

Jailton Lobo da Costa Lima¹, Lilian Rodrigues Alves¹, Jussyêgles Niedja Pereira da Paz¹, Marcelle Aquino Rabelo¹, Maria Amélia Vieira Maciel¹, Marcia Maria Camargo de Morais²

Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica

Analysis of biofilm production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with ventilator-associated pneumonia

1. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco - Recife (PE), Brasil.

2. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco - Recife (PE), Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar fenotipicamente a produção de biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica.

Métodos: Foram analisados 20 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, sendo 19 provenientes de amostras clínicas de aspirado traqueal e uma de lavado broncoalveolar. A avaliação da capacidade de *P. aeruginosa* em produzir biofilme foi verificada por duas técnicas, sendo uma qualitativa e outra quantitativa.

Resultados: A técnica qualitativa mostrou que apenas 15% dos isolados foram considerados produtores de biofilme, enquanto que a quantitativa demonstrou que 75% dos isolados foram produtores de biofilme. Os isolados produtores de biofilme apresentaram o seguinte perfil de suscetibilidade: 53,3%

eram multidroga-resistentes e 46,7% eram multidroga-sensíveis.

Conclusão: A técnica quantitativa foi mais eficaz para detecção da produção de biofilme em comparação com a qualitativa. Para a população bacteriana analisada, a produção de biofilme independeu do perfil de suscetibilidade das bactérias, demonstrando que a falha terapêutica pode estar relacionada com a produção de biofilme, por impedir a destruição das bactérias presentes nesta estrutura, ocasionando complicações da pneumonia associada à ventilação mecânica, incluindo infecções extrapulmonares, e dificultando o tratamento da infecção.

Descritores: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilmes; Respiração artificial/efeitos adversos; Pneumonia associada à ventilação mecânica

Conflitos de interesse: Nenhum.

Submetido em 6 de fevereiro de 2017

Aceito em 13 de abril de 2017

Autor correspondente:

Jailton Lobo da Costa Lima
Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco
Avenida Prof. Moraes Rego, 1.235 - Cidade
Universitária
CEP: 50670-901 - Recife (PE), Brasil
E-mail: jailtonlobo@hotmail.com

Editor responsável: Felipe Dal Pizzol

DOI: 10.5935/0103-507X.20170039

INTRODUÇÃO

Pacientes com debilidade respiratória e metabólica utilizam a ventilação mecânica (VM), que é um método de ventilação artificial que garante a manutenção das trocas gasosas essenciais para o organismo, considerado um suporte terapêutico comumente utilizado nas unidades de terapia intensiva (UTI), mas que expõe os pacientes ao risco de adquirir pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM).⁽¹⁾ Sugere-se que o tubo traqueal atua como desencadeador da PAVM pela formação do biofilme na sua superfície, favorecendo a patogênese da infecção.⁽²⁾ Ainda, a interação microbiana dentro do biofilme pode contribuir para a patogênese da PAVM e exercer impacto na terapia antimicrobiana, aumentando as taxas de morbimortalidade associadas a esta infecção.⁽³⁾ Visando auxiliar na redução da formação do biofilme no tubo endotraqueal durante a VM e, conseqüentemente, reduzir a frequência da PAVM,

têm se empregado a descontaminação da microbiota oral e a redução das placas dentais, pois ambas são fontes potenciais para o desencadeamento da PAVM.^(4,5)

O diagnóstico de pneumonia é complexo. Os três principais componentes para a detecção da PAVM pelos critérios atuais são radiografia de tórax (obrigatório), sinais e sintomas (obrigatório) e exames laboratoriais (opcional). Ainda não há um padrão-ouro para o diagnóstico desta infecção, e a maioria das definições utilizadas não possui sensibilidade e nem especificidade suficientes para o estabelecimento deste diagnóstico.⁽⁶⁾ Os dados microbiológicos são empregados como uma tentativa de refinar a acurácia diagnóstica, por conta da baixa especificidade dos critérios clínicos isoladamente.⁽⁷⁾

Frequentemente, os patógenos causadores das PAVM de início precoce (diagnosticada até o quarto dia após o início do uso da VM) são de origem comunitária. Entre eles, podemos citar: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), ou enterobactérias suscetíveis aos antimicrobianos.^(8,9) As PAVM de início tardio (diagnosticada a partir do quinto dia após o início do uso da VM) são ocasionadas por patógenos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e outras bactérias Gram-negativas oportunistas resistentes, além de MRSA.⁽⁹⁾

