



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL

MÁRIO JÂNIO MAIA NERY JÚNIOR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ULTRASSOM
TERAPÊUTICO *IN VITRO*

Rio Branco – AC
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL

MÁRIO JÂNIO MAIA NERY JÚNIOR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO ULTRASSOM
TERAPÊUTICO *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Na Amazônia Ocidental – MECS, em
Nível de Mestrado.

Orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Maggi.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciana Medeiros.

Rio Branco – AC

2019

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.”

Isaías 41:10

DEDICATÓRIA

Á DEUS, por ser a minha maior fortaleza e a coluna vertebral da minha vida, me sustentando nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu Avô Waldir Torquato de Sousa (*in memoriam*), por ser meu exemplo de homem, marido, pai e avô, e que se estivesse entre nós estaria tão feliz quanto eu, por essa conquista única. Vô essa é pra você.

AGRADECIMENTOS

O sucesso de um trabalho como esse, se deve ao esforço coletivo de pessoas que com um valor inestimável, que colaboraram de forma direta me ajudando com técnicas e experimentos, e de forma indireta me dando apoio e me incentivando a continuar na árdua caminhada da pós-graduação. Meus eternos agradecimentos:

À minha mãe Mariluce Torquato, pelo apoio de sempre e por me fazer acreditar que a educação, é sem sombra dúvidas o melhor caminho para o êxito. Meu eterno exemplo de docência.

Ao meu pai Jânio Maia, por acreditar no meu sucesso por muitas vezes, até mais que eu, e por nunca medir esforços para me manter em todos os sentidos. Pai essa vitória é tão minha, quanto sua.

Aos meus irmãos Maria Eduarda e João Miguel, por serem os maiores amores de minha vida, e por me fazerem sempre buscar melhorias para nossa família.

A toda a minha Família, que de forma direta ou indireta me deram apoio, e confiaram no meu esforço.

Ao meu namorado Altemar Júnior, por ser meu companheiro e amigo, e por acreditar comigo na realização desse sonho. Pela paciência, pela ajuda, pelo amor, pelo companheirismo e por ter sido tão compreensível em tantos momentos de ausência. Amo você.

A minha sogra Branca Oliveira, por ser tão generosa e compreensível comigo, sempre me incentivando e me encorajando a continuar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Maggi, por ter me acolhido em um momento tão delicado do meu mestrado, e por nunca ter me negado nenhuma ajuda e orientação mesmo de longe.

A minha Co-orientadora Prof. Dra. Luciana Medeiros, minha orientadora do coração, me adotou e me acolheu tão bem em sua equipe de trabalho, cedendo laboratório, material para a minha pesquisa, além de partilhar de conhecimentos científicos e de vida que levarei para toda a minha trajetória.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia aplicada a Medicina Veterinária, por fazerem valer o real sentido da palavra equipe, por toda a ajuda disponibilizada, e por não medirem esforços para que meus experimentos dessem certo.

A Universidade Federal do Acre – UFAC, por nos fornecer programas de pós-graduação, e nos oferecer o melhor corpo docente.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental, por todas as informações, conhecimentos e práticas adquiridas no decorrer do mestrado.

A todos os meus professores, desde minha formação nos ensinos infantil, fundamental, médio, superior até o mestrado, fazendo de mim um homem e um cidadão melhor, que acredita na força que a educação tem.

A União Educacional Meta – UNIMETA, pela valorização profissional, pelos insumos liberados, e por todas as vezes que precisei me ausentar e fui compreendido.

A minha coordenadora e amiga Prof. Dra. Mariane Arnoldi, pela compreensão, e por acreditar que posso ser um profissional melhor.

Ao meu amigo Prof. Dr. Ildercílio Motta, pela ajuda na tabulação de dados estatísticos, e pelo apoio imensurável de sempre.

Á minha aluna Camila Mello, pela ajuda nas partes finais dos experimentos e por confiar a mim o espelho de um profissional.

A todos os meus amigos, que contribuíram e torceram por mim durante esses dois anos de dedicação ao mestrado.

OBRIGADO!

RESUMO

INTRODUÇÃO: As infecções causadas por bactérias são consideradas um grave problema de saúde pública, uma vez que configuram várias doenças, principalmente aquelas adquiridas em âmbito hospitalar, algumas multidrogarresistentes.

OBJETIVO: Avaliar o potencial do ultrassom como alternativa terapêutica em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*.

MATERIAL E MÉTODO: Neste estudo foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram preparadas suspensões planctônicas, confrontadas com ondas de ultrassom nas frequências de exposição de 1MHz e 3 MHz em quatro tempos diferentes (5, 10, 15 e 20 minutos), e após o tratamento contadas a Unidades Formadoras de Colônias (UFC's) pela técnica de gotejamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: Ao analisar a atividade bacteriana frente às diferentes diluições, observou-se que nos diferentes tempos e frequências houve crescimento bacteriano ao invés de morte, quando comparado ao controle, indicando que o ultrassom favoreceu o crescimento nas estirpes testadas, à medida que a exposição aumentava.

CONCLUSÃO: Conclui-se que de serem necessários mais estudos correlacionando infecções cutâneas e ultrassom terapêutico, é preciso que se entenda melhor como funciona a ação mecânica e química do ultrassom quando utilizado sozinho como forma de tratamento.

Palavras Chaves: Ultrassom, Bactérias e resistência bacteriana.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Infections caused by bacteria are considered a serious public health problem, since they constitute several diseases, mainly those acquired in the hospital scope, some multidrug resistant. **OBJECTIVE:** To evaluate the potential of ultrasound as a therapeutic alternative in strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. **MATERIALS AND METHODS:** *Staphylococcus aureus* strains ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used in this study. Plankton suspensions were prepared with ultrasound waves at the 1MHz and 3 MHz exposure frequencies at four different times (5, 10, 15 and 20 minutes), and after the treatment counted to Colony Forming Units (CFUs) by the drip technique. **RESULTS AND DISCUSSION:** When analyzing the bacterial activity against the different dilutions, it was observed that in the different times and frequencies there was bacterial growth instead of death, when compared to the control, indicating that the ultrasound favored the growth in the strains tested, as the exposure increased. **CONCLUSION:** It is concluded that if more studies are needed to correlate cutaneous infections and therapeutic ultrasound, it is necessary to understand better how the mechanical and chemical action of ultrasound works when used alone as a form of treatment.

