sondas para ambas as espécies emitissem um sinal positivo. Como se pode ver na Tabela 5, as sondas desenhadas para *A. xylooxidans* apresentam uma temperatura de melting inferior às desenhadas para *E. coli*. Como já referido, realizando ensaios a uma temperatura acima do ideal para as sondas pode fazer com que o emparelhamento entre as sondas e o alvo não ocorra, não se obtendo sinal. Por outro lado, a utilização de temperaturas abaixo do ideal potencia a formação de emparelhamentos errados e assim o aumento de falsos positivos. Assim, de forma a ser obtido sinal em todas as sondas foram testadas temperaturas entre os 51 e os 59°C, situam-se em torno das temperaturas de melting teóricas calculadas para as sondas 6113 e 6122.

Foi aplicado o protocolo de FISH em lâmina nas diferentes temperaturas testadas e a intensidade de fluorescência para as sondas 6112, 6120, 6113 e 6122 quantificada, encontrando-se os resultados obtidos se expressos na Figura 11.

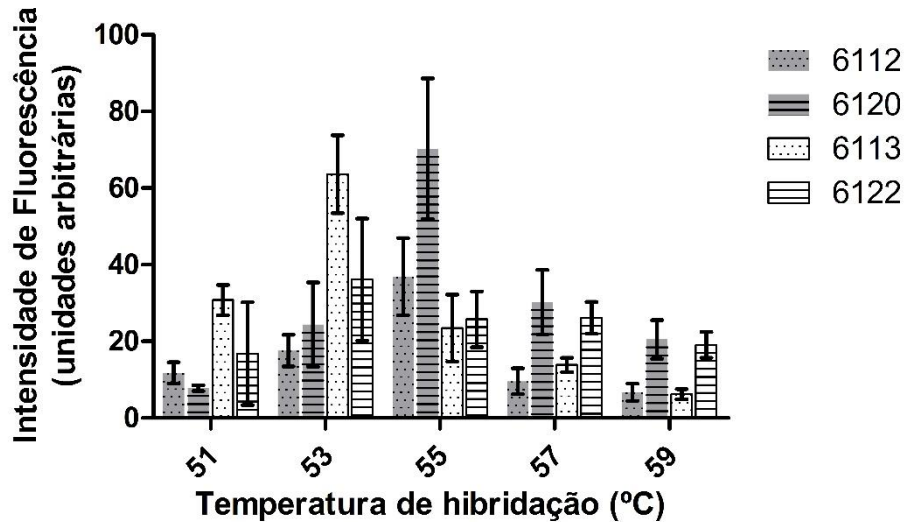


Figura 11 - Intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias) das diferentes sondas testadas a diferentes temperaturas (°C).

Como se pode ver na Figura 11 as sondas que apresentaram maior intensidade de fluorescência foram a 6113 para *A. xylosoxidans* e a 6120 para *E. coli*, aos 53 e 55°C, respetivamente. Pode ver-se que o sinal máximo para os dois pares de sondas se encontrava nestas duas temperaturas, começando-se a perder sinal fora deste intervalo. Por esta razão não foram testadas temperaturas superiores a 59°C ou inferiores a 51°C.

As duas sondas tiveram de ser usadas simultaneamente de forma a ser possível discriminar as duas espécies, sendo necessário para isso escolher uma só temperatura de hibridação. Uma vez que o sinal da sonda 6120 a 53°C é semelhante ao das sondas 6113 e 6122 a 55°C, optou-se por realizar os testes seguintes a 55°C, uma vez que ao aumentar a temperatura, a estringência é maior, o que melhora a especificidade da sonda. Uma vez que a 55°C o sinal das sondas 6113 e 6122 foi praticamente igual, e uma vez que a sonda 6122 apresentou sinais superiores em temperaturas mais elevadas, esta última foi a selecionada para fazer os ensaios posteriores.

O passo seguinte foi testar a especificidade das sondas selecionadas, 6120 e 6122, em amostras mistas contendo as duas espécies em estudo. Como se pode ver na Figura 12 a, ao realizar a hibridação aos 55°C as sondas não foram específicas, pois a grande maioria das células encontravam-se marcadas com ambas as sondas, não sendo possível discriminar as células de *E. coli* marcadas com FAM (verde) e as células de *A. xylosoxidans* marcadas com CY3 (vermelho). Uma forma de aumentar a especificidade das sondas é aumentar a estringência do passo de hibridação, seja pelo aumento da concentração do desnaturante, neste caso a ureia, aumento da temperatura ou diminuição

da concentração de sal. Como se pode ver na Figura 11, utilizando uma temperatura de hibridação de 57°C as sondas 6120 e 6122 apresentam sinal semelhante ao sinal obtido para a sonda 6122 a 55°C. Assim, o protocolo de FISH em amostras mistas foi repetido para uma temperatura de hibridação de 57°C. Como se pode ver na Figura 12 b este aumento de 2°C foi o suficiente para tornar as sondas 6120 e 6122 específicas, sendo possível discriminar perfeitamente as duas espécies.

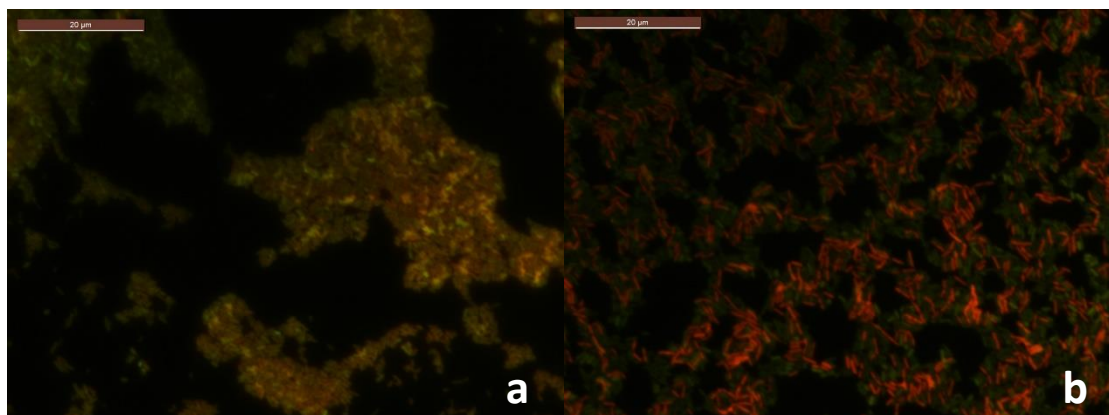


Figura 12 – Imagens de microscopia de epifluorescência de amostras mistas de *E. coli* (a verde) e *A. xylosoxidans* (a vermelho) após protocolo de FISH em lâmina utilizando as sondas 6120 e 6122, realizado a a) 55°C e b) 57°C. Ambas as imagens foram obtidas usando as mesmas condições de exposição. A barra de escala corresponde a 20 µm.

#### 4.2. Otimização do protocolo de FISH em suspensão

Uma vez que a quantificação de células no biofilme foi feita em suspensões celulares obtidas após sonicação dos cupões onde os biofilmes se formaram, foi necessário verificar se os resultados obtidos para o protocolo de FISH em lâmina também se mantinham usando células em suspensão. Assim foram realizados ensaios de FISH seguindo o protocolo referido na secção 3.4.2.2, utilizando 57°C como a temperatura de hibridação e lavagem. Ao utilizar células em suspensão, o sinal obtido poderia ser ligeiramente diferente, uma vez que as condições a que as células estão sujeitas durante o protocolo de FISH são diferentes das condições em lâmina, apesar de serem usados as mesmas soluções. Como se pode ver pela Figura 13, os valores de intensidade de fluorescência obtidos em amostras em suspensão foram ligeiramente maiores do que aqueles obtidos em amostras em lâmina, apesar de não serem estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).



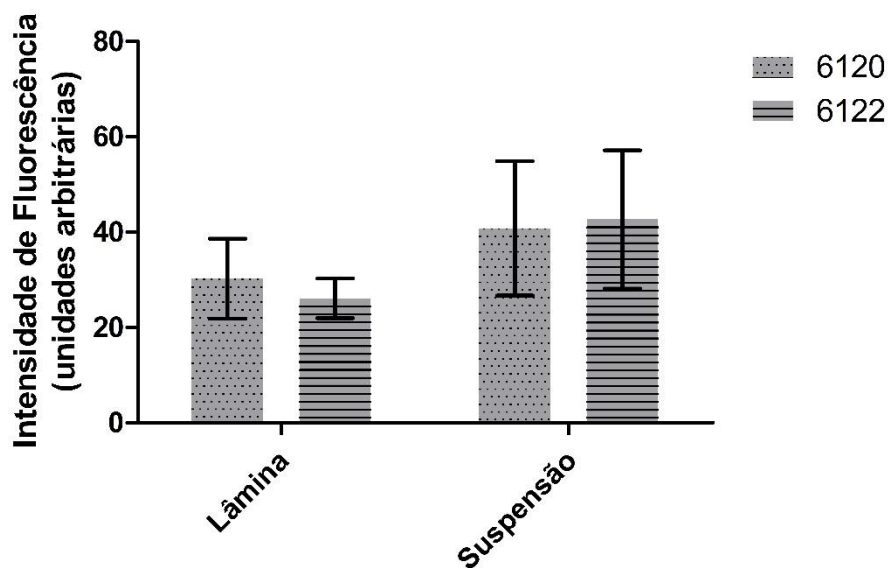


Figura 13 - Intensidade de fluorescência obtida realizando o protocolo de FISH em lâmina e em suspensão a 57°C para as sondas selecionadas.

Sendo o sinal das sondas semelhante em lâmina e em suspensão, foram realizados ensaios em amostras mistas de forma a verificar se as sondas se mantinham específicas. Como se pode ver na Figura 14, usando 57°C como temperatura de hibridação e lavagem, as sondas foram específicas.

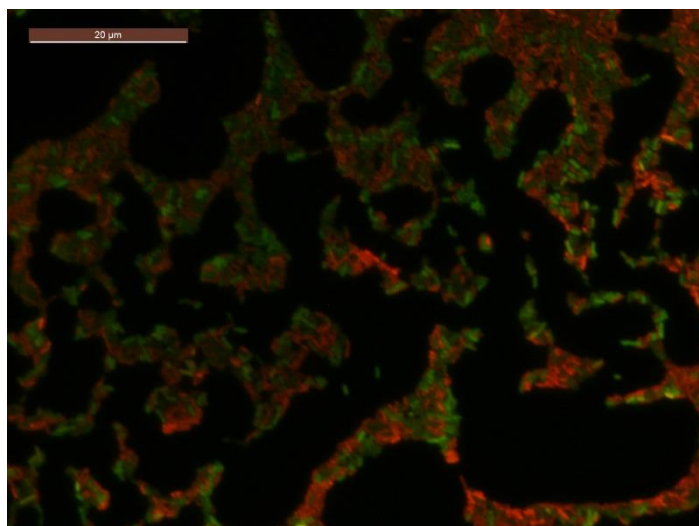


Figura 14 – Imagens de microscopia de epifluorescência de uma amostra mista de *E. coli* (a verde) e *A. xylosoxidans* (a vermelho) após protocolo de FISH em suspensão realizado a 57°C com as sondas 6120 e 6122. A barra de escala corresponde a 20 µm.

### 4.3. Otimização das condições de sonicação

De forma a ser possível avaliar a cultivabilidade celular e quantificar as células presentes nos biofilmes foi necessário destacar as células do cupão minimizando a perda de cultivabilidade. De forma a determinar as condições mais agressivas a que as células poderiam ser sujeitas, 1 log foi definido como o limite máximo de perda de cultivabilidade considerado aceitável.

