

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NAGELA BERNADELLI SOUSA SILVA

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS ISOLADAS EM UMA  
UNIDADE NEONATAL

Uberlândia

2019

NAGELA BERNADELLI SOUSA SILVA

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS ISOLADAS EM UMA  
UNIDADE NEONATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Denise Von Dolinger  
de Brito Röder

Coorientadora: Dra. Ralciane de Paula Menezes

Uberlândia

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Nagela Bernadelli Sousa, 1995-  
2019 Análise da produção de biofilme por bactérias isoladas em uma  
Unidade Neonatal [recurso eletrônico] / Nagela Bernadelli Sousa  
Silva. - 2019.

Orientadora: Denise von Dolinger de Brito Röder.  
Coorientadora: Ralciane de Paula Menezes.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Ciências da Saúde.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2503>  
Inclui bibliografia.  
Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Röder, Denise von Dolinger de Brito ,  
1976-, (Orient.). II. Menezes, Ralciane de Paula , 1990-, (Coorient.).  
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em  
Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

NAGELA BERNADELLI SOUSA SILVA

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR BACTÉRIAS ISOLADAS EM UMA  
UNIDADE NEONATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Uberlândia, 10 de Dezembro de 2019.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder – UFU

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Helisângela de Almeida Silva – UFU

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Poliana de Castro Melo – UESC



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
 Av. Pará, 1720, Bloco 2H, Sala 09 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8628 - www.ppcs.famed.ufu.br - copme@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 027/PPCSA				
Data:	10.12.2019	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento:	10:45
Matrícula do Discente:	11812CSD032				
Nome do Discente:	Nagela Bernadelli Sousa Silva				
Título do Trabalho:	Análise da produção de biofilme por bactérias isoladas em uma Unidade Neonatal				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	1: Epidemiologia da ocorrência de doenças e agravos à saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Epidemiologia das infecções hospitalares				

Reuniu-se no anfiteatro do Bloco 2H, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Poliana de Castro Melo (UESC) via *skype*, Helisângela de Almeida Silva (UFU) e Denise Von Dolinger de Brito Röder orientadora da candidata presentes no recinto.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Poliana de Castro Melo, Usuário Externo**, em 10/12/2019, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Von Dolinger de Brito Roder, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helisangela de Almeida Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1745683** e o código CRC **2726BA3E**.

## DEDICATÓRIA

*A Deus, que com sua infinita sabedoria, foi um verdadeiro guia nessa jornada.  
Aos meus pais, namorado, professores, amigos e toda minha família que com muito carinho, amor e dedicação me impulsionaram para a realização desse sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Sem Ele não teria sido possível chegar até aqui.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder, pela orientação, confiança, amizade e incansável dedicação. Obrigada pela paciência, atenção, disposição e amparo nos momentos difíceis, que foram cruciais para que eu concluísse essa trajetória. Manifesto aqui minha gratidão por compartilhar comigo sua sabedoria, o seu tempo e a sua experiência.

Ao Prof<sup>º</sup>. Dr. Mario Paulo Amante Penatti, pela orientação, confiança e atenção durante todo esse tempo. Obrigada pelos valiosos conselhos para a minha vida profissional e pessoal, que foram importantes para o meu crescimento. Obrigada também pela disponibilização da Escola Técnica de Saúde (ESTES) e todos os materiais necessários para a realização desse trabalho.

À Dra. Ralciane de Paula Menezes pela orientação, troca de experiências e todo o apoio dado nessa trajetória. Obrigada pelo incentivo, companheirismo e ensinamentos que levarei para a vida.

Ao Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso pelas valiosas ideias e sugestões dadas para o desenvolvimento desta pesquisa.

A banca examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Helisângela de Almeida Silva e Prof<sup>ª</sup>. Dra. Poliana de Castro Melo, que gentilmente cedeu parte do seu tempo, para me presentear com suas brilhantes observações e valiosas contribuições. Deixo aqui meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais e todos os meus familiares, por todo o incentivo, compreensão, amor e dedicação, bem como meus avós que já se foram, mas que continuam sendo minha maior força e inspiração.

Ao meu namorado que jamais me negou apoio, carinho e incentivo. Obrigada por ser tão atencioso e por entender minha ausência em vários momentos.