Keywords: Ultrasound, Bacteria and bacterial resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Histórico de resistência a *S. aureus* ao longo de alguns anos.....16

Figura 02: Representação em Gráfico dos resultados obtidos a partir da avaliação do crescimento relativo para as linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes tempos e frequências. A) *S. aureus* na frequência de 3 MHz; B) *S. aureus* na frequência de 1 MHz; C) *E. coli* na frequência de 3 MHz; D) *E. coli* na frequência de 1 MHz26

Figura 03: Representação gráfica dos resultados de Crescimento Relativo para as diferentes linhagens de 1 e 3 MHz no tempos de exposição de 5', 10', 15' e 20'28

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Dados brutos, bem como o valor médio e desvio padrão, referentes ao ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, para *S. aureus* e *E. coli*, submetidos a tratamento com ultrassom nas frequências de 1 e 3 MHz, nos tempos de 5', 10', 15' e 20' de exposição.....28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	EPIDEMIOLOGIA DE INFECÇÕES BACTERIANAS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	14
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	15
2.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	17
2.4	ULTRASSOM TERAPÊUTICO.....	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	GERAL.....	19
3.2	ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	INOCULAÇÃO DE <i>S. AUREUS</i> E <i>E. COLI</i>	20
4.2	EXPOSIÇÃO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO AS SUSPENSÕES PLANCTÔNICAS	20
4.3	DILUIÇÃO DAS SUSPENSÕES PLANCTÔNICAS	21
4.4	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS NAS SUSPENSÕES PLANCTÔNICAS	21
4.5	ESPECIFICAÇÕES DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO	21
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO.....	30
7	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por bactérias são consideradas um grave problema de saúde pública, uma vez que configuram várias doenças, principalmente aquelas adquiridas em âmbito hospitalar, algumas multidrogarresistentes (DOMINGUEZ et al., 2018).

Em 1928, a penicilina foi descoberta como um composto capaz combater infecções bacterianas, sendo classificado como um betalactâmico, ou seja, atuando em nível de parede celular impedindo a síntese da mesma (GUO et al., 2015). Neste contexto, este composto passou a ser produzido em larga escala, salvando a vida de milhares de soldados durante a segunda guerra mundial (ZENG et al., 2019). Entretanto, após cerca de dois anos, foi observado o surgimento de resistência por algumas estirpes bacterianas. Essa resistência está intimamente associada, com o surgimento de uma enzima chamada penicilase que impede a ação desse antibiótico (CABOT et al., 2018).

Com o passar dos anos, surgiram novos betalactâmicos como as cefalosporinas e os carbapenens, todavia, após certo tempo alguns gêneros e espécies bacterianas, passaram a apresentar determinado grau de resistência aos antibióticos, principalmente em âmbito hospitalar (LEE et al., 2018). Diversos são os mecanismos associados aos processos de resistência, tais como: hiperexpressão cromossômica, bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana externa em bactérias gram negativas e diversos mecanismos enzimáticos (SILVA; LINCOPAN, 2012).

Com a necessidade de se evitar mais infecções por microrganismos resistentes, surgiram novos medicamentos, como a vancomicina. Entretanto, como já era esperado, novas estirpes resistentes a este antimicrobiano como por exemplo, a *Staphylococcus aureus* Vancomicina Resistente (VRSA) (ICGEN, 2016). Neste caso, a resistência está associada a um gene chamado de VanA, presente em um plasmídeo, estrutura essa que está associada a grande maioria dos quadros de resistência (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

Um estudo realizado dentro de um hospital no norte de Minas Gerais em 2013 revelou que as enterobactérias como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Serratia* spp eram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos dos grupos dos

aminoglicosídeos, e/ou fluoroquinolonas e/ou cefalosporinas de 3ª e 4ª geração. Adicionalmente, os pesquisadores também detectaram que um dos microrganismos gram negativos não fermentadores, a *Pseudomonas aeruginosa*, apresentou resistência completa ou intermediária ao imipenem e/ou meropenem (CROUCHER et al., 2013).

Com isso em mente, vê-se que a descoberta e/ou uso de novas abordagens terapêuticas para auxiliar ou até substituir a antibioticoterapia é de extrema importância. Neste caso, o uso ultrassom pode ser um caminho alternativo, visto que em estudos prévios este se mostrou eficaz na eliminação de bactérias, embora haja uma variação quanto ao seu efeito sobre as bactérias gram positivas e negativas (LIU et al., 2016).

O ultrassom é um aparelho que emite vibrações mecânicas no organismo, não audível ao ouvido humano (SKOWRONEK et al., 2016). Essas vibrações são capazes de gerar resultados terapêuticos, seja por sua ação mecânica ou efeito térmico; a quantidade de calor depende de alguns fatores (SPRATT; LEVINE; TILLMAN, 2014).

Dentre esses fatores entram: o regime de emissão (contínuo/pulsado); a intensidade, que é a energia necessária para a sua penetração no tecido; a frequência que está relacionada com a profundidade que a energia pode alcançar, levando em consideração que quanto mais alta for a frequência, mais superficial será a penetração; e a duração do tratamento, que não pode exceder 30 minutos, a fim de não danificar o aparelho e queimar o paciente (NINOMIYA et al., 2014).

O uso do ultrassom como terapia alternativa para infecções bacterianas já é descrito na literatura científica, por Rodriguez-Molares et al. (2014) que utilizaram gentamicina e exposição ultrassônica com um transdutor customizado com alta intensidade de calor, mostrando que a viabilidade da *Escherichia coli* em biofilmes, diminui significativamente (RODRIGUEZ-MOLARES et al., 2014).

Já em outro estudo com cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se que a associação do ultrassom com antibiótico não diferiu significativamente do tratamento isolado com o medicamento (CARMEN et al., 2005). Acredita-se que ondas de ultrassom produzem danos a parede celular, e devido, ao aquecimento, também levam à produção de radicais livres, os quais causam danos ao DNA da bactéria (GIANNAKIS et al., 2015).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia de Infecções bacterianas e Mecanismos de resistência

As infecções bacterianas se tornaram um grave problema de saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar, uma vez que a pressão seletiva e a exposição são maiores nesses lugares (CABOT et al., 2018). Para que processos infecciosos nosocomiais aconteçam, vários fatores precisam ser levados em consideração como condições clínicas do paciente (estado imunológico, idade e peso) e procedimentos médicos (cirurgias, cateterismo ou terapia imunossupressora) (DOMINGUEZ et al., 2018).

Os principais patógenos associados a esses tipos de infecções são dos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* ((DEGUCHI et al., 2018). A grande maioria resistente a múltiplos antibióticos utilizados na prática clínica, como as penicilinas e cefalosporinas, ambos betalactâmicos que agem inibindo a síntese de parede celular (CROUCHER et al., 2013).