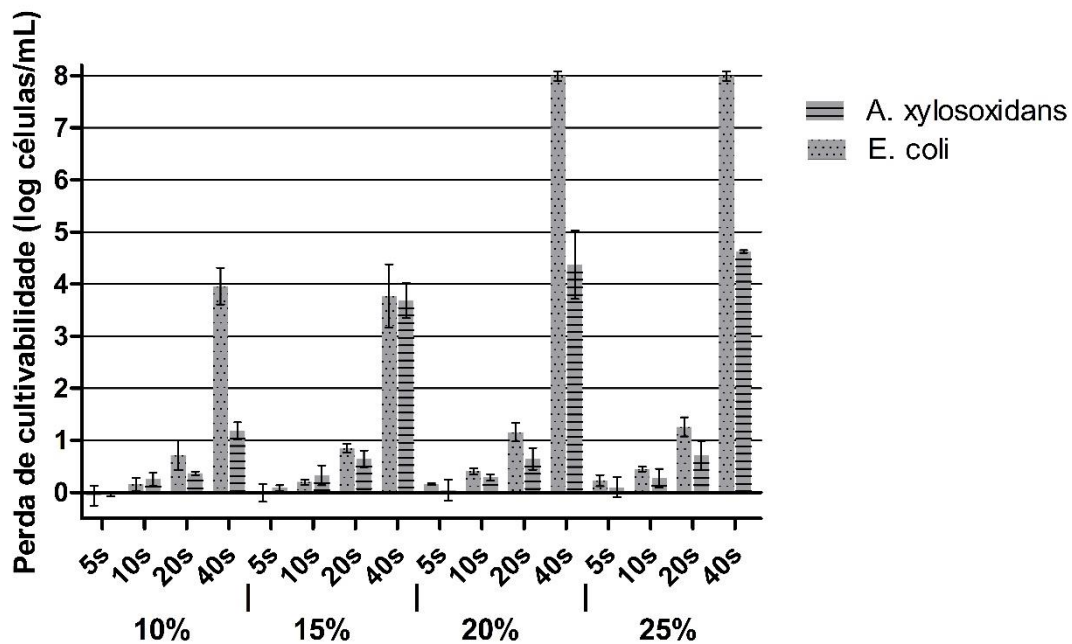


Figura 15 - Perda de cultivabilidade (log células/ml) celular nas diferentes condições de sonicação testadas

Como se pode ver na Figura 15, para todas as amplitudes testadas, o tempo de 40 segundos resultou sempre numa perda de cultivabilidade bastante superior a 1 log. Ao utilizar sonicações de 20 segundos, a perda manteve-se abaixo do limite em todas as amplitudes para *A. xylosoxidans*. No caso de *E. coli* tal só se verificou para as duas amplitudes mais baixas. Uma vez que usando 5 e 10 segundos de sonicação, a perda de cultivabilidade se manteve abaixo do limite, o tempo de 5 segundos foi descartado, uma vez que quanto maior o tempo de sonicação, mais biofilme seria destacado.

De forma a avaliar a capacidade da sonicação de destacar o biofilme do cupão usando as condições mais agressivas, mas que ao mesmo tempo resultaram numa perda de cultivabilidade inferior a 1 log, ou seja, 10 segundos a 25% e 20 segundos a 15%, foram formados biofilmes mistos e sonicados. Quanto mais tempo tiver o biofilme mais fortemente se encontra aderido ao cupão e é mais resistente a alterações do meio. Assim,

se uma condição de sonicação for capaz de destacar o biofilme com um determinado tempo de formação do cupão, também será capaz de destacar biofilmes mais recentes, uma vez que não se encontram tão fortemente aderidos ao cupão e são menos resistentes a alterações das condições do meio.

Como se pode ver na Figura 16 b) e c), usando um impulso de 20s e 15%, apesar da maioria do biofilme ser destacado, ainda se mantiveram bastantes células aderidas à superfície do cupão comparando com o controlo (Figura 16 a)). Assim foi usado um impulso com uma maior amplitude, neste caso, de 10s e 25% num cupão com um biofilme de 192h e como se pode ver na Figura 16 d) e e), não restaram praticamente células na superfície do cupão. Como estas condições de sonicação foram eficazes no destacamento do biofilme às 192h, esperava-se que fossem eficazes em biofilmes mais recentes. A sonicação foi então repetida em biofilmes de 384h, no entanto, como se pode ver na Figura 16 f) e g) muito do biofilme manteve-se aderido ao cupão e, mesmo utilizando condições de sonicação que resultaram numa perda de cultivabilidade superior ao limite definido, muito do biofilme permaneceu na superfície do cupão (Figura 16 h), verificando-se o mesmo em biofilmes com mais tempo (Figura 16 i) e j)). Uma vez que não foi possível destacar completamente biofilmes de 384h e 768h da superfície do cupão, apenas foram estudados biofilmes até 192h, pois não seria possível avaliar a cultivabilidade celular e quantificar o número de células destes biofilmes pois grande parte das células iria permanecer nos cupões. Além disso, em biofilmes com tanto tempo foi possível verificar que houve um destacamento do biofilme da superfície do cupão, perdendo-se assim parte das células durante os passos de lavagem do biofilme.

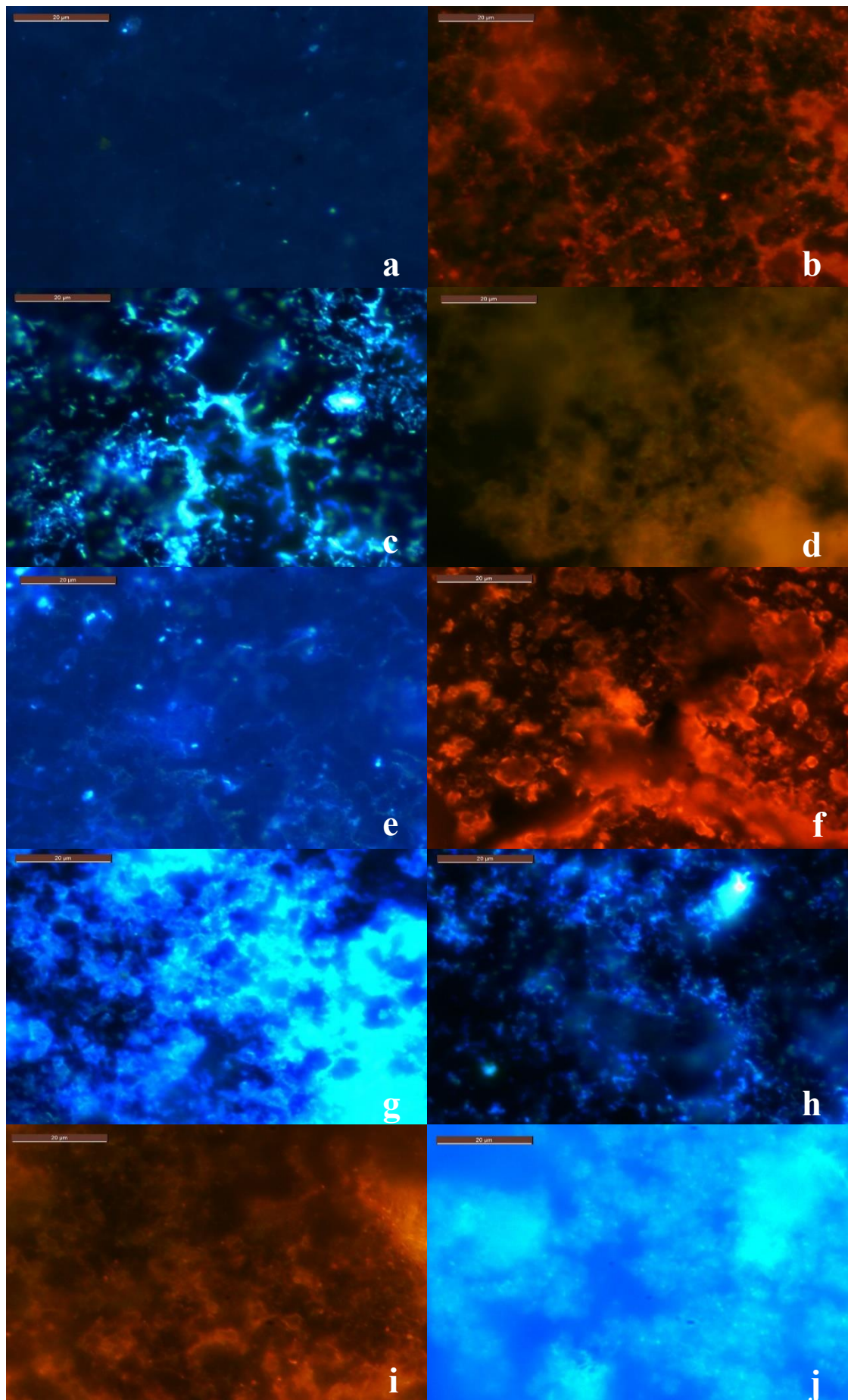


Figura 16 – Imagens de microscopia de epifluorescência de biofilmes mistos formados em silicone antes e após sonicação. Cupão de silicone a) de controlo, sem biofilme utilizando DAPI como marcador (DAPI), b) com biofilme de 96 horas sem sonicação (FISH), c) biofilme de 96s após sonicação com impulso de 20s e 15% (DAPI), d) com biofilme de 192h sem sonicação (FISH), e) biofilme de 192h após sonicação com impulso de 10s e 25% (DAPI), f) com biofilme de 384h sem sonicação (FISH), g) biofilme de 384h após sonicação com impulso de 10s e 25% (DAPI), h) biofilme de 384h após sonicação com impulso de 20s e 25% (DAPI), i) com biofilme de 768h sem sonicação (FISH), j) biofilme de 768h após sonicação com impulso de 20s e 25% (DAPI). A barra de escala corresponde a 20 µm.

#### 4.4. Formação e estudo de biofilmes simples e mistos

Como já referido, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação entre espécies patogénicas e não patogénicas em biofilmes associados a infeções urinárias. No entanto, uma vez que no laboratório onde este trabalho foi realizado só podem ser utilizados microorganismos de classe 1, foi utilizada uma estirpe não patogénica da espécie *E. coli*. Esta estirpe foi utilizada em estudos anteriores onde foram estudados biofilmes associados a infeções urinárias [145], não sendo assim esperadas diferenças significativas nos resultados obtidos por ter sido usada uma estirpe não patogénica.

Depois de todos os protocolos a usar estarem definidos, foram formados biofilmes simples e mistos em copões de silicone e de PEO, seguindo o protocolo referido na secção 3.3.