P. aeruginosa é considerada atualmente o principal agente de PAVM em UTI, com média de aproximadamente 50% dos casos.^(10,11) As infecções ocasionadas por este microrganismo predominam em pacientes críticos e imunocomprometidos, estando associadas com a elevação da morbimortalidade dos pacientes nessas unidades, além do aumento dos casos de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos.^(12,13) Ainda que a PAVM seja a principal infecção relacionada à assistência à saúde ocasionada por este microrganismo, sua importância na etiologia de outras infecções, como infecções do trato urinário, sítio cirúrgico e, principalmente, sepse, também é valorizada.^(14,15)

A produção de biofilme pelos microrganismos causadores das PAVM torna a terapêutica antimicrobiana desta infecção ainda mais difícil, uma vez que o biofilme funciona como uma barreira, reduzindo a penetração destes fármacos e, conseqüentemente, impedindo que eles exerçam sua ação, além de impedirem o reconhecimento dos microrganismos pelo sistema imune do hospedeiro.⁽²⁾ Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente a produção de biofilme por isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes com PAVM.

MÉTODOS

Foram analisados 20 isolados clínicos de *P. aeruginosa* que estavam armazenados na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sendo 19 provenientes de amostras clínicas de aspirado traqueal e 1 de amostra de lavado broncoalveolar. Estes isolados foram coletados durante o período de novembro de 2012 a novembro de 2013 e estavam armazenados em estoque congelado a -20°C. A confirmação do diagnóstico da PAVM nos pacientes se deu por critérios clínicos e microbiológicos do hospital, obtidos da análise dos prontuários médicos dos pacientes, tendo sido o trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE, com registro CEP/CCS/UFPE número 009/11.

Os isolados foram previamente identificados e também tiveram a análise da suscetibilidade realizada pelo sistema automatizado (Phoenix - BD[®]), sendo considerados multidroga resistentes (MDR) os isolados com resistência a pelo menos três classes de fármacos a partir de uma variedade de classes de antimicrobianos (principalmente aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e fluoroquinolonas), e foram considerados multidroga sensíveis (MDS) os isolados que apresentaram resistência a duas ou menos classes de antimicrobianos.⁽¹⁶⁾ Posteriormente, foram encaminhados para o Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, onde foram mantidos congelados em glicerol a -20°C na bacterioteca. Estas bactérias foram reativadas em tubos de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), incubadas por 48 horas em estufa a 37°C e semeadas em ágar cetrimida, sendo posteriormente colocadas na estufa a 37°C por 24 horas para análises.

Caracterização fenotípica da produção de biofilme

Teste do ágar vermelho Congo

A avaliação da capacidade de *P. aeruginosa* em produzir cápsula como teste presuntivo para a formação de biofilme foi realizada pelo método de semeadura em ágar vermelho Congo seguindo o protocolo descrito em 1989.⁽¹⁷⁾ Neste teste, o corante vermelho Congo foi utilizado como indicador de pH, apresentando coloração preta em intervalos de pH entre 3,0 e 5,2. Placas com o meio ágar vermelho Congo, foram semeadas e incubadas em ambiente aeróbio por 24 - 48 horas a 37°C. Após este período, as colônias de cor vermelho escuro ou enegrecido, com consistência seca

ou cristalina, foram consideradas produtoras de biofilme; foram consideradas não produtoras as colônias vermelhas com aspecto liso e escurecido no centro. Foram utilizadas colônias de *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter sp.* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da UFPE como controles positivo e negativo, respectivamente. Foi utilizada ainda a cepa de referência *P. aeruginosa* (PA01) como controle positivo do teste, por esta cepa ser caracterizada como produtora de biofilme.

Ensaio da produção de biofilme

Foi realizado o ensaio de quantificação de biofilme utilizando técnica já descrita,⁽¹⁸⁾ com modificações, com o uso de caldo BHI e adição de sacarose 50g/L. Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37°C.

Para microtitulação foram aplicadas em placas de poliestireno, contendo 96 poços de fundo plano, 200µL das suspensões bacterianas, em triplicata, sendo utilizado como controle negativo o caldo BHI sem inóculo bacteriano e, como controle positivo, a cepa PA01 de *P. aeruginosa*, uma vez que esta cepa é preconizada como controle positivo para ensaios de biofilme. As placas foram então incubadas a 37°C durante 24 horas. Após este período, as suspensões bacterianas foram removidas, e cada poço foi lavado por três vezes com 250µL de solução fisiológica (0,9% NaCl) estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200µL de metanol p.a. (pureza absoluta) por 15 minutos. O metanol foi removido; as placas foram deixadas em temperatura ambiente para secar e coradas com 200µL de solução de cristal violeta durante 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente. Após este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570nm, e as amostras foram classificadas segundo Stanovic et al.⁽¹⁸⁾ O valor das densidades óticas para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das densidades óticas (DO) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c . As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente se $DO_i \leq DO_c$; fracamente aderente (+) se $DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$; moderadamente aderente (++) se $2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$; ou fortemente aderente (+++) se $4 \times DO_c < DO_i$.