Em um estudo realizado por Hyde et al. (2014), verificou-se a mortalidade em neonatos por meningite bacteriana no Reino Unido e Irlanda de julho de 2010 a julho de 2011; observou a forte presença de *Streptococcus* do grupo B (9%) e *Escherichia coli* (14%), como principais agentes etiológicos, sendo responsável pela grande maioria dos casos de internação, ficando à frente até da *Neisseria meningitidis* (8%) principal etiologia descrita na literatura até a década passada (HYDE et al., 2014).

Vale lembrar que o desenvolvimento de múltiplos genes trocados entre várias cepas levaram a um cenário preocupante de resistência a antibioticoterapia, com consequente desenvolvimento de infecções com um grau virulência aumentado como as septicemias, endocardites, infecções respiratórias e urinárias (ZENG et al., 2019)

A síntese de enzimas para a degradação de antimicrobianos é o mecanismo mais utilizado pelas bactérias, uma vez que essa resistência pode ser mediada por plasmídeos ou instalada no cromossomo bacteriano (CABOT et al., 2018). O uso dos Betalactâmicos na prática clínica é significativo, já que são drogas com baixa toxicidade seletiva, entretanto a alta exposição das bactérias a essa classe, fez com

que elas aumentassem sua pressão seletiva, com *posteriori* resistência relacionados a hidrólise principalmente de cefalosporinas e penicilinas pelas B-lactamases (DEGUCHI et al., 2018)

Dentre outros mecanismos utilizados pelas as bactérias, destaca-se a alteração do sítio do Antimicrobiano, sendo descrito principalmente pela *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina que desenvolveu o gene Mec A, com consequente produção de proteínas que inibem a ligação de penicilinas a parede celular (LISTER; HORSWILL, 2014). Basicamente o efeito de morte ou inibição de crescimento bacteriano não acontece, tendo em vista que o local alvo do antibiótico foi alterado. Esse é um mecanismo de resistência bastante utilizado pelas bactérias junto ao mecanismo enzimático (RANJBAR et al., 2018).

O bombeamento ativo do antibiótico para fora da célula bacteriana, também é um importante processo, já que tem produzido resistência em vários microrganismos como na *E. coli* resistente as tetraciclinas, ou a *Pseudomonas* spp resistente a fluoquinolonas (LOUREIRO et al., 2016).

As bombas de efluxo exercem um papel importante sobre as bactérias gram negativas, principalmente da família de Resistência de Nodulação Familiar (RND), que estão associados não só a resistência, mas também a patogenicidade, virulência e formação de biofilmes (CUNRATH et al., 2019). Adicionalmente, várias bombas são capazes de transportar mais de uma classe de antibióticos chamadas de Resistência a Múltiplas Drogas (MDR) (BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014).

Outro mecanismo bastante expressivo em bactérias gram negativas é o aumento da permeabilidade da membrana externa, visto que essa estrutura está presente somente nesses microrganismos (CHUPPAVA et al., 2018), proteínas especiais (porinas) estão na membrana externa de Lipopolissacarídeos (LPS's) e a sua alteração favorece a entrada de antimicrobianos para o interior da célula, chegando até o espaço periplasmático, e consequente entrada no interior da bactéria (GUO et al., 2015).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram positiva, presente na microbiota normal do corpo humano, que em diversas situações se apresenta como um

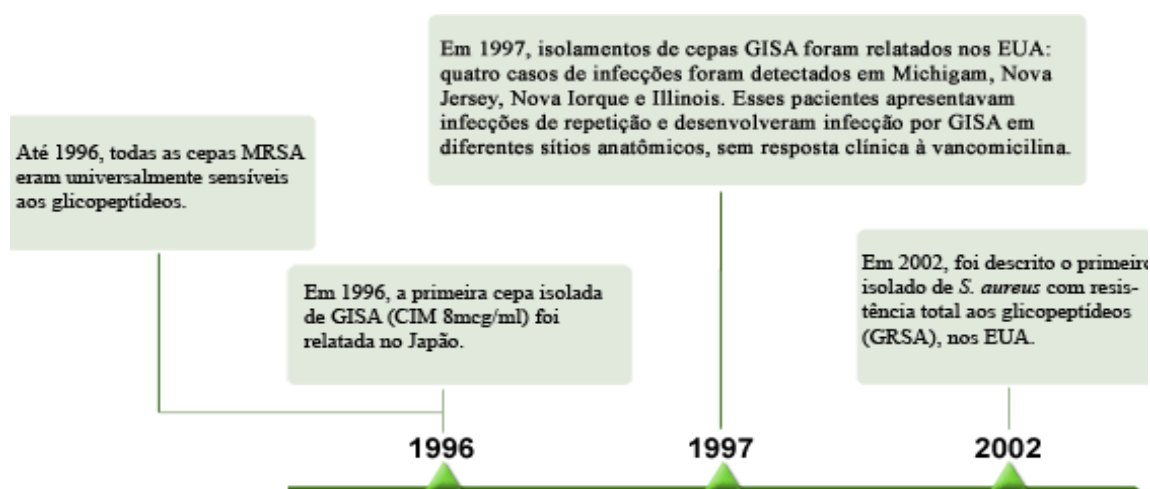
microrganismo oportunista tanto na comunidade como no ambiente hospitalar (LISTER; HORSWILL, 2014).

Esse patógeno está associado principalmente a infecções de pele, como celulite infecciosa, impetigo e foliculite, podendo ocorrer a disseminação em diversos tecidos, levando a episódios graves de bacteriemia, pneumonia, endocardite e pericardite (YANG et al., 2018)

A resistência de *S. aureus* a antibioticoterapia é conhecida desde meados da década de 60, quando algumas cepas apresentaram resistência a meticilina (MRSA), pelo desenvolvimento de uma Beta-lactamase, chamada de penicilinases (GERIAK et al., 2019). Neste caso foi, necessário o uso de outra classe de antibióticos chamada glicopeptídeos, como a vancomicina que age inibindo a síntese de peptidoglicano na parede celular (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

Os mesmos autores ainda citam que esse modelo terapêutico utilizando vancomicina começou a apresentar falhas em 2002 nos Estados Unidos, com cepas totalmente resistentes, com nomenclatura estabelecida como *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) (MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017). Infelizmente infecções com essas manifestações possuem desfechos clínicos ruins, geralmente levando ao óbito do paciente (ALMAKKI et al., 2019). A figura 1 demonstra um breve histórico de resistência da *S. aureus* no decorrer do tempo.

Figura 1: Histórico de resistência da *S. aureus* ao longo de alguns anos.