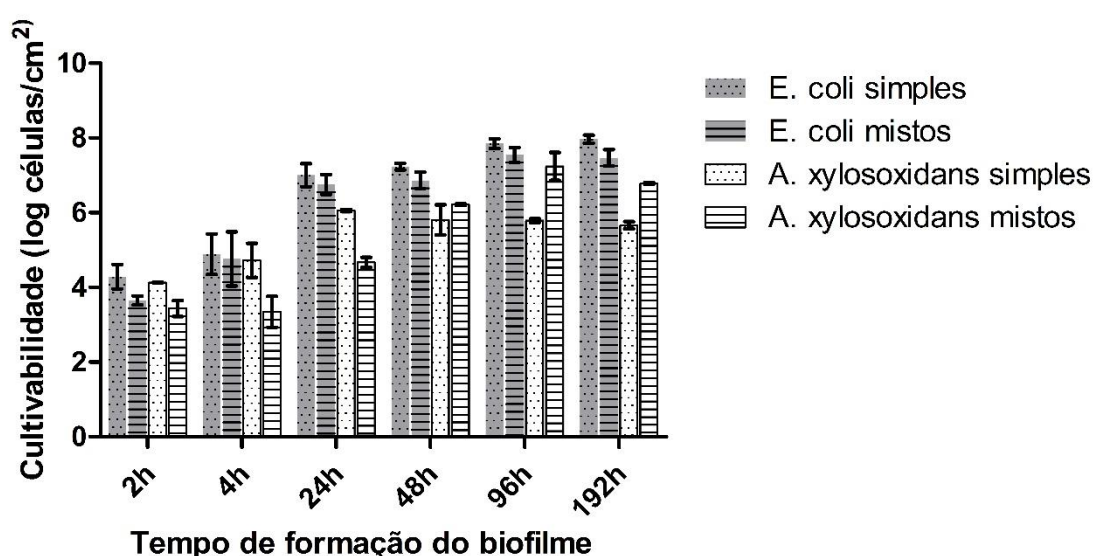


Figura 17 - Cultivabilidade celular de *E. coli* e *A. xylooxidans* em biofilmes simples e mistos formados em copões de silicone ao longo de 192 horas.

Analisando o gráfico da Figura 16, parece haver uma tendência da *E. coli* de apresentar maiores valores de células cultiváveis em biofilmes simples, no entanto, os resultados obtidos em biofilmes simples e mistos para *E. coli* não são estatisticamente diferentes. Estes resultados parecem indicar que a presença da bactéria não patogénica *A. xylooxidans* não afetou o crescimento da *E. coli* patogénica, contrariando estudos anteriores que indicam existir alterações do crescimento de *E. coli* em biofilmes mistos [146, 147]. No entanto nestes estudos foram utilizadas outras espécies, nomeadamente *Pseudomonas aeruginosa* e *Providencia stuartii*, e o tipo de interação depende das

espécies utilizadas. Pode também verificar-se na Figura 17 que o número de células cultiváveis mantem-se praticamente constante a partir das 24 horas.

No caso de *A. xylosoxidans*, verificou-se uma maior quantidade de células viáveis em biofilmes simples durante as primeiras 24 horas, mas após as 48 horas o número de células viáveis foi superior em biofilmes mistos que em simples. Com a exceção das 2 e 48 horas, a diferença entre os biofilmes simples e mistos foi estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Estes resultados podem-se dever à maior taxa de crescimento da *E. coli* ( $\mu = 0.4838 \text{ h}^{-1}$  para *E. coli* e  $\mu = 0.3107 \text{ h}^{-1}$  para *A. xylosoxidans*) [148], o que lhe permitiu consumir mais rapidamente os limitados nutrientes do meio, conferindo uma vantagem competitiva face a *A. xylosoxidans*. No entanto, à medida que o biofilme envelhece, as células começam a perder viabilidade, e apesar de ainda haver crescimento, este começa a estabilizar. Assim, ao fim de 48 horas quando o biofilme já se encontrava maduro, as células de *A. xylosoxidans* parecem ter começado a ter benefícios por interagirem com as células de *E. coli*. Algum metabolito excretado por *E. coli* pode ter sido utilizado por *A. xylosoxidans* como fonte de nutrientes, fenómeno já demonstrado num estudo anterior [149]. Neste estudo, em biofilmes mistos de *Acinetobacter* estirpe C6 e *Pseudomonas putida*, onde o álcool benzílico foi a única fonte de carbono fornecida, a primeira espécie consumiu álcool benzílico e excretou benzoato que foi utilizado pela espécie *P. putida* como fonte de carbono. No entanto, para determinar se este tipo de interação metabólica ocorreu no biofilme misto em estudo neste trabalho, seria necessário uma análise da composição do meio em biofilmes simples e mistos.

Uma vez que a transferência horizontal de genes ocorre muito mais frequentemente em biofilmes do que em células planctónicas [150], podem ter sido transferidos genes para *A. xylosoxidans* que permitam uma maior capacidade de sobrevivência, notando-se este efeito só a partir das 48 horas, uma vez que esta transferência não ocorre em todas as células e uma vez que a taxa de crescimento desta espécie é mais baixa.

No caso do cupões de PEO verificou-se que a partir das 48h o biofilme começou a destacar da superfície do cupão e que a sonicação foi incapaz de remover completamente o biofilme, tal como ocorreu nos cupões de silicone em biofilmes a partir das 384h. Esta semelhança de comportamento possivelmente deveu-se também ao amadurecimento do biofilme. Os valores obtidos não foram considerados representativos dos números reais de células cultiváveis presentes no biofilme, uma vez que o biofilme que se destacou antes da sonicação foi descartado durante os passos de lavagem e parte do biofilme permaneceu aderido à superfície do cupão mesmo após sonicação. No entanto, analisando os valores

de cultivabilidade obtidos para estes cupões, expressos na Figura 18, pode ver-se que, mesmo não contabilizando a enorme quantidade de biofilme perdido durante as lavagens ou que permaneceu aderido ao cupão, os valores obtidos a partir das 48h não são inferiores àqueles obtidos em cupões de silicone, chegando até a ser aproximadamente 2.5 log superior em biofilmes simples de *A. xylosoxidans*. Estes valores parecem indicar um maior crescimento dos biofilmes nestes cupões, razão pela qual poderão ter amadurecido muito mais rapidamente do que os biofilmes em silicone. Assim, a utilização de PEO nos cateteres urinários deverá ser evitada, uma vez que ao permitir um rápido amadurecimento do biofilme, aumenta a velocidade a que as diferentes espécies do biofilme colonizam novos locais ao longo do cateter e causam infecções nos pacientes, diminuindo o tempo disponível aos profissionais da saúde de atuarem de forma a evitar o agravamento destas infecções.

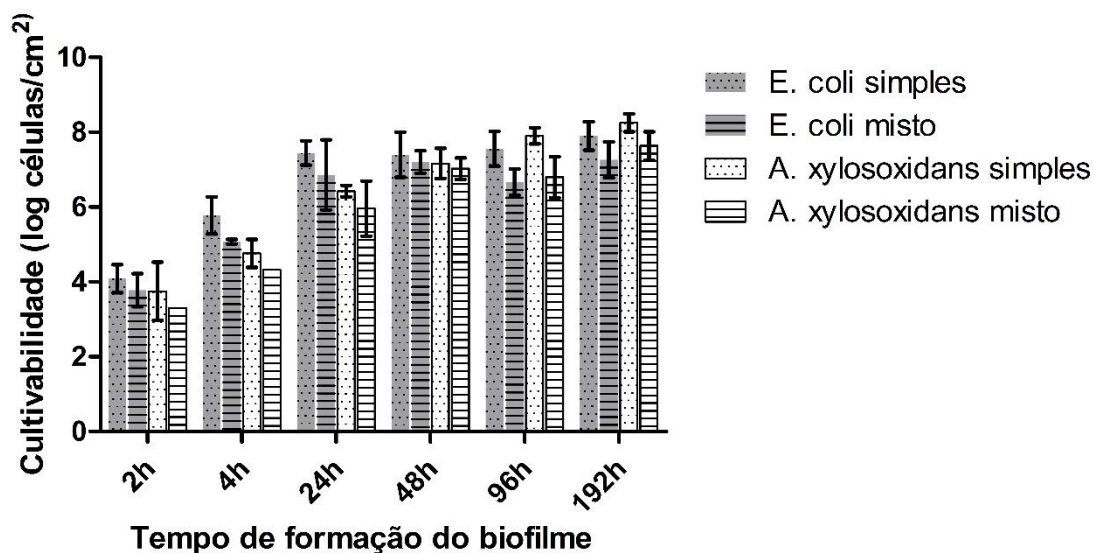


Figura 18 - Cultivabilidade celular de *E. coli* e *A. xylosoxidans* em biofilmes simples e mistos formados em cupões de PEO ao longo de 192 horas.

De forma a quantificar as células presentes nos biofilmes e de correlacionar estes valores com os resultados obtidos na quantificação de células cultiváveis, amostras da suspensão obtida após sonicação dos biofilmes foram fixas com a finalidade de marcar as células com as sondas e de marcar com PI, sendo a quantificação realizada recorrendo à citometria de fluxo. No entanto, como se pode comprovar na Figura 19, o sinal obtido em amostras de biofilmes foi muito inferior ao que se verificou quando foi realizada a otimização do protocolo de FISH em suspensão. Assim, a quantificação das células usando citometria de fluxo ficou comprometida, pois além do citómetro classificar as

intensidades de fluorescência obtidas como negativas, o facto dos sinais serem tão baixos impossibilitou a discriminação das duas populações. Assim não foi possível obter valores fidedignos para o número de células de cada espécie presentes nos biofilmes.

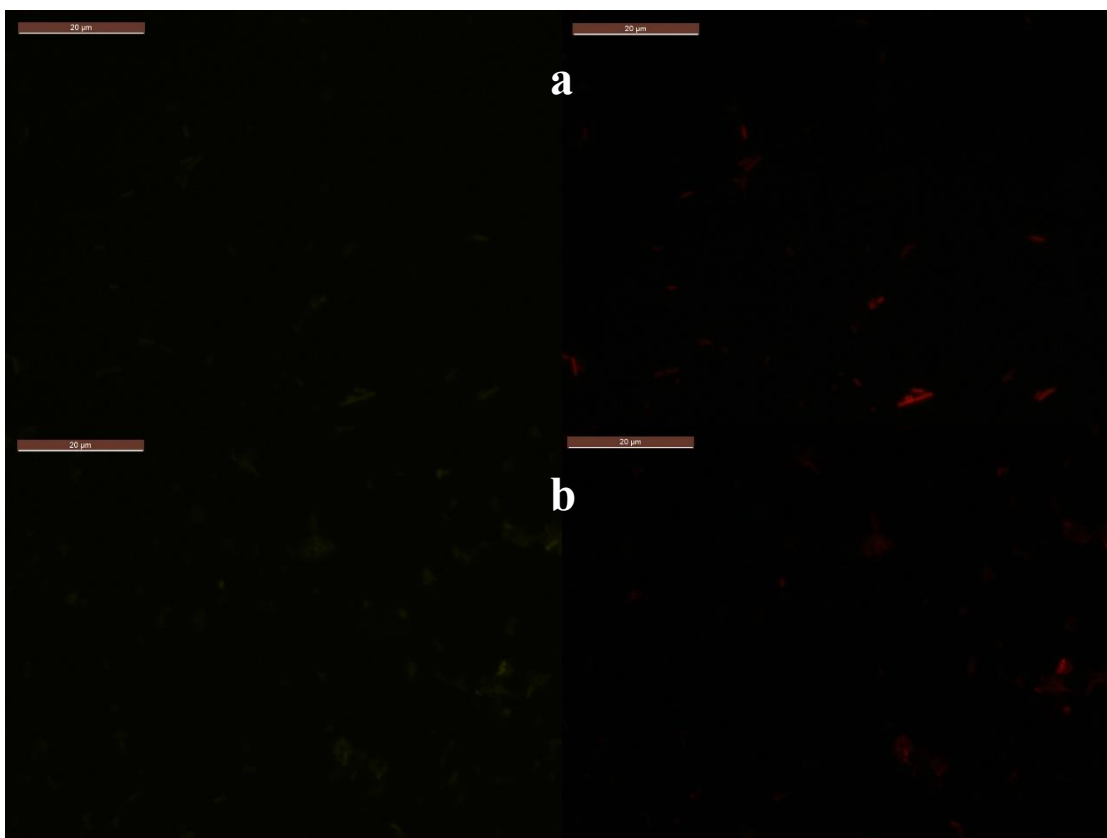


Figura 19 – Imagens de microscopia de epifluorescência de suspensões celulares marcadas com FISH obtidas após sonicação de biofilmes mistos formados em cupões de silicone ao fim de a) 24h e b) 192h. À esquerda imagens obtidas usando o filtro I3 (sondas 6120) e à direita usando o filtro N2.1 (sonda 6122). A barra de escala corresponde a 20 µm.. Devido ao baixo sinal obtido, as imagens dos dois filtros não foram sobrepostas pois este processo causa uma diminuição adicional do sinal.