Aos meus amigos e parceiros do grupo de pesquisa. Obrigada pelos inúmeros conselhos, frases de motivação, por toda a ajuda na realização deste trabalho e principalmente pela amizade que construímos.

Á MSc Paula Augusta Fogaça Aguiar e João Paulo Pimenta pela colaboração nas análises pelo MALDI-TOFF MS.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e o Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica - LALIC pela colaboração nas análises do espectrofotômetro. Obrigada pela parceria e por serem tão simpáticos e receptivos.

Á coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro desse projeto. Agradeço também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de iniciação científica dos alunos que contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram, fornecendo todo o suporte necessário, meus sinceros agradecimentos.

*Faça o seu melhor, na condição que  
você tem, enquanto você não tem  
condições melhores para fazer  
melhor ainda''*

Mário Sergio Cortella

## RESUMO

Infecções neonatais causadas por microrganismos produtores de biofilme são mais persistentes e de difícil tratamento. *Klebsiella* spp. são importantes patógenos nosocomiais frequentemente envolvidos em surtos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTINs). Esses patógenos são capazes de produzir biofilme em superfícies bióticas e abióticas, aumentando a sua permanência nas superfícies. O objetivo desse estudo foi detectar a produção de biofilme em amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* provenientes do ambiente, mãos dos profissionais de saúde e ambiente de uma UTIN. A detecção da produção de biofilme foi feita pela técnica de microplaca, utilizando cristal-violeta para quantificação da biomassa, safranina para matriz extracelular e (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) para avaliação da atividade metabólica. Além disso, as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram contadas para a quantificação do número de células viáveis presentes no biofilme. No total, foram utilizadas no estudo 33 amostras de *Klebsiella* spp., sendo 28 amostras de *Klebsiella pneumoniae* e cinco de *Klebsiella oxytoca*. Todas as amostras foram forte produtoras de biofilme, porém 14 amostras produziram mais biofilme do que o controle, em pelo menos um dos três métodos colorimétricos utilizados e 15 foram menos eficientes nessa produção. A produção de biofilme das demais amostras não foram estatisticamente significantes. Comparando a produção de biofilme produzida pelas duas espécies, *Klebsiella pneumoniae* foi mais eficiente na produção de biomassa e matriz extracelular do que *Klebsiella oxytoca*. Já a atividade metabólica avaliada no biofilme das duas espécies, não houve diferenças estatisticamente significantes, assim como o número de células viáveis presentes no biofilme produzidas pelas duas espécies. A produção de biofilme por *Klebsiella* spp. garante uma maior permanência desses patógenos na unidade, devido a uma maior proteção garantida pela produção da matriz extracelular. Quanto maior o tempo de permanência desses microrganismos na unidade, maiores são as chances do neonato adquirir uma infecção. Esse estudo mostra a importância de microrganismos produtores de biofilme em uma UTIN e a utilização de três métodos colorimétricos e um quantitativo para a avaliação de diferentes parâmetros do biofilme, que constituem-se como ferramentas baratas e eficazes para a detecção da produção de biofilme bacteriano.

**Palavras-chave:** Biofilmes, *Klebsiella* spp., neonatos

## ABSTRACT

Neonatal infections caused by biofilm-producing microorganisms are more persistent and difficult to treat. *Klebsiella* spp. They are important nosocomial pathogens often involved in outbreaks in Neonatal Intensive Care Units (NICUs). These pathogens are capable of producing biofilm on biotic and abiotic surfaces, increasing their permanence on the surfaces. The aim of this study was to detect biofilm production in samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from the environment, hands of health professionals and bloodstream from a NICU. The detection of biofilm production was performed by microplate technique, using crystal violet for biomass quantification, extracellular matrix safranin and (2,3-Bis - (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfohenyl) - 2H - Tetrazolium – 5 - Carboxanilide) for evaluation of metabolic activity. In addition, Colony Forming Units (CFU) were counted to quantify the number of viable cells present in the biofilm. In total, 33 samples of *Klebsiella* spp. were used in the study, being 28 samples of *Klebsiella pneumoniae* and five samples of *Klebsiella oxytoca*. All samples were strong biofilm producers, but 14 samples produced more biofilm than control, in at least one of the three colorimetric methods used and 15 were less efficient in this production. The biofilm production of the other samples were not statistically significant. Comparing the biofilm production produced by the two species, *Klebsiella pneumoniae* was more efficient in biomass and extracellular matrix production than *Klebsiella oxytoca*. As for the metabolic activity evaluated in the biofilm of the two species, there were no statistically significant differences, as well as the number of viable cells present in the biofilm produced by the two species. Biofilm production by *Klebsiella* spp. guarantees a longer permanence of these pathogens in the unit, due to the greater protection guaranteed by the extracellular matrix production. The longer the stay of these microorganisms in the unit, the greater the chance of the newborn acquiring an infection. This study shows the importance of biofilm-producing microorganisms in a NICU and the use of three colorimetric and quantitative methods for the evaluation of different biofilm parameters, which are cheap and effective tools for detecting bacterial biofilm production.