Fonte: ANVISA

2.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo gram negativo, fermentador de lactose, que faz parte da família das Enterobactérias, e que causa preferencialmente infecções gastrintestinais e urinárias (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Esse patógeno está envolvido em mais de 90% dos casos de infecções urinárias em mulheres, em idade adulta e preferencialmente em vida sexual ativa, através do sorotipo uropatogênico, invadindo as células epiteliais da bexiga e se desenvolvendo em comunidades bacterianas intracelulares (NAGAMATSU et al., 2015).

Segundo Spano et al. (2017), em um estudo realizado em centros médicos, utilizando espécimes de fezes de crianças e adultos, a *E.coli* diarreiogênica (DEC), foi a mais incidente; de 141 crianças, 40% delas possuíam estirpes com o gene de virulência relacionado a esse sorotipo; e dos 186 adultos, 30% possuíam essa estirpe. É importante ressaltar que outros sorotipos foram encontrados como a *E.coli* enteroagregativa (23%) e *E.coli* difusamente aderente (13%), ambas analisadas de forma geral nos dois grupos estudados (SPANO et al., 2017).

No tocante de mecanismos de resistência, o que mais se destaca são os ligados aos Betalactâmicos, visto que a *E. coli* produz B-lactamases de espectro estendido (ESBL) relacionados aos genes AmpC; e também as fluoquinolonas pelas mutações em genes como GyrA e ParC (GUO et al., 2015). Além disso, esse patógeno pode usar como um mecanismo de escape as bombas de efluxo em situações em que a síntese enzimática é insuficiente frente a alguns antibióticos (CHUPPAVA et al., 2018).

2.4 Ultrassom Terapêutico

O ultrassom terapêutico é amplamente utilizado na clínica, uma vez que possui várias ações sobre os tecidos biológicos humanos, produzindo efeitos térmicos e não térmicos, principalmente no tocante de fisiologia, biofísica e terapêutica (EDI et al., 2017).

Dentre as várias funções fisiológicas, observa-se uma aplicabilidade grande em processos de cicatrização e tratamento de patologias articulares, já que ele produz aquecimento profundo, principalmente em tecidos moles (SCHUHFRIED et

al., 2017). Quando se aplica ultrassom no corpo humano, as ondas ultrassônicas interagem e provocam ações divididas em efeitos térmicos e não térmicos, quase nunca diferenciáveis (EDI et al., 2017).

Para que se chegue aos efeitos desejáveis térmicos, necessita-se atingir um tecido alvo, com uma temperatura entre 40 e 45°C em até 5 minutos, acima disso podem ocorrer danos celulares (Al et al., 2018). Dentre os efeitos térmicos destacam-se redução de dor, aumento da perfusão, diminuição da rigidez articular, aumento da excitabilidade do colágeno e cicatrização tecidual, visto que o aumento da temperatura em até 1°C aumenta o metabolismo, o aquecimento de 2 a 3°C diminui a dor e o espasmo muscular e o aumento de 4°C reduz a rigidez entre as articulações (HITCHCOCK; DOBKE, 2014).

Já os efeitos não térmicos, destacam-se estimulação e regeneração de tecidos moles e óssea, aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação e mudanças no metabolismo graças às ondas mecânicas emitidas pelo ultrassom (MEUNIER; WOODFORD; HOPKINS, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o potencial do ultrassom como alternativa terapêutica em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*.

3.2 Específicos

- ✓ Estudar o efeito temporal do uso do ultrassom sobre as sobrevivências das células bacterianas.
- ✓ Avaliar a eficiência das frequências de exposição de 1MHz e 3 MHz na indução de morte bacteriana.
- ✓ Comparar o efeito do ultrassom terapêutico sobre células bacterianas gram positivas e gram negativas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Inoculação de *S. aureus* e *E. coli*

Neste estudo foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os experimentos foram realizados no laboratório de Imunologia e Microbiologia Veterinária da Universidade Federal do Acre (UFAC). Para tanto, as bactérias foram inoculadas em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (ACUMÉDIA / Lote:108059D) e incubadas a 37°C por 24 horas em uma estufa BOD (LIMATEC), em condições normais de atmosfera e pressão. Completado este período, foi realizada a semeadura das linhagens de bactéria por esgotamento em placas com Ágar Mueller Hinton (KASVI / Lote: 022217504), seguida de um novo período de incubação por 24 horas a 37°C, em condições normais de atmosfera e pressão. Passada a incubação, uma única colônia de cada bactéria foi retirada e inoculada em 4mL de caldo BHI (ACUMÉDIA / Lote:108059D), sendo então cultivadas nas condições de incubação previamente citadas.

As suspensões bacterianas em fase crescimento exponencial, contendo cerca de 10^8 células/mL, foram ajustadas para densidade óptica em 0,6 a um comprimento de onda de 600nm, utilizando um espectrofotômetro (UV – VIS 200). As suspensões bacterianas foram usadas para os experimentos com suspensões planctônicas. Este protocolo foi uma adaptação da técnica utilizada por Iqbal e colaboradores (IQBAL et al., 2013).

4.2 Exposição das Suspensões planctônicas ao Ultrassom terapêutico

Cerca de 1mL de suspensão das duas estirpes de bactérias testadas foram separadas em cinco tipos de tratamentos: tempos distintos de 0 (controle), 5, 10, 15 e 20 minutos. Cada suspensão foi então centrifugada a 12.000 RPM (centrifuga CENTRIBIO) para que o sobrenadante fosse desprezado e o *pellet* de células fosse ressuspenso em 1 mL de água destilada estéril. As suspensões foram então transferidas para placas de petri de acrílico e seladas com fita impermeável. As placas foram divididas em grupo controle (sem tratamento) e grupos submetidos à exposição ultrassônica de 0,5 W/cm² com frequência de 1 e 3 MHZ, utilizando o

modo contínuo, em tempos distintos, usando um gel condutor para melhor direcionamento das ondas ultrassônicas.

4.3 Diluição das Suspensões planctônicas

Após a exposição ao ultrassom, foram retirados 100µL de água das suspensões planctônicas de cada placa, e submetido a diluição seriada (10^{-4}) pela técnica do gotejamento. De cada diluição foram coletadas alíquotas de 10µL e desprezado sob a forma de uma gota na superfície do BHI ágar (KASVI / Lote: 082417507). O material foi incubado *overnight* a 37°C. Todos os testes foram realizados em triplicata. Este protocolo foi baseado no trabalho de Naghili e colaboradores (NAGHILI et al., 2013).