Várias hipóteses foram então formuladas para os baixos valores dos sinais não específicos obtidos. As células usadas nos ensaios de otimização do protocolo de FISH foram cultivadas em TSA, enquanto as células usadas como inóculo para a formação dos biofilmes foram cultivadas em AUM, um meio bastante mais pobre. Isto sujeitou as células a um *stress* nutricional que não se verificou nas células que cresceram em TSA, o que provocou a diminuição do seu conteúdo ribossomal, reduzindo o número de locais onde as sondas se podiam ligar, podendo assim explicar a diminuição verificada na intensidade de fluorescência. Por outro lado, a forma como o biofilme se desenvolve faz com que as células que se encontrem mais no interior tenham maior dificuldade em obter os nutrientes necessários, sujeitando-as a um *stress* nutricional adicional. Além disso,



como já referido anteriormente, as células ao crescer em biofilmes encontram-se enclausuradas numa matriz extracelular, que dificulta a difusão de compostos para o interior da célula. A sonicação, apesar de permitir destacar o biofilme da superfície do copo e de separar a grande maioria das células umas das outras, não é capaz de remover a matriz que se encontra a rodear as células, o que dificulta a difusão das sondas para o interior das células [151]. Na matriz também se encontra eDNA resultante de lise celular, que pode emparelhar com as sondas, impedindo-as de penetrar na célula, e durante o passo de lavagem, uma vez que a grande maioria das hibridações não terão sido específicas, estas sondas são removidas. Além do eDNA, a matriz possui diversos polímeros carregados, que poderão ter interagido ionicamente com as sondas, uma vez que estas também apresentam carga, impedindo assim difusão para interior das células e o emparelhamento com o alvo.

De forma a verificar se o cultivo das células em AUM reduziu o conteúdo ribossomal das células causando a redução do sinal obtido, ambas as bactérias foram cultivadas neste meio e após crescimento nas mesmas condições (secção 3.3), amostras foram fixas e hibridadas seguindo o protocolo em suspensão. Como se pode ver na Figura 20 as células apresentaram uma grande intensidade de fluorescência, demonstrando que o *stress* resultante da utilização de um meio nutricional pobre não é suficiente para reduzir o sinal para os níveis obtidos.

Caso os sinais baixos se devessem a uma deficiência nutricional por parte das células mais no interior do biofilme, em biofilmes de 24h a diminuição do sinal não seria tão forte como em biofilmes de 192h, uma vez que quanto mais tempo um biofilme se desenvolver, maior o número de células que se encontram no interior em condições de deficiência nutricional. Além disso, como o rácio entre células à superfície e células no interior é maior em biofilmes mais recentes, verificar-se-iam algumas células provenientes do interior do biofilme com uma baixo sinal, mas também seriam visíveis células provenientes da superfície do biofilme com um sinal superior. Mas como se pode ver na Figura 19, os sinais obtidos são bastante semelhantes entre os dois tempos, contrariando a hipótese da causa dos baixos sinais ser a deficiência nutricional em células no interior do biofilme.

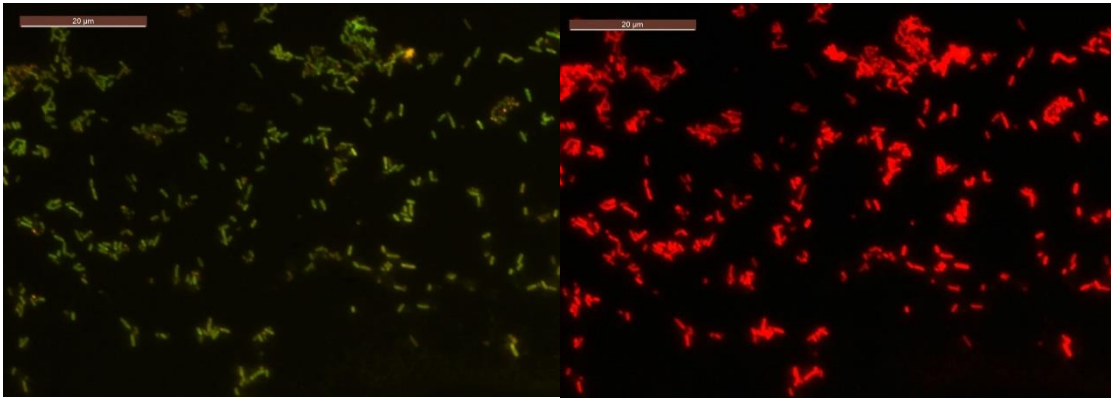


Figura 20 – Imagens de microscopia de epifluorescência de culturas celulares de *E. coli* e *A. xylosoxidans* cultivadas em AUM e marcadas realizando o protocolo de FISH em suspensão. À esquerda imagem obtida usando o filtro I3 (sonda 6120) e à direita usando o filtro N2.1 (sonda 6122). A barra de escala corresponde a 20 µm.

Num estudo anterior onde foi aplicado um protocolo de FISH a células obtidas de biofilmes após sonicação dos cupões, o problema com a matriz não foi relatado e a quantificação celular foi realizada [143]. Uma vez que o método de destacamento usado foi o mesmo, as células apresentariam também a matriz ao seu redor, no entanto, neste estudo as sondas utilizadas eram de PNA, que como já referido na secção 2.4.1 é um análogo de ácido nucleico que não apresenta carga. Esta propriedade do PNA faz que sejam capazes de atravessar a matriz sem interagir com os inúmeros compostos carregados que lá se encontram, explicando o motivo para neste estudo terem sido obtidos sinais que permitiram a quantificação celular.



Figura 21 – Imagem de microscopia de epifluorescência de uma suspensão celular obtida após sonicação de um biofilme misto formado em cupões de silicone ao fim de 48h marcada com uma sonda de PNA específica para *E. coli* realizando o protocolo de FISH em suspensão. A barra de escala corresponde a 20 µm.

De forma a explorar a hipótese de interação iônica entre as sondas e os componentes da matriz, foi testada uma sonda de PNA específica para *E. coli*. No entanto, como se pode observar na Figura 21, mesmo utilizando esta sonda sem carga, o sinal obtido foi demasiado baixo para permitir a quantificação celular.

Para todas as hipóteses formuladas para tentar explicar o motivo da obtenção de intensidades de fluorescência tão baixas quando aplicado o protocolo de FISH a suspensões celulares resultantes da sonicação dos biofilmes existiram evidências que as contrariam.

Apesar dos baixos sinais não específicos obtidos em amostras de biofilme sonicado, quando o protocolo de FISH foi aplicado em biofilmes não destacados dos cupões, foi possível obter sinais bastante bons e aparentemente específicos como se pode ver na Figura 23. Estes sinais poderão dever-se à utilização de metanol, uma vez que este não é usado no protocolo de FISH tanto em amostras em lâmina como em suspensão, mas existe uma fixação prévia com metanol quando o protocolo é aplicado em cupão. Ensaio realizado em amostras de biofilme sonicado onde foi aplicada uma fixação prévia com metanol em diferentes condições resultou em sinais mais elevados, no entanto estes não foram específicos, como se pode ver na Figura 22.

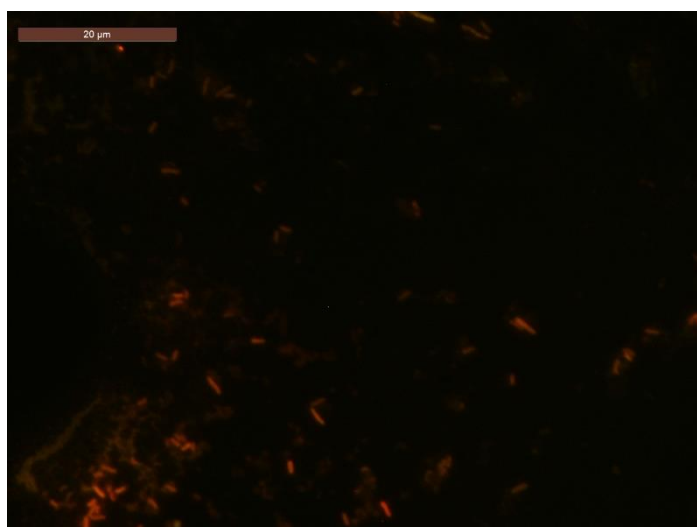


Figura 22 – Imagem de microscopia de epifluorescência de uma suspensão celular marcada com FISH, obtida após sonicação (10s, 25% de amplitude) de biofilmes mistos formados em cupões de silicone ao fim de 24h. Foi realizada uma fixação com 500 µl de metanol 100% (v/v) por 40 minutos à temperatura ambiente antes de aplicar o protocolo de FISH em suspensão. A barra de escala corresponde a 20 µm.

Assim, a quase inexistência de sinal em amostras de biofilmes sonicados parece resultar de problemas de penetração por parte das sondas que, como explicado anteriormente, não deverão dever-se à matriz em torno das células. No entanto, apesar do

problema de penetração ser resolvido recorrendo a uma fixação prévia em metanol 100% (v/v), mantem-se o problema da especificidade, sendo necessários mais ensaios de forma a definir um protocolo de FISH que possa ser aplicado a amostras provenientes da sonicação de biofilmes.

Outra possível razão para a ausência de sinal, que não foi testada, foi a própria sonicação, uma vez que em estudos anteriores realizados no laboratório verificou-se que as células marcadas com DAPI após terem sido sonicadas apresentaram uma redução no sinal (dados não publicados).

De forma a avaliar a distribuição espacial das diferentes bactérias e averiguar a presença de estruturas definidas, biofilmes com 192h formados em silicone foram marcados recorrendo a FISH e visualizados num microscópio confocal. Como se pode ver na Figura 23, foi possível marcar as células do biofilme recorrendo ao protocolo de FISH, obtendo-se sinais positivos em todos os casos. Como se pode ver pelas imagens 3D, não parece haver nenhum tipo de estrutura tanto em biofilmes simples como em mistos, verificando-se apenas a existência de canais, evidenciados pelas regiões não marcadas nas visualizações de topo dos biofilmes. Estes canais permitem a circulação de nutrientes para as regiões mais interiores dos biofilmes assim como a remoção de subprodutos [152]. A fixação dos biofilmes em cupão leva à sua desidratação, o que provoca um colapso do mesmo, podendo assim ocultar possíveis estruturas presentes em biofilmes hidratados.

Segundo Elias e Banin existem três tipos gerais de organização em biofilmes mistos: co-agregação; microcolónias e em camada. Na organização em microcolónias, cada espécie forma microcolónias que se encontram adjacentes umas às outras, enquanto em camadas existe uma tendência das diferentes espécies de se concentrarem em diferentes camadas. Na co-agregação as espécies encontram-se misturadas em todo o biofilme facilitando a interação entre as espécies [153]. Como se pode ver pela Figura 23 c, as duas espécies estudadas apresentam-se misturadas em toda a região do biofilme visualizada, ou seja, estas duas espécies desenvolvem-se em co-gregação, um tipo de organização já evidenciado em estudos de biofilmes mistos em modelos de cateteres urinários [145].