RESULTADOS

Teste do ágar vermelho Congo

O teste do ágar vermelho Congo mostrou baixa positividade na detecção presuntiva da produção de biofilme em 15% dos isolados de *P. aeruginosa* analisados, sendo os três isolados MDS.

Ensaio da produção de biofilme

As análises de quantificação de biofilme demonstraram que 75% dos isolados foram produtores de biofilme, indicando ser esta uma técnica mais eficaz para detecção da produção de biofilme quando comparada com a do ágar vermelho Congo. Os isolados clínicos deste estudo apresentaram o seguinte resultado quanto às categorias de produção de biofilme: 25% eram não aderentes, 40% fracamente aderentes, 25% moderadamente aderentes e 10% fortemente aderentes.

Dos três isolados considerados produtores de biofilme pela técnica do ágar vermelho Congo, dois também foram produtores de biofilme pela técnica de quantificação. A tabela 1 apresenta a relação entre o perfil de aderência encontrado nos isolados de *P. aeruginosa* analisados e o perfil de suscetibilidade. Na tabela 2, é possível observar o resumo dos resultados encontrados neste estudo, tipo de amostra analisada, perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos, bem como os resultados obtidos dos testes de detecção do biofilme.

Tabela 1 - Perfil de aderência versus de suscetibilidade dos isolados clínicos

Perfil de aderência	Multidroga resistente	Multidroga sensível
Não aderente	2	3
Fracamente aderente	4	4
Moderadamente aderente	4	1
Fortemente aderente	0	2
Total	10	10

DISCUSSÃO

É escasso o número de trabalhos que avaliam a eficácia do teste do ágar vermelho Congo para *P. aeruginosa*. Estudo⁽¹⁹⁾ analisou a formação de biofilme por meio da técnica do ágar vermelho Congo em cepas de *S. aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis* (amostra clínica) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853), enquanto outro⁽²⁰⁾ verificou a capacidade de cepas de *S. aureus* (ATCC 25923)

Tabela 2 - Perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos *versus* produção de biofilme

Isolado	Amostra	Perfil de resistência	Multidroga resistente	Ágar vermelho Congo	Quantificação do biofilme
P3AM	Secreção traqueal	Imipenem	Não	Positivo	Não aderente
P8AM	Secreção traqueal	Amicacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem e meropenem	Sim	Negativo	Fracamente aderente
P9AM	Lavado broncoalveolar	Sem resistência	Não	Positivo	Fracamente aderente
P13AM	Secreção traqueal	Aztreonam, imipenem, meropenem	Não	Positivo	Fracamente aderente
P22AM	Secreção traqueal	Ciprofloxacina e levofloxacina	Não	Negativo	Não aderente
P23AM	Secreção traqueal	Sem resistência	Não	Negativo	Fracamente aderente
P24AM	Secreção traqueal	Sem resistência	Não	Negativo	Fortemente aderente
P25AM	Secreção traqueal	Gentamicina, aztreonam, ciprofloxacina, levofloxacina e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Moderadamente aderente
P28AM	Secreção traqueal	Amicacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Moderadamente aderente
P29AM	Secreção traqueal	Sem resistência	Não	Negativo	Fortemente aderente
P32AM	Secreção traqueal	Gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Moderadamente aderente
P30HC	Secreção traqueal	Amicacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Não aderente
P35HC	Secreção traqueal	Aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, imipenem e meropenem	Sim	Negativo	Fracamente aderente
P41HC	Secreção traqueal	Aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Fracamente aderente
P61HC	Secreção traqueal	Amicacina e ciprofloxacina	Não	Negativo	Moderadamente aderente
P73HC	Secreção traqueal	Amicacina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Não aderente
P123HC	Secreção traqueal	Amicacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, imipenem e meropenem	Sim	Negativo	Moderadamente aderente
P125HC	Secreção traqueal	Ceftazidima	Não	Negativo	Não aderente
P129HC	Secreção traqueal	Piperacilina-tazobactam	Não	Negativo	Fracamente aderente
P131HC	Secreção traqueal	Amicacina, gentamicina, tobramicina, aztreonam, ceftazidima, cefepim, ciprofloxacina, levofloxacina, imipenem, meropenem e piperacilina-tazobactam	Sim	Negativo	Fracamente aderente

e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) produzirem biofilme por esta técnica; em ambos, todas as cepas analisadas foram consideradas produtoras de biofilme. Estudo⁽²¹⁾ que avaliou a formação de biofilme em 30 isolados clínicos de *P. aeruginosa* utilizando este método identificou 27 como produtores de biofilme.