4.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias nas Suspensões Planctônicas

Após realizada a técnica do gotejamento em BHI ágar e a incubação *overnight* nas condições de temperatura, atmosfera e pressão previamente descritas, foi realizada a contagem de colônias dos tratamentos realizados na diluição 10^{-4} (IQBAL et al., 2013).

4.5 Especificações do Ultrassom Terapêutico

O aparelho de ultrassom utilizado foi um modelo Sonopulse III, da empresa IBRAMED, com gel de acoplamento a base de água. Este equipamento é empregado para tratamentos nas áreas da fisioterapia e estética, utilizando as frequências de 1MHz e 3MHz.

4.6 Análise Estatística

Os dados foram tabulados no *Microsoft Excel* e expostos na forma de tabelas e gráficos. A elaboração das informações estatísticas e a significância das diferenças de médias entre os grupos (Testes e Controles) foram verificadas por

meio do teste de análise de variância (ANOVA), com uso do pós-teste de Turkey, em um intervalo de confiabilidade de 95%.

Com o intuito de melhor comparar os efeitos observados nas diferentes condições de tempo de exposição, frequência de ultrassom e espécies testadas foi realizado um cálculo para normalização dos dados pelos respectivos controles, representado como Crescimento Relativo, o qual se baseou na seguinte fórmula:

$$\text{Crescimento Relativo} = \frac{\text{Contagem de UFC no tratamento}}{\text{Contagem de UFC no controle negativo}} \times 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados absolutos de contagem de colônias nas três replicatas de cada tratamento realizados em *S. aureus* e *E. coli* em frequências distintas apresentam-se na Tabela 1. Para ambas as linhagens, observou-se que quanto maior foi o tempo de exposição ao ultrassom, maior foi a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC's).

Um resultado totalmente inesperado, visto que em comparação com os estudos de Caldeira e colaboradores (2016), quanto maior era o tempo de exposição, maior era a curva de morte dos microrganismos (*E.coli* e *S.aureus*), mesmo associando o ultrassom terapêutico à antibioticoterapia, em tempos de 5 e 15 minutos, eles obtiveram cem por cento de morte (CALDEIRA et al., 2016).

Apesar dos controles negativos não mostrarem tanta diferença entre eles para as diferentes estirpes bacterianas, é notável que os tratamentos permitiram um maior crescimento, em especial para a linhagem *E. coli*. Vale lembrar, que as estruturas de bactérias gram positivas e negativas são distintas, tendo em vista que a bactéria citada possui uma parede celular simples, podendo neste caso o ultrassom ser um facilitador para o aumento da permeabilidade da membrana externa, favorecendo a alta divisão celular, sendo necessários mais estudos acerca da ação das ondas ultrassônicas sob os diversos crescimentos bacterianos (PITT; ROSS, 2006).

O tempo de exposição de 5 minutos não apresentou um efeito importante sobre o crescimento celular, sendo que este não se distingue do grupo controle negativo para ambas as linhagens celulares, nas duas frequências utilizadas, o que prova que pequenas exposições temporais ultrassônicas aparentam não exercer efeito significativo no crescimento bacteriano para as cepas testadas.

Para a *S. aureus*, na frequência de 1 MHz o controle apresentou uma média de crescimento de 2,33 UFC's, para o tempo de 5 minutos, 3,67 UFC's; para o tempo de 10 minutos, 4 UFC's; para o tempo de 15 minutos, 5,67 UFC's; e para o tempo de 20 minutos, 6,33 UFC's. Para o ensaio com a frequência de 3 MHz, o grupo sem tratamento (controle), apresentou um crescimento médio de 3,33 UFC's, o tempo de 5 minutos, 4 UFC's; o tempo de 10 minutos, 4,33 UFC's; o tempo de 15 minutos, 5 UFC's; e o tempo de 20 minutos, 6 UFC's. Notou-se que apenas os tempos de 15 e 20 minutos na frequência de 1 MHz, levaram a um aumento no número de UFC's, porém essas diferenças não puderam ser distinguidas estatisticamente.

Tabela 1: Dados brutos, bem como o valor médio e desvio padrão, referentes ao ensaio de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, para *S. aureus* e *E. coli*, submetidos a tratamento com ultrassom nas frequências de 1 e 3 MHz, nos tempos de 5', 10', 15' e 20' de exposição

Espécie	Frequência	Tratamentos	Placa	Placa	Placa	Média	Desvio Padrão
			01	02	03		
<i>Staphylococcus aureus</i>	1MHz	Controle	4	2	1	2,33	1,53
		5'	7	3	1	3,67	3,06
		10'	4	6	2	4	2
		15'	2	13	2	5,67	6,35
		20'	6	6	7	6,33	0,58
	3MHz	Controle	2	2	6	3,33	2,31
		5'	4	1	7	4	3
		10'	6	4	3	4,33	1,53
		15'	5	2	8	5	3
		20'	8	8	2	6	3,46
<i>Escherichia coli</i>	1MHz	Controle	1	1	5	2,33	2,31
		5'	1	1	7	3	3,46
		10'	10	1	5	5,33	4,51
		15'	4	6	13	7,67	4,73
		20'	11	10	9	10	1
	3MHz	Controle	3	4	2	3	1
		5'	1	1	9	3,67	4,62
		10'	14	10	10	11,33	2,31
		15'	14	12	10	12	2
		20'	20	21	19	20	1

Na estirpe de *Escherichia coli*, o grupo com o tratamento de 1 MHz, apresentou um crescimento médio para o controle de 2,33 UFC's, para o tempo de 5 minutos, 3 UFC's; para o tempo de 10 minutos, 5,33 UFC's; para o tempo de 15 minutos, 7,67 UFC's; e para o tempo de 20 minutos, 10 UFC's. Já para o tratamento com a frequência de 3 MHz, o grupo controle mostrou-se com uma média de crescimento de 3 UFC's, o tempo de 5 minutos, 3,67 UFC's; o tempo de 10 minutos, 11,33 UFC's; o tempo de 15 minutos, 12 UFC's; e o tempo de 20 minutos, 20 UFC's. O efeito temporal de exposição ao ultrassom é muito mais visível nas cepas de *E. coli*, sendo que as maiores diferenças se notaram também a partir dos 10 minutos de exposição, e este comportamento foi observado em ambas as frequências testadas.

Após análise dos dados brutos, usou-se a fórmula dos valores relativos que normaliza a taxa de crescimento quando comparado aos seus respectivos controles. No ensaio realizado para *S. aureus* na frequência de 3 MHz, vimos que o tempo de 5 minutos levou uma taxa de crescimento médio de 20%, quando comparado ao grupo controle. Para os tempos de 10, 15 e 20 minutos, estes aumentos foram de 30%, 50% e 80% respectivamente (Figura 1A). Para a frequência de 1 MHz, se tratando da mesma bactéria o grupo exposto por 5 minutos apresentou um crescimento relativo de 57%, no tempo de 10 minutos 71%, no tempo de 15 minutos 142% e no tempo de 20 minutos 171% (Figura 1B).