Pela Figura 23 c, pode-se concluir que as sondas marcaram especificamente as duas espécies, apesar de existir bastante sobreposição entre as duas. Esta sobreposição de sinais era esperada pois estas duas espécies desenvolvem-se em co-agregação, observando-se sobreposição das próprias células em todo o biofilme.

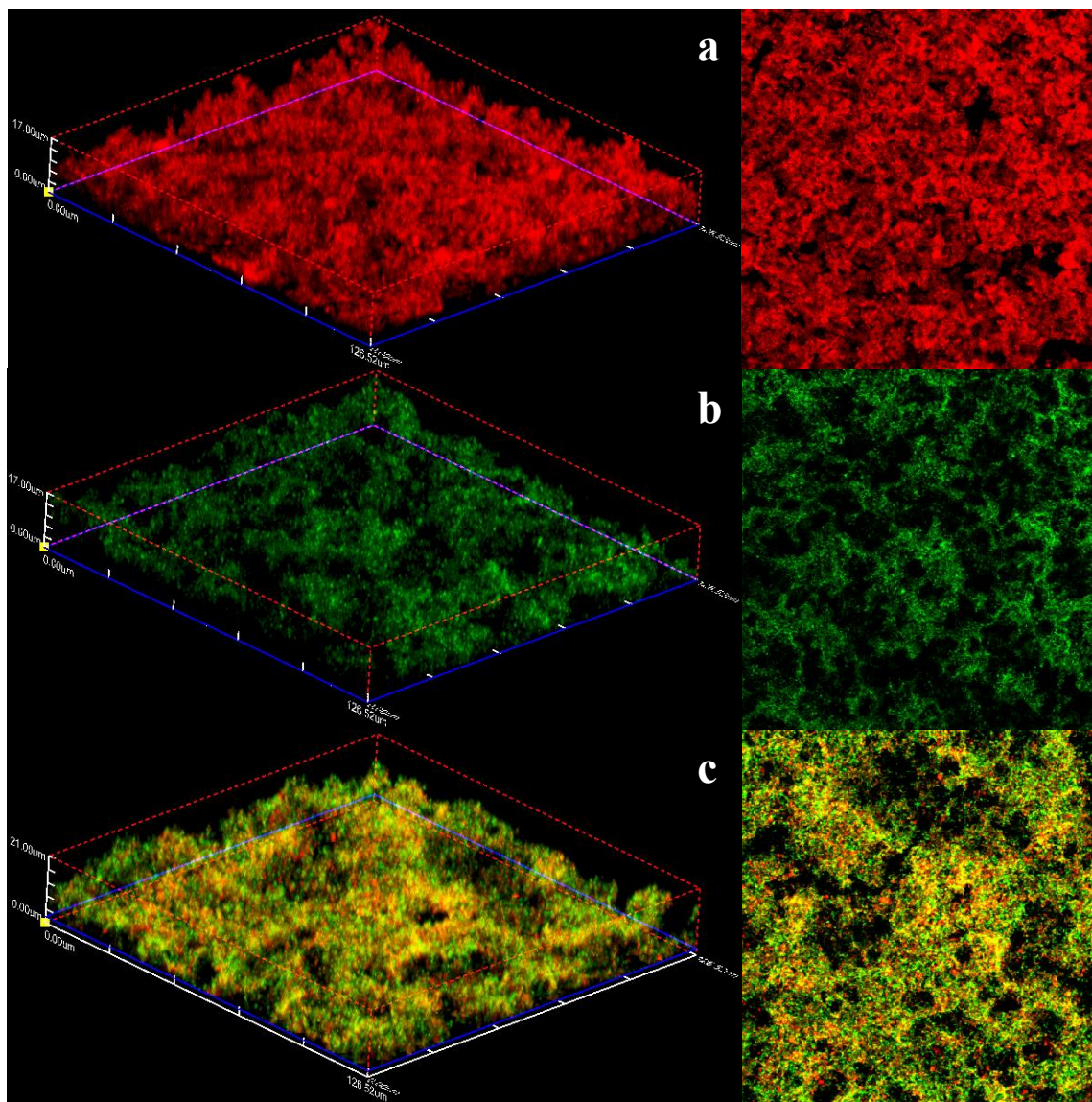


Figura 23 – Imagens de microscopia confocal de biofilmes simples e mistos com 192h formados em cupões de silicone. À esquerda encontram-se imagens 3D de uma secção de  $126,52 \times 126,52 \mu\text{m}$  e à direita a sua respetiva visualização do topo de **a** biofilme de *A. xylooxidans* marcado com a sonda 6122, **b** biofilme de *E. coli* marcado com a sonda 6120; **c** biofilme misto marcado com ambas as sondas.

Apesar de não ter sido possível obter resultados viáveis para a quantificação de células cultiváveis em biofilmes formados em PEO, biofilmes com 192h foram também visualizados recorrendo a microscopia confocal. Uma vez que a partir das 48 horas de formação os biofilmes aderidos ao PEO começaram a destacar, foi necessário identificar zonas do cupão em que se encontrava biofilme que aparentava não se ter destacado durante as 192 horas de formação.

Como se pode verificar na Figura 24, tal como acontece em biofilmes formados em silicone, nos biofilmes formados em PEO as células crescem em co-agregação, não existindo estruturas visíveis nos biofilmes à exceção de canais. Na Figura 24 c, verificou-

se que as sondas foram específicas, havendo como era esperado bastante sobreposição entre as duas.

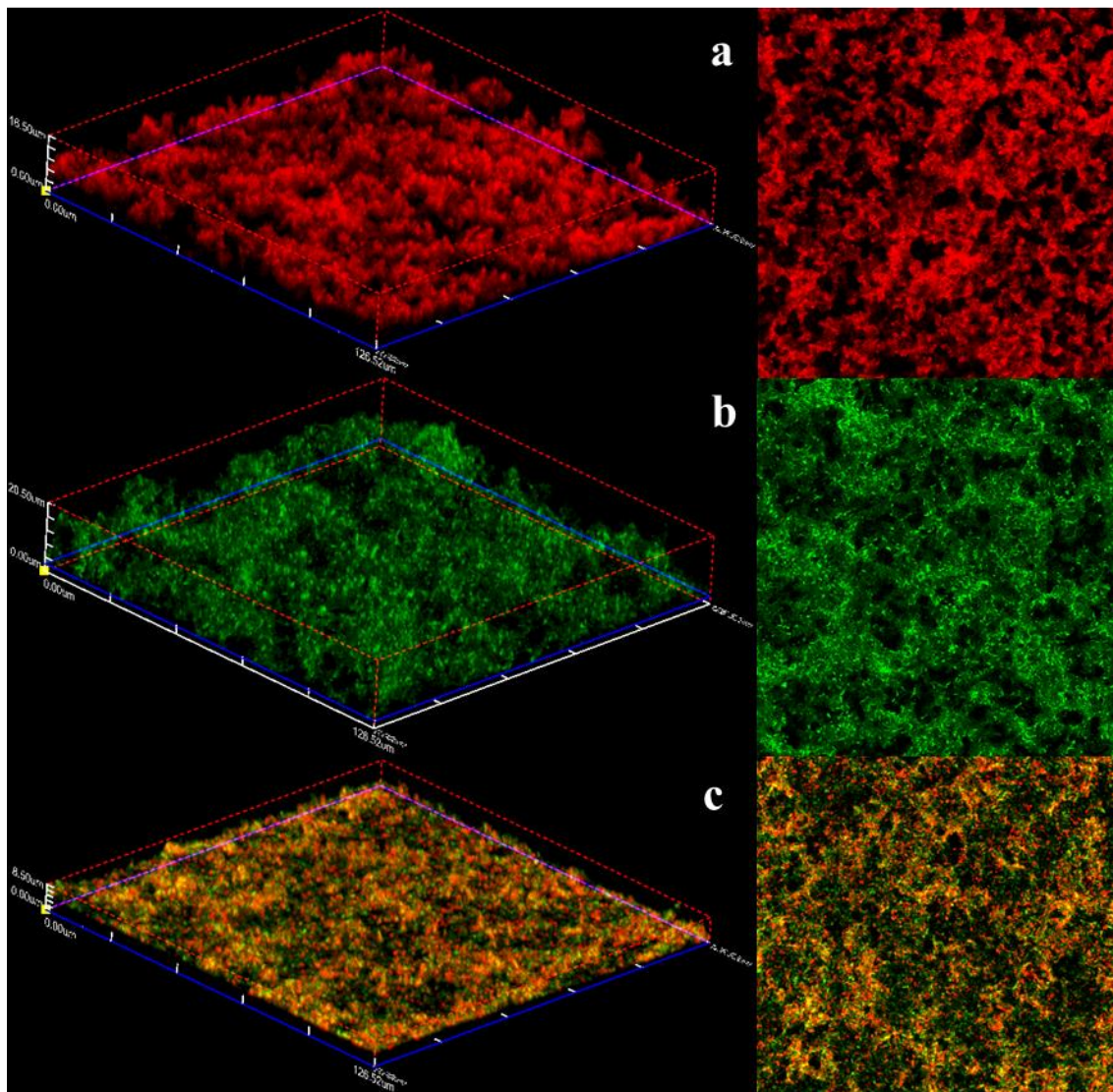


Figura 24 - Imagens de microscopia confocal de biofilmes simples e mistos com 192h formados em cupões de PEO. À esquerda encontram-se imagens 3D de uma secção de  $126,52 \times 126,52 \mu\text{m}$  e à direita a sua respetiva visualização do topo de **a** biofilme de *A. xylooxidans* marcado com a sonda 6122, **b** biofilme de *E. coli* marcado com a sonda 6120; **c** biofilme misto marcado com ambas as sondas.

## 5. Conclusões e Trabalho Futuro

### 5.1. Conclusões

Neste trabalho foi estudada a interação entre espécies patogênicas e não patogênicas em biofilmes que originam CAUTI, utilizando como modelo a espécie patogênica *E. coli* e a espécie não patogênica *A. xylosoxidans*, AUM para simular a urina e cupões de silicone e PEO de forma a simular a superfície dos cateteres urinários.

De forma a distinguir entre as diferentes espécies utilizadas foi testada, pela primeira vez, a utilização de sondas de LNA e 2'OMe. Os ensaios de otimização das condições do protocolo de FISH demonstraram a possibilidade de distinguir as duas espécies fixando as células com paraformaldeído e etanol. No passo de hibridação foi usada solução de hibridação (50 mM Tris-HCl, 900 mM NaCl, 500 mM Ureia e 200 nM de cada sonda), uma temperatura de 57°C durante 90 minutos, seguida de uma lavagem com solução de lavagem (5 mM Tris Base, 15 mM Cloreto de Sódio, 1 % (V/V) Triton-X) por 30 minutos a 57°C. No entanto, ao realizar este protocolo em amostras de biofilme obtiveram-se sinais baixos e não específicos. Várias hipóteses foram formuladas para explicar estes resultados: a utilização de AUM na formação dos biofilmes, um meio mais pobre que o TSA que foi usado durante a otimização; a deficiência nutricional das células que se encontram no interior do biofilme e consequente diminuição do conteúdo ribossomal; presença de matriz ao redor das células que funcionou como uma barreira à difusão das sondas e a presença de compostos carregados na matriz que formaram interações iônicas com as sondas. No entanto, após testes realizados de forma a comprovar estas hipóteses, os resultados obtidos refutaram todas as hipóteses.