Ainda que o teste do ágar vermelho Congo seja vastamente utilizado em estudos com biofilme, principalmente com *Staphylococcus* spp., não se sabe ao certo qual o mecanismo específico da resposta envolvida neste método. Apesar disto, alguns dados indicam que a reação positiva, evidenciada pelo escurecimento da colônia produtora de biofilme, decorreria da constituição polissacarídica da matriz extracelular do biofilme, cuja produção é intensificada pelo suplemento nutricional do meio.⁽¹⁷⁾

Em estudos realizados com este método, foi detectada uma associação entre a produção de polissacarídeo com a reação positiva no teste de ágar vermelho Congo em espécie de *S. epidermidis* produtora de biofilme e que possuía genes do *Operon ica*, sendo esta associação também observada em outras espécies do gênero *Staphylococcus* produtoras de biofilme que possuem genes homólogos aos do *Operon ica* de *S. epidermidis* (*S. aureus*; *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus*).^(22,23) Ainda, foram observadas positividade neste teste para outros gêneros/espécies bacterianos produtores de biofilme que possuíam genes ortólogos aos do *Operon ica*, como *Actinobacillus pleuropneumoniae*,⁽²⁴⁾ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,⁽²⁵⁾ *Bordetella*,⁽²⁶⁾ *Escherichia coli*⁽²⁷⁾ e *Yersinia pestis*.⁽²⁸⁾

Neste estudo, não foi possível observar a relação entre a produção da matriz extracelular do biofilme de *P. aeruginosa*, de constituição predominantemente polissacarídica (alginato), com a positividade do teste do ágar vermelho Congo, uma vez que mesmo a cepa de *P. aeruginosa* PA01, que é um controle positivo para testes de produção de biofilme, não apresentou positividade neste teste, o que demonstra que este teste não é eficaz para detecção presumida da formação de biofilme para esta espécie bacteriana. A ausência de positividade no teste vermelho Congo pode estar relacionada com a deficiência do gene *pel*, responsável pela produção da matriz extracelular rica em glicose, capaz de se ligar ao vermelho Congo e gerar a reação que modifica a coloração das colônias produtoras de biofilme, uma vez que foi visto que nenhuma matriz extracelular foi produzida pelos isolados de *P. aeruginosa* mutantes, que não apresentavam o gene *pel*, provocando, desta forma, a ausência de positividade no teste do ágar vermelho Congo.⁽²⁹⁾

O teste de quantificação do biofilme mostrou-se eficaz na detecção da produção do biofilme pelos isolados clínicos provenientes de pacientes com PAVM e também foi apto para constatar a produção de biofilme pela cepa de *P. aeruginosa* PA01, utilizada como controle positivo do teste. Dados similares foram registrados na literatura,⁽³⁰⁾ que verificou uma produção de biofilme de 68% (50/74) em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, sendo distribuídos nas seguintes categorias: 96% fracamente aderentes e 4% moderadamente aderentes.

Neste estudo, os isolados classificados como produtores de biofilme apresentaram o seguinte perfil de suscetibilidade: 53,3% eram MDR e 46,7% eram MDS. Devido ao pequeno número amostral, não foi realizada a análise estatística para avaliar a diferença entre os resultados dos isolados MDR e MDS, embora tenha ocorrido uma maior produção de biofilme em isolados MDR, corroborando dados já encontrados,⁽³⁰⁾ no qual os isolados de *P. aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamases (M β L) produziram biofilme. Estes resultados também são semelhantes a outros da literatura,⁽³¹⁾ que realtaram a produção de biofilme de 93,4% (85/91), sendo 60% fracamente aderentes, 25,9% moderadamente aderentes e 14,1% fortemente aderentes.