Observou-se que ambas as frequências favoreceram o crescimento celular, porém a frequência de 1 MHz, aquela utilizada para fins terapêuticos sistêmicos levou a um aumento mais importante no número de UFC's.

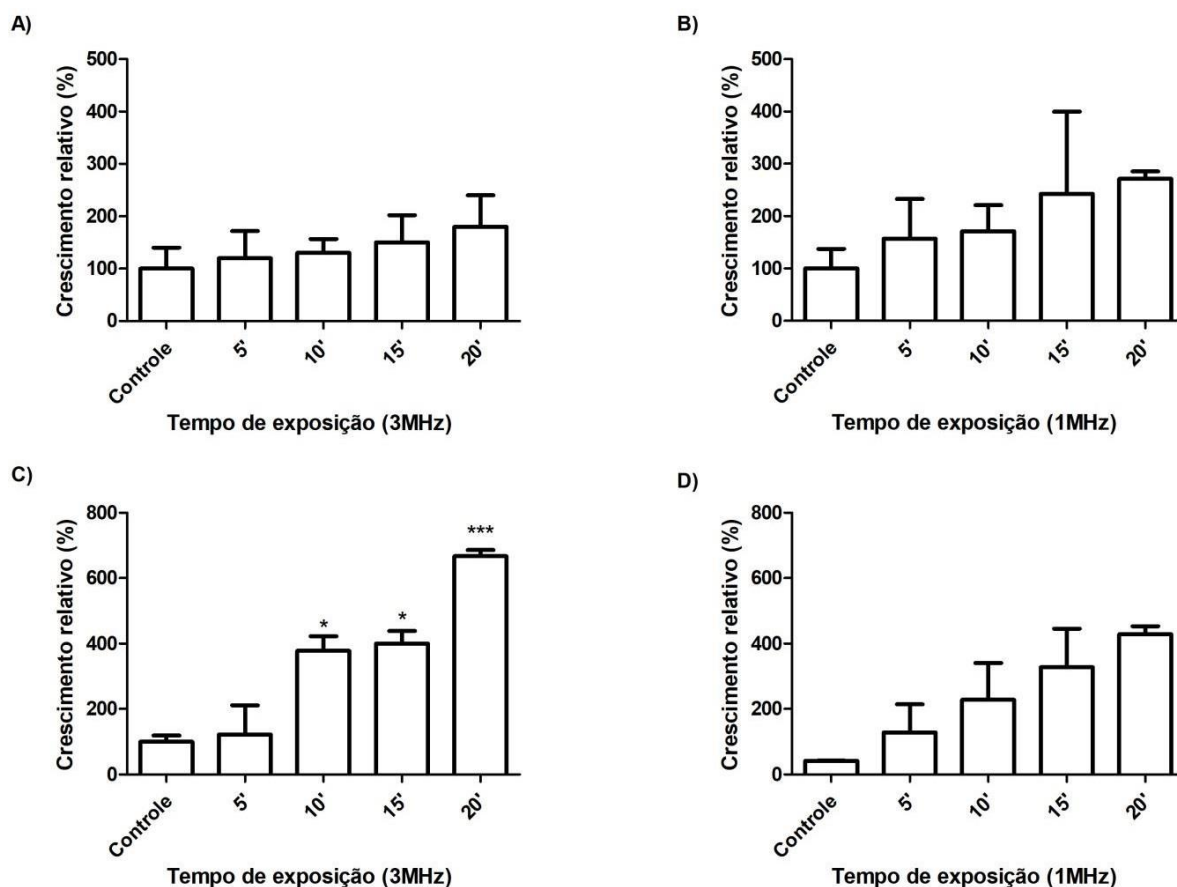


Figura 2: Representação em Gráfico dos resultados obtidos a partir da avaliação do crescimento relativo para as linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes tempos e frequências. A) *S. aureus* na frequência de 3 MHz; B) *S. aureus* na frequência de 1 MHz; C) *E. coli* na frequência de 3 MHz; D) *E. coli* na frequência de 1 MHz. * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

No tratamento para *E. coli* na frequência de 3 MHz, o tempo de 5 minutos apresentou uma taxa de crescimento de 22%; já para os tempos de 10', 15' e 20' os valores foram de 77%, 300% e 566% respectivamente. Na frequência de 1 MHz, os resultados para o crescimento relativo foram 28%, 128%, 228% e 428% para os tempos de 5, 10, 15 e 20 minutos respectivamente.

É importante salientar, que para a linhagem *E. coli*, somente os resultados apresentados para o tratamento com 3 MHz de frequência, nos tempos de 10, 15 e 20 minutos, apresentaram-se estatisticamente diferentes do grupo controle negativo. A razão pela qual possivelmente não foi observado esta diferença para a frequência de 1 MHz, é de que, no controle negativo deste tratamento houve um maior desvio padrão.

Embora o efeito esperado fosse o de indução de morte bacteriana, na literatura são conhecidos casos em que o uso do ultrassom tem como efeito uma melhora no crescimento destes microrganismos. Gu e colaboradores (2016) relatam que o uso de uma frequência de 8 MHz foi capaz de induzir um aumento na biomassa (proteínas e RNA) e da taxa de crescimento de *E. coli* em cerca de 250%, quando comparada ao controle não submetido à exposição pelo ultrassom. Para tal avaliação, os pesquisadores utilizaram um aparato sonoro capaz de emitir esta frequência em autôfalantes à prova d'água, que foram inseridos no meio de cultura contendo as bactérias.

O efeito positivo do ultrassom sobre o crescimento de bactérias não é algo tão atual. Ao submeter culturas de *S. epidermidis* e *E. coli* ao tratamento com ultrassom, numa frequência de 70 kHz, observou uma elevação na taxa de crescimento bacteriana, bem como no crescimento planctônico destas mesmas espécies. É importante destacar que, no uso de frequências maiores, os pesquisadores observaram um desprendimento das bactérias da superfície nas quais eram cultivadas (PITT; ROSS, 2006).

Apesar de somente o grupo de *E. coli* submetido ao tratamento com 3 MHz, nos três maiores tempos de exposição, apresentar valores estatisticamente significantes, isso não descarta o potencial indutor do crescimento bacteriano do ultrassom na frequência de 1 MHz em *E. coli* e nas frequências de 1 e 3 MHz em *S. aureus*. Isso fica bastante evidente quando se observa a Figura 2, e soma-se ao conhecimento de que os tratamentos de 1 e 3 MHz em *E. coli* nos diferentes tempos tiveram um valor de correlação 0,97; entre *S. aureus* nas duas frequências a correlação foi a mesma.