Os ensaios preliminares usando cupões de silicone demonstraram a impossibilidade de utilizar biofilmes com mais de 192 horas, pois a partir deste tempo os biofilmes encontravam-se demasiado envelhecidos, ocorrendo não só a perda de parte do biofilme por destacamento do mesmo, mas também uma forte adesão ao cupão, impossibilitando a completa remoção do biofilme. Ao realizar os ensaios em cupões de PEO, estes dois fenómenos ocorreram a partir das 48 horas, impedindo a comparação de comportamentos dos biofilmes formados à superfície de silicone e de PEO. O rápido desenvolvimento do biofilme na superfície de PEO demonstrou uma desvantagem da utilização deste material em cateres urinários, pois quanto mais lento for o desenvolvimento do biofilme, mais tempo os profissionais de saúde dispõem para tratar este tipo de infeções urinárias.

Os ensaios de cultivabilidade realizados ao longo de 192 horas em biofilmes mistos formados em silicone demonstraram uma tendência para a diminuição do número de

células cultiváveis de *E. coli* devido à interação com *A. xylosoxidans*, no entanto tal não se verificou a nível estatístico. Os resultados envolvendo biofilmes apresentaram uma variabilidade entre ensaios, demonstrada pelos grandes desvios padrão obtidos, o que pode ocultar efeitos muito subtis da espécie *A. xylosoxidans* no crescimento de *E. coli*. No entanto, o efeito da interação entre as duas espécies no crescimento de *A. xylosoxidans* foi mais notório. Nas primeiras 24 horas, a presença de *E. coli* prejudicou o crescimento de *A. xylosoxidans*, no entanto, após as 48 horas esta interação foi benéfica, tendo sido obtidos maiores valores de células cultiváveis em biofilmes mistos. Este benefício pode ter resultado de algum metabolito produzido por *E. coli* que a espécie não patogénica foi capaz de utilizar como fonte de nutrientes, ou através da transferência horizontal de genes benéficos para o crescimento da *A. xylosoxidans*.

A análise de biofilmes não sonicados marcados com FISH recorrendo à microscopia confocal permitiu avaliar a distribuição das duas espécies, concluindo-se que as duas bactérias desenvolvem-se em co-agregação, ou seja encontram-se misturadas por todo o biofilme, não havendo um agrupamento preferencial definido. Esta análise também permitiu avaliar a estrutura dos biofilmes, não tendo sido, no entanto, verificada a presença de estruturas definidas em qualquer tipo de biofilme, excepto canais. O facto de o protocolo de FISH ter funcionado em biofilmes em cupão, mas não em amostras de biofilmes sonicados levou à conclusão que houve um problema de penetração por parte das sondas. A diferença entre o protocolo em suspensão e em cupão consiste numa fixação prévia com metanol em biofilmes em cupão e a aplicação deste passo em amostras de biofilme sonicado resultou num aumento do sinal, mantendo-se no entanto a falta de especificidade.

## **5.2. Propostas de trabalho futuro**

Uma vez que na realização deste trabalho não foi possível utilizar uma estirpe patogénica de *E. coli*, tendo-se utilizado em vez disso uma estirpe não patogénica, em trabalhos futuros deverão ser realizados ensaios de forma a verificar se o comportamento observado pela estirpe utilizada é representativo do comportamento de uma estirpe patogénica.

De forma a utilizar as sondas com o desenho aqui testado para a quantificação de células, serão necessários mais testes de forma a resolver o problema de penetração encontrado. Uma vez que uma fixação prévia com metanol resultou em intensidades de fluorescência maiores, diferentes tempos e concentrações de metanol devem ser testadas



de forma a potenciar a intensidade de fluorescência obtida. Além do metanol, podem ser usados diferentes métodos de permeabilização, como por exemplo formação de poros na parede celular das células usando lisozima.

De forma a comprovar se a sonicação poderá ter sido o fator responsável pela obtenção dos baixos sinais obtidos, deverão ser aplicados protocolos de FISH suspensões celulares de células planctónicas após terem sido sujeitas a uma sonicação idêntica à usada para destacar os biofilmes. Deverão também ser formados biofilmes e estes removidos dos cupões utilizando, por exemplo, raspagem realizando-se depois um protocolo de FISH nas suspensões celulares obtidas.

As condições de hibridação e de lavagem também devem ser alteradas, de forma a aumentar a estringência destes dois passos com a finalidade de evitar sinais não específicos, como os obtidos fixando com metanol.

Análises à composição do meio dos biofilmes através de, por exemplo, cromatografia líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography* - HPLC) poderão indicar se existe algum tipo de interação metabólica entre estas duas bactérias. De forma a determinar se a transferência horizontal de genes poderá ser o motivo para a interação verificada entre as duas espécies, devem ser realizadas análises genéticas utilizando, por exemplo, técnicas de PCR.

Neste trabalho foi feita uma primeira abordagem ao *design* de um modelo de cateter urinário. Em trabalhos futuros, numa tentativa de aproximar o modelo à realidade, devem ser realizados ensaios com agitação, de forma a simular as tensões de corte verificadas no interior dos cateteres assim como a comparação simultânea de um maior número de materiais, de forma a determinar qual dos diversos materiais atualmente usados em cateteres urinários impede ou atrasa mais eficazmente a formação e desenvolvimento de biofilmes.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Bagshaw, S.M. and Laupland, K.B., *Epidemiology of intensive care unit-acquired urinary tract infections*. *Curr Opin Infect Dis*, 2006. **19**(1): p. 67-71.
2. Meares, E.M., Jr., *Current patterns in nosocomial urinary tract infections*. *Urology*, 1991. **37**(3 Suppl): p. 9-12.
3. Clec'h, C., Schwebel, C., Francais, A., Toledano, D., Fosse, J.P., Garrouste-Orgeas, M., Azoulay, E., Adrie, C., Jamali, S., Descorps-Declere, A., Nakache, D., Timsit, J.F., and Cohen, Y., *Does catheter-associated urinary tract infection increase mortality in critically ill patients?* *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007. **28**(12): p. 1367-73.
4. Al Mohajer, M. and Darouiche, R.O., *Prevention and treatment of urinary catheter-associated infections*. *Curr Infect Dis Rep*, 2013. **15**(2): p. 116-23.
5. Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., and Stewart, P.S., *Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(1): p. 317-23.
6. Perry-O'Keefe, H., Stender, H., Broomer, A., Oliveira, K., Coull, J., and Hyldig-Nielsen, J.J., *Filter-based PNA in situ hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms*. *J Appl Microbiol*, 2001. **90**(2): p. 180-9.
7. Cerqueira, L., Azevedo, N.F., Almeida, C., Jardim, T., Keevil, C.W., and Vieira, M.J., *DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. *Int J Mol Sci*, 2008. **9**(10): p. 1944-60.
8. Yan, Y., Yan, J., Piao, X., Zhang, T., and Guan, Y., *Effect of LNA- and OMeN-modified oligonucleotide probes on the stability and discrimination of mismatched base pairs of duplexes*. *J Biosci*, 2012. **37**(2): p. 233-41.
9. Duce, G., Haxhe, J.J., Tanner, F., and Zumofen, M., *Guide pratique pour la lutte contre l'infection hospitalière*, W.H. Organization, Editor. 2002.
10. Pina, E., Paiva, J.A., Nogueira, P., and Silva, M.G., *Inquérito Nacional de Prevalência de Infecção de Adquirida no Hospital e do Uso de Antimicrobianos nos Hospitais Portugueses 2012*, Direção-Geral de Saúde.
11. *Prevalence of nosocomial infections in France: results of the nationwide survey in 1996. The French Prevalence Survey Study Group*. *J Hosp Infect*, 2000. **46**(3): p. 186-93.
12. *Health care-associated infections - Fact Sheet*, W.H.O.P. Safety, Editor.
13. Pina, E., Ferreira, E., Marques, A., and Matos, B., *Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente*. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 2010. **10**: p. 27-39.
14. Warren, J.W., *Catheter-associated urinary tract infections*. *Infect Dis Clin North Am*, 1997. **11**(3): p. 609-22.
15. Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., and Mena, B., *Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters*. *Am J Infect Control*, 2012. **40**(9): p. 854-9.
16. Niel-Weise, B.S. and van den Broek, P.J., *Urinary catheter policies for long-term bladder drainage*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2005(1): p. Cd004201.
17. Nicolle, L.E., *Urinary Catheter-Associated Infections*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2012. **26**(1): p. 13-27.
18. Schaffler, A. and Menche, N., *Medicina interna e cuidados de Enfermagem*. 2004: Lusodidacta. 552.
19. Leone, M., Albanese, J., Garnier, F., Sapin, C., Barrau, K., Bimar, M.C., and Martin, C., *Risk factors of nosocomial catheter-associated urinary tract infection in a polyvalent intensive care unit*. *Intensive Care Med*, 2003. **29**(6): p. 929-32.
20. Esposito, S., Noviello, S., and Leone, S., *[Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology and prevention]*. *Infez Med*, 2008. **16**(3): p. 130-43.

21. Maki, D.G. and Tambyah, P.A., *Engineering Out the Risk for Infection with Urinary Catheters*. Emerging Infectious Diseases, 2001. **7**(2): p. 342-347.
22. Tambyah, P.A., Halvorson, K.T., and Maki, D.G., *A prospective study of pathogenesis of catheter-associated urinary tract infections*. Mayo Clin Proc, 1999. **74**(2): p. 131-6.
23. Barford, J.M., Anson, K., Hu, Y., and Coates, A.R., *A model of catheter-associated urinary tract infection initiated by bacterial contamination of the catheter tip*. BJU Int, 2008. **102**(1): p. 67-74.
24. Pomfret, I., *Catheter care in the community*. Nursing Standard, 2000. **14**(27): p. 46-51.
25. Lawrence, E.L. and Turner, I.G., *Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK*. Med Eng Phys, 2005. **27**(6): p. 443-53.
26. Winson, L., *Catheterization: a need for improved patient management*. Br J Nurs, 1997. **6**(21): p. 1229-32, 1234, 1251-2.
27. Winn, C., *Basing catheter care on research principles*. Nurs Stand, 1996. **10**(18): p. 38-40.
28. Denstedt, J.D., Wollin, T.A., and Reid, G., *Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation*. J Endourol, 1998. **12**(6): p. 493-500.
29. Nacey, J.N., Tulloch, A.G., and Ferguson, A.F., *Catheter-induced urethritis: a comparison between latex and silicone catheters in a prospective clinical trial*. Br J Urol, 1985. **57**(3): p. 325-8.
30. Gabriel, M.M., Mayo, M.S., May, L.L., Simmons, R.B., and Ahearn, D.G., *In vitro evaluation of the efficacy of a silver-coated catheter*. Curr Microbiol, 1996. **33**(1): p. 1-5.
31. Cho, Y.W., Park, J.H., Kim, S.H., Cho, Y.H., Choi, J.M., Shin, H.J., Bae, Y.H., Chung, H., Jeong, S.Y., and Kwon, I.C., *Gentamicin-releasing urethral catheter for short-term catheterization*. J Biomater Sci Polym Ed, 2003. **14**(9): p. 963-72.
32. Park, J.H., Cho, Y.W., Cho, Y.H., Choi, J.M., Shin, H.J., Bae, Y.H., Chung, H., Jeong, S.Y., and Kwon, I.C., *Norfloxacin-releasing urethral catheter for long-term catheterization*. J Biomater Sci Polym Ed, 2003. **14**(9): p. 951-62.
33. Lee, S.J., Kim, S.W., Cho, Y.H., Shin, W.S., Lee, S.E., Kim, C.S., Hong, S.J., Chung, B.H., Kim, J.J., and Yoon, M.S., *A comparative multicentre study on the incidence of catheter-associated urinary tract infection between nitrofurazone-coated and silicone catheters*. Int J Antimicrob Agents, 2004. **24 Suppl 1**: p. S65-9.
34. Liedberg, H. and Lundeborg, T., *Silver alloy coated catheters reduce catheter-associated bacteriuria*. Br J Urol, 1990. **65**(4): p. 379-81.
35. Saint, S., Elmore, J.G., Sullivan, S.D., Emerson, S.S., and Koepsell, T.D., *The efficacy of silver alloy-coated urinary catheters in preventing urinary tract infection: a meta-analysis*. Am J Med, 1998. **105**(3): p. 236-41.
36. Nakagawa, N., Yashiro, N., Nakajima, Y., Barnhart, W.H., and Wakabayashi, M., *Hydrogel-coated glide catheter: experimental studies and initial clinical experience*. AJR Am J Roentgenol, 1994. **163**(5): p. 1227-9.
37. Williams, D.F., *Biocompatibility of clinical implant materials*. 1981: CRC Press.
38. Saint, S. and Lipsky, B.A., *Preventing catheter-related bacteriuria: should we? Can we? How?* Arch Intern Med, 1999. **159**(8): p. 800-8.
39. Morris, N.S., Stickler, D.J., and Winters, C., *Which indwelling urethral catheters resist encrustation by Proteus mirabilis biofilms?* Br J Urol, 1997. **80**(1): p. 58-63.
40. Bologna, R.A., Tu, L.M., Polansky, M., Fraimow, H.D., Gordon, D.A., and Whitmore, K.E., *Hydrogel/silver ion-coated urinary catheter reduces nosocomial urinary tract infection rates in intensive care unit patients: a multicenter study*. Urology, 1999. **54**(6): p. 982-7.
41. Lee, H. and Neville, K., *Handbook of Biomedical Plastics*. 1971: Pasadena Technology Press.