Os dados obtidos neste estudo mostraram que, para a população bacteriana estudada, a produção de biofilme independe do perfil de suscetibilidade das bactérias. Pode-se sugerir que a produção de biofilme pode estar relacionada com a falha da terapia empírica, por dificultar a penetração dos antimicrobianos nesta estrutura, impedindo que eles consigam eliminar as bactérias presentes no biofilme,

acarretando complicações da PAVM nos pacientes, incluindo infecções extrapulmonares, e dificultando o tratamento da infecção. Este aspecto é bastante importante, pois, dentro do mesmo hospital, os esquemas empíricos para tratamento da PAVM podem diferir de acordo com os agentes etiológicos circulantes e os respectivos perfis de suscetibilidade. Sugerimos, ainda, que os protocolos terapêuticos da PAVM sejam revisados de modo sistemático, para o sucesso do tratamento e para minimizar a pressão seletiva de microrganismos resistentes.⁽³²⁾

A formação do biofilme no tubo endotraqueal de pacientes com PAVM ocasiona o prolongamento deste quadro, além de provocar a disseminação da infecção para outras regiões do trato respiratório proximal, resultando no aumento do uso de antimicrobianos para tentar controlar a infecção, embora, na maioria dos casos, esta terapia não apresente sucesso, pela redução da penetração dos antimicrobianos provocada pela formação do biofilme. Quanto maior o grau de aderência do biofilme, menor será a penetração do antimicrobiano em sua estrutura, levando a uma pressão seletiva nas células ali presentes, que resultará no aumento da resistência desta bactéria, por esse e/ou outros mecanismos de resistência.⁽³³⁾

Neste estudo a técnica qualitativa mostrou que apenas 15% dos isolados foram considerados produtores de biofilme, enquanto que a técnica quantitativa do biofilme demonstrou que 75% dos isolados foram produtores de biofilme, indicando ser uma técnica mais eficaz para detecção da produção de biofilme em comparação com a técnica qualitativa. Houve ainda elevada produção de biofilme pelos isolados clínicos de *P. aeruginosa* avaliados.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou a maior detecção da produção de biofilme por isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica por meio da técnica quantitativa, que foi mais eficaz em comparação à técnica qualitativa. Além disto, para o microrganismo avaliado neste estudo, a produção de biofilme independeu do perfil de suscetibilidade das bactérias. Estudos sobre a produção de biofilme por *P. aeruginosa* ainda são escassos no Brasil, não havendo relatos sobre a produção de biofilme por esta bactéria relacionada à pneumonia associada à ventilação mecânica no país. São necessários novos estudos, com um maior número de isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica, para elucidar a dinâmica desta infecção e a formação de biofilme por este microrganismo, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação

de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

ABSTRACT

Objective: To phenotypically evaluate biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* clinically isolated from patients with ventilator-associated pneumonia.

Methods: Twenty clinical isolates of *P. aeruginosa* were analyzed, 19 of which were from clinical samples of tracheal aspirate, and one was from a bronchoalveolar lavage sample. The evaluation of the capacity of *P. aeruginosa* to produce biofilm was verified using two techniques, one qualitative and the other quantitative.

Results: The qualitative technique showed that only 15% of the isolates were considered biofilm producers, while the quantitative technique showed that 75% of the isolates were biofilm producers. The biofilm isolates presented the following susceptibility profile: 53.3% were multidrug-resistant, and 46.7% were multidrug-sensitive.

Conclusion: The quantitative technique was more effective than the qualitative technique for the detection of biofilm production. For the bacterial population analyzed, biofilm production was independent of the susceptibility profile of the bacteria, demonstrating that the therapeutic failure could be related to biofilm production, as it prevented the destruction of the bacteria present in this structure, causing complications of pneumonia associated with mechanical ventilation, including extrapulmonary infections, and making it difficult to treat the infection.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms; Respiration, artificial/adverse effects; Pneumonia, ventilator-associated