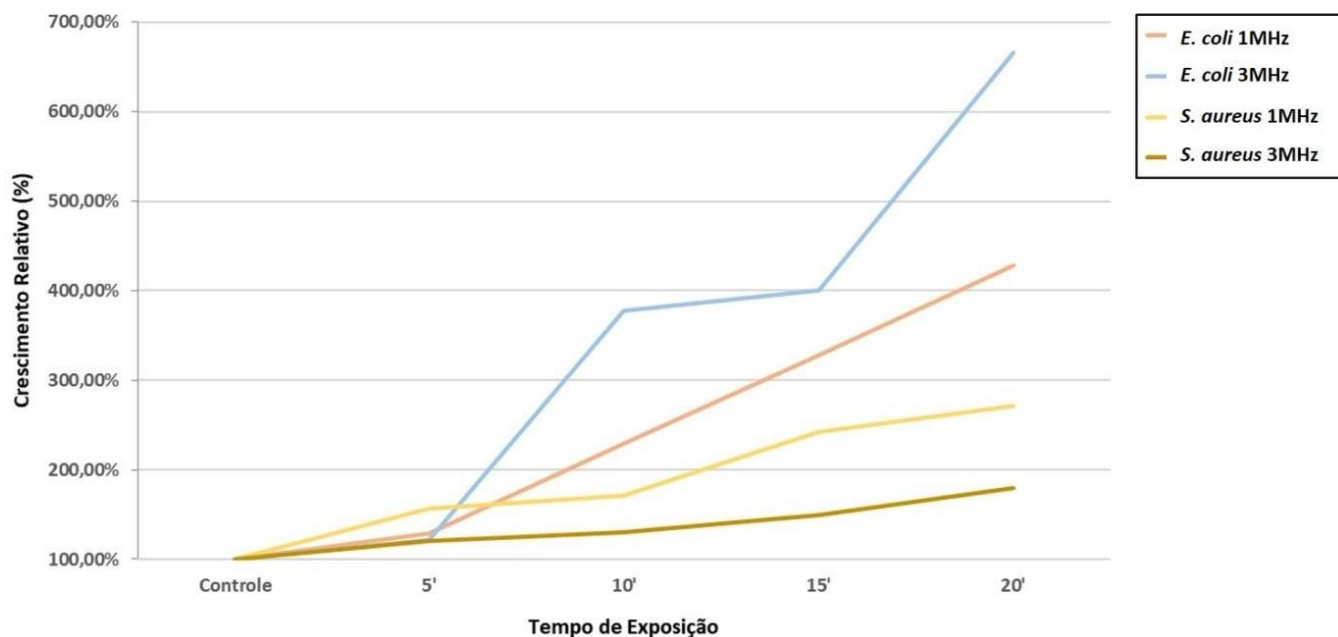


Figura 2: Representação gráfica dos resultados de Crescimento Relativo para as diferentes linhagens nas frequências de 1 e 3 MHz, nos tempos de exposição de 5', 10', 15' e 20'.

É digno de nota, que ao comparar a mesma frequência, mas em diferentes linhagens celulares o valor de correlação também é bastante relevante, basta observar que entre *E. coli* e *S. aureus* em 1 MHz a taxa foi de 0,96; e para as duas estirpes celulares em 3 MHz a taxa de correlação foi também de 0,96. Esses valores de correlação, acima de 0,95 corroboram a ideia de que o ultrassom potencializa o crescimento bacteriano nas diferentes frequências, e em distintas espécies, dependendo do tempo de exposição.

Após a realização dos experimentos e análise dos dados, observou-se que o tratamento com o ultrassom induziu um aumento no número de UFCs se comparado ao controle negativo. Em um estudo realizado por Iqbal e colaboradores (IQBAL et al., 2013) foi avaliado o efeito do ultrassom focalizado de alta intensidade em suspensões planctônicas de *Enterococcus faecalis*. Para tal, os autores expuseram as amostras por um tempo de 0, 30, 60 e 120 segundos e quantificaram o número de células viáveis após o tratamento, por meio da contagem de UFCs. Como resultado, observaram que quanto maior era o tempo de exposição (em segundos), maior era o nível de morte das células bacterianas.

Os mesmos autores ainda relatam que este efeito deve se dar, em parte, pelas elevadas temperaturas resultantes da vibração da água ocasionada pela frequência do ultrassom (IQBAL et al., 2013). É importante ressaltar que este tipo de ultrassom é utilizado para destruir tecidos tumorais pelo calor intenso produzido, levando a processos necróticos, o que difere totalmente do modo de atuação do ultrassom terapêutico, o qual é aplicado com intuito de induzir restauração, cicatrização de tecidos moles, alívio da dor e aumento do fluxo sanguíneo por exemplo.

Guirro e colaboradores (2016) ao utilizar ultrassom terapêutico e antibioticoterapia obtiveram resultados positivos como já citados acima, e ainda sugerem que o efeito do ultrassom potencializa ou aumenta o efeito de alguns antibióticos, uma vez que o seu efeito mecânico e químico altera algumas proteínas da membrana, facilitando a entrada do medicamento, seguida da morte celular. Vale lembrar que esses são mecanismos ainda não bem compreendidos, mas que sinalizaram para uma possível resolução para a resistência bacteriana, tida como um grave problema de saúde pública.

A mesma ideia de que o ultrassom facilita o transporte de antibióticos, foi utilizada nos experimentos com biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, nos estudos de Carmem e colaboradores (2005). Analisou-se que discos de gentamicina penetravam os biofilmes em 45 minutos ou simplesmente não adentravam, com a exposição ao tratamento ultrassônico, eles observaram que o transporte de gentamicina aumentou significativamente, que normalmente estavam bloqueados ou retardados.

Por fim, com a análise dos dados obtidos até o presente dado e a informação contida na literatura, podemos concluir que o uso de ultrassom terapêutico, nas condições aqui apresentadas, agiu beneficiando o crescimento das bactérias, algo que, embora discordante do objetivo inicial, não é obstante do que se conhece na prática laboratorial. Os mecanismos pelos quais esse tipo de onda atua, influenciando positivamente o crescimento de bactérias ainda não foi muito bem estudado, sendo sugerido que o ultrassom pode aumentar o transporte de oxigênio entre as células e facilitar ou elevar o transporte de nutrientes no ambiente onde as células se desenvolvem.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o ultrassom terapêutico teve efeito contrário a hipótese proposta inicialmente, e que favoreceu o crescimento e que este é maior com o tempo de exposição, nas duas frequências utilizadas. Presume-se assim, que além de serem necessários mais estudos correlacionando infecções cutâneas e ultrassom terapêutico, é preciso que se entenda melhor como funciona a ação mecânica e química do ultrassom quando utilizado sozinho como forma de tratamento.