42. Stickler, D.J., Morris, N.S., and 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, 1996. **78**(4): p. 579-88.
43. Watnick, P. and Kolter, R., *Biofilm, city of microbes*. J Bacteriol, 2000. **182**(10): p. 2675-9.
44. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J., *Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. **3**(4): p. a010306.
45. Flemming, H.C. and Wingender, J., *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-33.
46. Cegelski, L., Pinkner, J.S., Hammer, N.D., Cusumano, C.K., Hung, C.S., Chorell, E., Aberg, V., Walker, J.N., Seed, P.C., Almqvist, F., Chapman, M.R., and Hultgren, S.J., *Small-molecule inhibitors target Escherichia coli amyloid biogenesis and biofilm formation*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(12): p. 913-9.
47. Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., and Brozel, V.S., *DNA as an adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form biofilms*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(9): p. 2861-8.
48. Vuong, C., Voyich, J.M., Fischer, E.R., Braughton, K.R., Whitney, A.R., DeLeo, F.R., and Otto, M., *Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects Staphylococcus epidermidis against major components of the human innate immune system*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 269-75.
49. Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C., *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure, and Function*. 1999, Heidelberg: Springer.
50. Molin, S. and Tolker-Nielsen, T., *Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure*. Curr Opin Biotechnol, 2003. **14**(3): p. 255-61.
51. Flemming, H.C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J., *The EPS matrix: the "house of biofilm cells"*. J Bacteriol, 2007. **189**(22): p. 7945-7.
52. Nickel, J.C., Downey, J.A., and Costerton, J.W., *Ultrastructural study of microbiologic colonization of urinary catheters*. Urology, 1989. **34**(5): p. 284-91.
53. Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L., and Shirtliff, M.E., *Complicated catheter-associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 26-59.
54. Nowrouzian, F.L., Adlerberth, I., and Wold, A.E., *Enhanced persistence in the colonic microbiota of Escherichia coli strains belonging to phylogenetic group B2: role of virulence factors and adherence to colonic cells*. Microbes Infect, 2006. **8**(3): p. 834-40.
55. Sauer, F.G., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., and Hultgren, S.J., *Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(1): p. 65-72.
56. Coker, C., Poore, C.A., Li, X., and Mobley, H.L., *Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infection*. Microbes Infect, 2000. **2**(12): p. 1497-505.
57. Zhou, G., Mo, W.J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T.A., Glockshuber, R., Wu, X.R., Sun, T.T., and Kong, X.P., *Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 22): p. 4095-103.
58. Pratt, L.A. and Kolter, R., *Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 285-93.
59. Plos, K., Connell, H., Jodal, U., Marklund, B.I., Marild, S., Wettergren, B., and Svanborg, C., *Intestinal carriage of P fimbriated Escherichia coli and the susceptibility to urinary tract infection in young children*. J Infect Dis, 1995. **171**(3): p. 625-31.
60. Korhonen, T.K., Parkkinen, J., Hacker, J., Finne, J., Pere, A., Rhen, M., and Holthofer, H., *Binding of Escherichia coli s-fimbriae to human kidney epithelium*. Infection and Immunity, 1986. **54**(2): p. 322-327.

61. Khan, A.S., Kniep, B., Oelschlaeger, T.A., Van Die, I., Korhonen, T., and Hacker, J., *Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic Escherichia coli*. Infection and Immunity, 2000. **68**(6): p. 3541-3547.
62. Ulett, G.C., Mabbett, A.N., Fung, K.C., Webb, R.I., and Schembri, M.A., *The role of F9 fimbriae of uropathogenic Escherichia coli in biofilm formation*. Microbiology-Sgm, 2007. **153**: p. 2321-2331.
63. Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F.M., Baldassarri, L., Bisicchia, R., Ippolito, G., Romoli, E., and Donelli, G., *Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of Escherichia coli causing extraintestinal infections*. J Clin Microbiol, 1987. **25**(1): p. 146-9.
64. Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockatell, C.V., Jones, B.D., and Warren, J.W., *Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains*. Infect Immun, 1990. **58**(5): p. 1281-9.
65. Russo, T.A., Carlino, U.B., and Johnson, J.R., *Identification of a new iron-regulated virulence gene, ireA, in an extraintestinal pathogenic isolate of Escherichia coli*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6209-16.
66. Wright, K.J., Seed, P.C., and Hultgren, S.J., *Uropathogenic Escherichia coli flagella aid in efficient urinary tract colonization*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7657-68.
67. Ferrieres, L., Hancock, V., and Klemm, P., *Specific selection for virulent urinary tract infectious Escherichia coli strains during catheter-associated biofilm formation*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(1): p. 212-9.
68. Chung, J.W., Hong, S.J., Kim, K.J., Goti, D., Stins, M.F., Shin, S., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Kim, K.S., *37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1-mediated RhoA activation and bacterial uptake*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 16857-62.
69. Goluszko, P., Selvarangan, R., Popov, V., Pham, T., Wen, J.W., and Singhal, J., *Decay-accelerating factor and cytoskeleton redistribution pattern in HeLa cells infected with recombinant Escherichia coli strains expressing Dr family of adhesins*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 3989-97.
70. Martinez, J.J., Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Pinkner, J.S., and Hultgren, S.J., *Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells*. Embo Journal, 2000. **19**(12): p. 2803-2812.
71. Thumbikat, P., Berry, R.E., Zhou, G., Billips, B.K., Yaggie, R.E., Zaichuk, T., Sun, T.T., Schaeffer, A.J., and Klumpp, D.J., *Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection*. PLoS Pathog, 2009. **5**(5): p. e1000415.
72. Marrs, C.F., Zhang, L., Tallman, P., Manning, S.D., Somsel, P., Raz, P., Colodner, R., Jantunen, M.E., Siitonen, A., Saxen, H., and Foxman, B., *Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral Escherichia coli*. J Med Microbiol, 2002. **51**(2): p. 138-42.
73. Dunne, W.M., Jr., *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 155-66.
74. Schwartz, D.J., Chen, S.L., Hultgren, S.J., and Seed, P.C., *Population dynamics and niche distribution of uropathogenic Escherichia coli during acute and chronic urinary tract infection*. Infect Immun, 2011. **79**(10): p. 4250-9.
75. Anderson, G.G., Martin, S.M., and Hultgren, S.J., *Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract*. Microbes Infect, 2004. **6**(12): p. 1094-101.
76. Anderson, G.G., Goller, C.C., Justice, S., Hultgren, S.J., and Seed, P.C., *Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis*. Infect Immun, 2010. **78**(3): p. 963-75.

77. Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.A., Fletcher, D.A., Anderson, G.G., Footer, M.J., and Hultgren, S.J., *Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(5): p. 1333-1338.
78. Garofalo, C.K., Hooton, T.M., Martin, S.M., Stamm, W.E., Palermo, J.J., Gordon, J.I., and Hultgren, S.J., *Escherichia coli from urine of female patients with urinary tract infections is competent for intracellular bacterial community formation*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 52-60.
79. Breitenbach, J.M. and Hausinger, R.P., *Proteus mirabilis urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids*. Biochem J, 1988. **250**(3): p. 917-20.
80. Griffith, D.P., Musher, D.M., and Itin, C., *Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones*. Invest Urol, 1976. **13**(5): p. 346-50.
81. Stickler, D.J., *Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters*. Nat Clin Pract Urol, 2008. **5**(11): p. 598-608.
82. Cools, H.J. and Van der Meer, J.W., *Restriction of long-term indwelling urethral catheterisation in the elderly*. Br J Urol, 1986. **58**(6): p. 683-8.
83. Stickler, D.J., Jones, G.L., and Russell, A.D., *Control of encrustation and blockage of Foley catheters*. Lancet, 2003. **361**(9367): p. 1435-7.
84. Jones, B.D. and Mobley, H.L., *Genetic and biochemical diversity of ureases of Proteus, Providencia, and Morganella species isolated from urinary tract infection*. Infect Immun, 1987. **55**(9): p. 2198-203.
85. Matsukawa, M., Kunishima, Y., Takahashi, S., Takeyama, K., and Tsukamoto, T., *Bacterial colonization on intraluminal surface of urethral catheter*. Urology, 2005. **65**(3): p. 440-4.
86. Mobley, H.L.T. and Warren, J.W., *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Virulence of Proteus mirabilis. 1996, Washington DC:: ASM Press.
87. Mathur, S., Sabbuba, N.A., Suller, M.T., Stickler, D.J., and Feneley, R.C., *Genotyping of urinary and fecal Proteus mirabilis isolates from individuals with long-term urinary catheters*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005. **24**(9): p. 643-4.
88. Stickler, D., Young, R., Jones, G., Sabbuba, N., and Morris, N., *Why are Foley catheters so vulnerable to encrustation and blockage by crystalline bacterial biofilm?* Urol Res, 2003. **31**(5): p. 306-11.
89. Capewell, A.E. and Morris, S.L., *Audit of catheter management provided by District Nurses and Continence Advisors*. Br J Urol, 1993. **71**(3): p. 259-64.
90. Mathur, S., Suller, M.T., Stickler, D.J., and Feneley, R.C., *Prospective study of individuals with long-term urinary catheters colonized with Proteus species*. BJU Int, 2006. **97**(1): p. 121-8.
91. Choong, S., Wood, S., Fry, C., and Whitfield, H., *Catheter associated urinary tract infection and encrustation*. Int J Antimicrob Agents, 2001. **17**(4): p. 305-10.
92. Mathur, S., Suller, M.T., Stickler, D.J., and Feneley, R.C., *Factors affecting crystal precipitation from urine in individuals with long-term urinary catheters colonized with urease-positive bacterial species*. Urol Res, 2006. **34**(3): p. 173-7.
93. Burr, R.G. and Nuseibeh, I.M., *Urinary catheter blockage depends on urine pH, calcium and rate of flow*. Spinal Cord, 1997. **35**(8): p. 521-5.
94. Stickler, D.J. and Morgan, S.D., *Modulation of crystalline Proteus mirabilis biofilm development on urinary catheters*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 5): p. 489-94.
95. Jones, G.L., Muller, C.T., O'Reilly, M., and Stickler, D.J., *Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(2): p. 266-72.
96. Gall, J.G. and Pardue, M.L., *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969. **63**(2): p. 378-83.