REFERÊNCIAS

- Silva SG, Nascimento ER, Salles RK. Pneumonia associada à ventilação mecânica: discursos de profissionais acerca da prevenção. Esc Anna Nery Rev Enferm. 2014;18(2):290-5.
- Gil-Perotin S, Ramirez P, Marti V, Sahuquillo JM, Gonzalez E, Calleja I, et al. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. Crit Care. 2012;16(3):R93.
- Rodrigues ME, Lopes SP, Pereira CR, Azevedo NF, Lourenço A, Henriques M, et al. Polymicrobial ventilator-associated pneumonia: fighting in vitro *Candida albicans*-*Pseudomonas aeruginosa* biofilms with antifungal-antibacterial combination therapy. PLoS One. 2017;12(1):e0170433.
- Santos PS, Mariano M, Kallas MS, Vilela MC. Impact of tongue biofilm removal on mechanically ventilated patients. Rev Bras Ter Intensiva. 2013;25(1):44-8.
- Sands KM, Wilson MJ, Lewis MA, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, et al. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. J Crit Care. 2017;37:30-7.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Critérios diagnósticos de infecção relacionada à assistência à saúde. 2a ed. Brasília, DF: ANVISA; 2017. (Série Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde). Disponível em: <<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/criterios-diagnosticos-das-infecoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude>>. Acesso em: 11 abr. 2017.
- Restrepo MI, Peterson J, Fernandez JF, Qin Z, Fisher AC, Nicholson SC. Comparison of the bacterial etiology of early-onset and late-onset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies. Respir Care. 2013;58(7):1220-5.
- Dalmora CH, Deutschendorf C, Nagel F, Santos RP, Lisboa T. Defining ventilator-associated pneumonia: a (de)construction concept. Rev Bras Ter Intensiva. 2013;25(2):81-6.
- Amaral SM, Cortês AQ, Pires FR. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. J Bras Pneumol. 2009;35(11):1116-24.
- Bhat S, Fujitani S, Potoski BA, Capitano B, Linden PK, Shutt K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the intensive care unit: can the adequacy of empirical beta-lactam antibiotic therapy be improved? Int J Antimicrob Agents. 2007;30(5):458-62.
- Cezário RC, Duarte De Morais L, Ferreira JC, Costa-Pinto RM, da Costa Darini AL, Gontijo-Filho PP. Nosocomial outbreak by imipenem-resistant metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an adult intensive care unit in a Brazilian teaching hospital. Enferm Infecç Microbiol Clin. 2009;27(5):269-74.
- Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, Cook D, Dodek P, Day AG, Heyland DK; Canadian Critical Care Trials Group. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. J Crit Care. 2008;23(1):18-26.
- Furtado GH, Bergamasco MD, Menezes FG, Marques D, Silva A, Perdiz LB, et al. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection at a medical-surgical intensive care unit: risk factors and mortality. J Crit Care. 2009;24(4):625.e9-14.
- Lautenbach E, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Sheridan A, Fishman NO. Imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk factors for infection and impact of resistance on clinical and economic outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol. 2006;27(9):893-900.
- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect. 2009;73(4):338-44.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81.

17. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42(8):872-4.
18. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40(2):175-9.
19. Locatelli CI, Englert GE, Kwitko S, Simonetti AB. In vitro bacterial adherence to silicone and polymethylmethacrylate intraocular lenses. *Arq Bras Oftalmol.* 2004;67(2):241-8.
20. Freitas VR, van der Sand ST, Simonetti AB. In vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* on the surface of high-speed dental handpieces. *Rev Odontol UNESP.* 2010;39(4):193-200.
21. Rewatkar AR, Wadher BJ. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci.* 2013;8(5):36-40.
22. Allignet J, Aubert S, Dyke KG, El Solh N. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect Immun.* 2001;69(2):712-8.
23. Rohde H, Frankenberger S, Zähringer U, Mack D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol.* 2010;89(1):103-11.
24. Izano EA, Sadovskaya I, Vinogradov E, Mulks MH, Velliyagounder K, Rangunath C, et al. Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog.* 2007;43(1):1-9.
25. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(2):470-6.
26. Parise G, Mishra M, Itoh Y, Romeo T, Deora R. Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol.* 2007;189(3):750-60.
27. Wang X, Preston JF 3rd, Romeo T. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2004;186(9):2724-34.
28. Yoong P, Cywes-Bentley C, Pier GB. Poly-N-acetylglucosamine expression by wild-type *Yersinia pestis* is maximal at mammalian, not flea, temperatures. *MBio.* 2012;3(4):e00217-12.
29. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol.* 2004;51(3):675-90.
30. Perez LR, Costa MC, Freitas AL, Barth AL. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Braz J Microbiol.* 2011;42(2):476-9.
31. Perez LR, Machado AB, Barth AL. The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Curr Microbiol.* 2013;66(4):418-20.
32. Costa JB, Costa AL, Torres F, Silva AF, Terra Jr AT. Os principais fatores de risco da pneumonia associada à ventilação mecânica em UTI adulta. *Rev Cient FAEMA.* 2016;7(1):80-92.
33. Sousa AM, Pereira MO. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs - A review. *Pathogens.* 2014;3(3):680-703.