7 REFERÊNCIAS

- Al, L. et al. Effects of transcranial focused ultrasound on human primary motor cortex using 7T fMRI. **BCM neuroscience**, p. 277608, 2018.
- ALMAKKI, A. et al. Science of the Total Environment Antibiotic resistance in urban runoff. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 64–76, 2019.
- BLAIR, J. M. A.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. V. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165–77, 2014.
- CABOT, G. et al. Deciphering b-lactamase-independent b-lactam resistance evolution trajectories in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–10, 2018.
- CALDEIRA, E. et al. Combination of therapeutic ultrasound with antibiotics interfere with the growth of bacterial culture that colonizes skin ulcers: an in-vitro study. **ULTRASONICS SONOCHEMISTRY**, 2016.
- CARMEN, J. C. et al. Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. **American Journal of Infection Control**, v. 33, n. 2, p. 78–82, 2005.
- CHUPPAVA, B. et al. Resistance of *Escherichia coli* in Turkeys after Therapeutic or Environmental Exposition with Enrofloxacin Depending on Flooring. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 9, p. 1993, 2018.
- CROUCHER, N. J. et al. Bacterial genomes in epidemiology--present and future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1614, p. 20120202–20120202, 2013.
- CUNRATH, O. et al. Quantitative contribution of efflux to multi-drug resistance of clinical *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **EBioMedicine**, 2019.
- DEGUCHI, H. et al. The trend of resistance to antibiotics for ocular infection of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococcus, and *Corynebacterium* compared with 10-years previous: A retrospective observational study. **Advances in Applied Microbiology**, p. 1–10, 2018.
- DOMINGUEZ, J. E. et al. Simultaneous carriage of *mcr-1* and other antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* from poultry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–10, 2018.
- EDI, E. et al. Therapeutic Ultrasounds: Physical Basis and Clinical Assessment. **Clinical Physical Therapy**, 2017.
- GERIAK, M. et al. Clinical Data on Daptomycin Plus Ceftaroline Versus Standard of Care Monotherapy in the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **Antimicrobial Agents and Chemother**, n. March, p. 1–35, 2019.
- GIANNAKIS, S. et al. Ultrasound enhancement of near-neutral photo-Fenton for

effective E. coli inactivation in wastewater. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 515–526, 2015.

GU, S.; ZHANG, Y.; WU, Y. Effects of sound exposure on the growth and intracellular macromolecular synthesis of E. coli k-12. **PeerJ**, v. 4, p. e1920, 2016.

GUO, L. et al. Antimicrobial and disinfectant resistance of Escherichia coli isolated from giant pandas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 55–64, 2015.

HITCHCOCK, T. M.; DOBKE, M. K. Review of the safety profile for microfocused ultrasound with visualization. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 13, n. 4, p. 329–335, 2014.

HYDE, T. B. et al. Incidence, Aetiology and Outcome of Bacterial Meningitis in Infants Aged <90 days in the UK and Republic of Ireland: prospective, enhanced, national population-based surveillance. **Clinical Infectious Diseases Advance**, p. 1–25, 2014.

ICGEN, B. Van A-Type MRSA (VRSA) Emerged in Surface Waters. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, n. May, 2016.

IQBAL, K. et al. Effect of High-Intensity Focused Ultrasound on Enterococcus Faecalis Planktonic Suspensions and Biofilms. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v. 39, n. 5, p. 825–833, 2013.

LEE, M. et al. Antimicrobial resistance in Mycobacterium abscessus complex isolated from patients with skin and soft tissue infections at a tertiary teaching hospital in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. January, p. 2782–2786, 2018.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. December, p. 1–9, 2014.

LIU, C. et al. Variation of dissolved organic nitrogen concentration during the ultrasonic pretreatment to Microcystis aeruginosa. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 236–243, 2016.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. **Escherichia coli ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015. v. 90

MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus . **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, p. 269–281, 2017.

MEUNIER, D.; WOODFORD, N.; HOPKINS, K. L. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants mcr-1/-2 in MDR Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 0, p. 2–5, 2018.

NAGAMATSU, K. et al. Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 8, p. E871–E880, 2015.

NAGHILI, H. et al. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary Research Forum: An international quarterly journal**, v. 4, n. 3, p. 179–183, 2013.

NINOMIYA, K. et al. Effect of ultrasound irradiation on bacterial internalization and bacteria-mediated gene transfer to cancer cells. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 1187–1193, 2014.

PITT, W. G.; ROSS, S. A. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 3, p. 1038–44, 2006.

RANJBAR, R. et al. The Frequency of Antibiotic Resistance and ESBLs Among Clinically *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients in a Major Hospital in Tehran, Iran. **The Open Microbiology Journal**, v. 12, n. 1, p. 254–260, 2018.

RODRIGUEZ-MOLARES, A. et al. Quantification of the ultrasound induced sedimentation of *Microcystis aeruginosa*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 4, p. 1299–1304, 2014.

SCHUHFRIED, O. et al. Effects of Pulsed Ultrasound Therapy on Sensory Nerve Conduction Parameters and the Pain Threshold Perceptions in Humans. **PM and R**, v. 9, n. 8, p. 781–786, 2017.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SKOWRONEK, P. et al. Can diagnostic ultrasound scanners be a potential vector of opportunistic bacterial infection? **Medical Ultrasonography**, v. 18, n. 3, p. 326–331, 2016.

SPANO, L. C. et al. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

SPRATT, H. G.; LEVINE, D.; TILLMAN, L. Physical therapy clinic therapeutic ultrasound equipment as a source for bacterial contamination. **Physiotherapy Theory and Practice**, v. 30, n. 7, p. 507–511, 2014.

YANG, S. C. et al. The atopic dermatitis-like lesion and the associated MRSA infection and barrier dysfunction can be alleviated by 2,4-dimethoxy-6-methylbenzene-1,3-diol from *Antrodia camphorata*. **Journal of Dermatological Science**, p. 1–9, 2018.

ZENG, J. et al. Metagenomic insights into the distribution of antibiotic resistome between the gut-associated environments and the pristine environments. **Environment International**, v. 126, n. December 2018, p. 346–354, 2019.