97. John, H.A., Birnstiel, M.L., and Jones, K.W., *RNA-DNA hybrids at the cytological level*. *Nature*, 1969. **223**(5206): p. 582-7.
98. McNeil, N. and Ried, T., *Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine*. *Expert Rev Mol Med*, 2000. **2000**: p. 1-14.
99. Levsky, J.M. and Singer, R.H., *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 14): p. 2833-8.
100. Bauman, J.G., Wiegant, J., Borst, P., and van Duijn, P., *A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA*. *Exp Cell Res*, 1980. **128**(2): p. 485-90.
101. Garimberti, E. and Tosi, S., *Fluorescence in situ hybridization (FISH), basic principles and methodology*. *Methods Mol Biol*, 2010. **659**: p. 3-20.
102. Lakatošová, M. and Holečková, B., *Fluorescence in situ hybridisation*. *Biologia*, 2007. **62**(3): p. 243-250.
103. Chen, T.R., *Fluorescence in situ hybridization (FISH): Detection of biotin- and digoxigenin-labeled signals on chromosomes*. *Journal of tissue culture methods*, 1994. **16**(1): p. 39-47.
104. Moter, A. and Gobel, U.B., *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms*. *J Microbiol Methods*, 2000. **41**(2): p. 85-112.
105. Amann, R. and Fuchs, B.M., *Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(5): p. 339-48.
106. Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K.H., *In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides*. *Microbiology*, 1994. **140 ( Pt 10)**: p. 2849-58.
107. Swiger, R.R. and Tucker, J.D., *Fluorescence in situ hybridization: A brief review*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1996. **27**(4): p. 245-254.
108. Bartlett, J.S., *Fluorescence In Situ Hybridization*, in *Molecular Diagnosis of Cancer*, J. Roulston and J.S. Bartlett, Editors. 2004, Humana Press. p. 77-87.
109. Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H., *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiol Rev*, 1995. **59**(1): p. 143-69.
110. Yilmaz, L.S. and Noguera, D.R., *Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(12): p. 7126-39.
111. Yilmaz, L.S., Okten, H.E., and Noguera, D.R., *Making all parts of the 16S rRNA of Escherichia coli accessible in situ to single DNA oligonucleotides*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(1): p. 733-44.
112. Fuchs, B.M., Glockner, F.O., Wulf, J., and Amann, R., *Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes*. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(8): p. 3603-7.
113. Neidhardt, F.C., *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 1996, Washington DC: American Society for Microbiology.
114. Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., and Schleifer, K.-H., *An In Situ Hybridization Protocol for Detection and Identification of Planktonic Bacteria*. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996. **19**(3): p. 403-406.
115. Schonhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., and Amann, R., *Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification*. *Appl Environ Microbiol*, 1997. **63**(8): p. 3268-73.

116. Christensen, U., Jacobsen, N., Rajwanshi, V.K., Wengel, J., and Koch, T., *Stopped-flow kinetics of locked nucleic acid (LNA)-oligonucleotide duplex formation: studies of LNA-DNA and DNA-DNA interactions*. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 3): p. 481-4.
117. Kaur, H., Babu, B.R., and Maiti, S., *Perspectives on chemistry and therapeutic applications of Locked Nucleic Acid (LNA)*. *Chem Rev*, 2007. **107**(11): p. 4672-97.
118. Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H., and Buchardt, O., *Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. *Science*, 1991. **254**(5037): p. 1497-500.
119. Nielsen, P.E., *Structural and biological properties of peptide nucleic acid (PNA)*. *Pure and Applied Chemistry*, 1998. **70**(1): p. 105-110.
120. Demidov, V.V. and Frank-Kamenetskii, M.D., *Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions*. *Trends Biochem Sci*, 2004. **29**(2): p. 62-71.
121. Hyrup, B. and Nielsen, P.E., *Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications*. *Bioorg Med Chem*, 1996. **4**(1): p. 5-23.
122. K. Singh, S., A. Koshkin, A., Wengel, J., and Nielsen, P., *LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition*. *Chemical Communications*, 1998(4): p. 455-456.
123. Petersen, M., Nielsen, C.B., Nielsen, K.E., Jensen, G.A., Bondensgaard, K., Singh, S.K., Rajwanshi, V.K., Koshkin, A.A., Dahl, B.M., Wengel, J., and Jacobsen, J.P., *The conformations of locked nucleic acids (LNA)*. *J Mol Recognit*, 2000. **13**(1): p. 44-53.
124. Di Giusto, D.A. and King, G.C., *Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with DNA polymerase and proofreading exonuclease activities: implications for genotyping assays*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(3): p. e32.
125. Frieden, M., Christensen, S.M., Mikkelsen, N.D., Rosenbohm, C., Thruue, C.A., Westergaard, M., Hansen, H.F., Orum, H., and Koch, T., *Expanding the design horizon of antisense oligonucleotides with alpha-L-LNA*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(21): p. 6365-72.
126. Arzumanov, A., Walsh, A.P., Rajwanshi, V.K., Kumar, R., Wengel, J., and Gait, M.J., *Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides*. *Biochemistry*, 2001. **40**(48): p. 14645-54.
127. Fluiter, K., ten Asbroek, A.L., de Wissel, M.B., Jakobs, M.E., Wissenbach, M., Olsson, H., Olsen, O., Oerum, H., and Baas, F., *In vivo tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(3): p. 953-62.
128. Piao, X., Yan, Y., Yan, J., and Guan, Y., *Enhanced recognition of non-complementary hybridization by single-LNA-modified oligonucleotide probes*. *Anal Bioanal Chem*, 2009. **394**(6): p. 1637-43.
129. Karkare, S. and Bhatnagar, D., *Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006. **71**(5): p. 575-86.
130. Thomsen, R., Nielsen, P.S., and Jensen, T.H., *Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes*. *Rna*, 2005. **11**(11): p. 1745-8.
131. Silahatoglu, A.N., Tommerup, N., and Vissing, H., *FISHing with locked nucleic acids (LNA): evaluation of different LNA/DNA mixmers*. *Mol Cell Probes*, 2003. **17**(4): p. 165-9.
132. Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., and Harada, H., *Improved in situ hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(8): p. 5311-7.
133. Priya, N.G., Pandey, N., and Rajagopal, R., *LNA probes substantially improve the detection of bacterial endosymbionts in whole mount of insects by fluorescent in-situ hybridization*. *BMC Microbiol*, 2012. **12**: p. 81.



134. Robertson, K.L. and Vora, G.J., *Locked Nucleic Acid and Flow Cytometry-Fluorescence In Situ Hybridization for the Detection of Bacterial Small Noncoding RNAs*. Applied and Environmental Microbiology, 2012. **78**(1): p. 14-20.
135. Robertson, K.L., Verhoeven, A.B., Thach, D.C., and Chang, E.L., *Monitoring viral RNA in infected cells with LNA flow-FISH*. Rna-a Publication of the Rna Society, 2010. **16**(8): p. 1679-1685.
136. Herzer, S., Silahatoglu, A., and Meister, B., *Locked nucleic acid-based in situ hybridisation reveals miR-7a as a hypothalamus-enriched microRNA with a distinct expression pattern*. J Neuroendocrinol, 2012. **24**(12): p. 1492-504.
137. Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., Horvitz, H.R., Kauppinen, S., and Plasterk, R.H., *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science, 2005. **309**(5732): p. 310-1.
138. Majlessi, M., Nelson, N.C., and Becker, M.M., *Advantages of 2'-O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(9): p. 2224-9.
139. Tsourkas, A., Behlke, M.A., and Bao, G., *Hybridization of 2'-O-methyl and 2'-deoxy molecular beacons to RNA and DNA targets*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(6): p. 5168-74.
140. Soe, M.J., Moller, T., Dufva, M., and Holmstrom, K., *A sensitive alternative for microRNA in situ hybridizations using probes of 2'-O-methyl RNA + LNA*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(7): p. 661-72.
141. Fontenete, S., Guimaraes, N., Leite, M., Figueiredo, C., Wengel, J., and Azevedo, N.F., *Hybridization-Based Detection of Helicobacter pylori at Human Body Temperature Using Advanced Locked Nucleic Acid (LNA) Probes*. Plos One, 2013. **8**(11): p. 11.
142. RNA Chemistry Laboratory - Institute of Bioorganic Chemistry, P.A.o.S., *LNA-2'OMeRNA/RNA Calculator*
143. Almeida, C., Azevedo, N.F., Santos, S., Keevil, C.W., and Vieira, M.J., *Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH)*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e14786.
144. Chen, C., Huang, S., Wu, Q.H., Li, R.Y., and Zhang, R.D., *[Factors affecting the DAPI fluorescence direct count in the tidal river sediment]*. Huan Jing Ke Xue, 2010. **31**(8): p. 1918-25.
145. Cerqueira, L., Oliveira, J.A., Nicolau, A., Azevedo, N.F., and Vieira, M.J., *Biofilm formation with mixed cultures of Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters*. Biofouling, 2013. **29**(7): p. 829-40.
146. Fletcher, M., Oppenheimer, S.R., and Warren, J.W., *Colonization of urinary catheters by Escherichia coli and Providencia stuartii in a laboratory model system*. J Urol, 1994. **152**(1): p. 232-6.
147. Liu, Y. and Li, J., *Role of Pseudomonas aeruginosa biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of Escherichia coli in porous media*. Environ Sci Technol, 2008. **42**(2): p. 443-9.
148. Azevedo, A.S., Almeida, C., Melo, L.F., and Azevedo, N.F., *Interaction between atypical microorganisms and E. coli in catheter-associated urinary tract biofilms*. submetido na Biofouling.
149. Christensen, B.B., Haagensen, J.A.J., Heydorn, A., and Molin, S., *Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(5): p. 2495-2502.
150. Madsen, J.S., Burmolle, M., Hansen, L.H., and Sorensen, S.J., *The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer*. Fems Immunology and Medical Microbiology, 2012. **65**(2): p. 183-195.
151. Pavlekovic, M., Schmid, M.C., Schmitter-Poignee, N., Spring, S., Pilhofer, M., Gaul, T., Fiandaca, M., Loffler, F.E., Jetten, M., Schleifer, K.H., and Lee, N.M., *Optimization of*

- three FISH procedures for in situ detection of anaerobic ammonium oxidizing bacteria in biological wastewater treatment.* J Microbiol Methods, 2009. **78**(2): p. 119-26.
152. Stoodley, P., Boyle, J.D., DeBeer, D., and Lappin-Scott, H.M., *Evolving perspectives of biofilm structure.* Biofouling, 1999. **14**(1): p. 75-90.
153. Elias, S. and Banin, E., *Multi-species biofilms: living with friendly neighbors.* FEMS Microbiology Reviews, 2012. **36**(5): p. 990-1004.