**Keywords:** Biofilms, *Klebsiella* spp., neonates.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Fundamentação Teórica:

Figura 1	Representação esquemática de um biofilme maduro.....	24
Figura 2	Fases da formação do biofilme e liberação das células <i>persisters</i> .....	26

### Artigo

Figura 1 -	Analysis of biofilm production through Crystal-Violet, Safranin and XTT methods.....	48
Figura 2 -	Comparison biofilm production by <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	49
Figura 3-	Comparison of the three methods for detection of biofilm production by <i>Klebsiella spp</i> .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	List of microorganisms included in the study and their isolation sites.....	46
Tabela 2 -	Biofilm production by the three colorimetric methods and CFU of <i>Klebsiella</i> species.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Autoindutores
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê De Ética Em Pesquisa Com Seres Humanos
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CVC	Cateter Venoso Central
DO	Densidade Óptica
Dra	Doutora
EPS	Substância Polimérica Extracelular
ESBL	$\beta$ -Lactamase de Espectro Estendido
ESTES	Escola Técnica de Saúde
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IRAS	Infeções Relacionadas aos Cuidados de Saúde
MALDI-TOF	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo
MR	Multirresistente
MRS	<i>Staphylococcus</i> Resistentes a Meticilina
MARSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes a Meticilina
Odc	Densidade óptica de referência (Cut-off)
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Prof <sup>a</sup>	Professora
QS	<i>Quorum-sensing</i>
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UTIN	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistentes a Vancomicina
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilide)



## APRESENTAÇÃO

Essa dissertação de mestrado foi desenvolvida na Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder e co-orientação da Dra. Ralciane de Paula Menezes, com o apoio da equipe da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), do grupo de pesquisa Epidemiologia de Infecções em Neonatos Críticos e toda a equipe do laboratório de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde (ESTES). Foi elaborada no formato alternativo aprovado pelo colegiado do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, formatado e estruturado seguindo recomendações do programa.

A apresentação dessa dissertação está dividida em quatro seções: Introdução, contextualizando a temática abordada e importância do estudo; Fundamentação teórica, apresentando dados da literatura relevantes sobre o problema apresentado; Objetivos, expressando o que o presente estudo realizou e resultados, que serão apresentados no formato de um artigo intitulado “Biofilm quantification produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical, environment and hands’strains using three colorimetric methods”, produto da coleta e análise dos dados obtidos no mestrado que será submetido na revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. O artigo está seguindo a estrutura e formatação exigida pela revista ao qual será submetido.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>21</b>
	<b>2.1 Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.....</b>	<b>21</b>
	<b>2.2 Bactérias Neonatais.....</b>	<b>21</b>
	<b>2.3 Biofilme.....</b>	<b>22</b>
	<b>2.4 Importância clínica.....</b>	<b>27</b>
	<b>2.5 Produção de biofilme e enzimas de resistência: um problema de saúde pública.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
	<b>ARTIGO: Biofilm quantification produced by <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Klebsiella oxytoca</i> clinical, environment and hands´strains using three colorimetric methods.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (CEP UFU).....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os neonatos admitidos nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatais (UTIN) são considerados como população de risco para o desenvolvimento de infecções, devido ao seu sistema imune imaturo, uso de antimicrobianos de amplo espectro, dispositivos invasivos e hospitalização prolongada (Ahmed et al., 2019). No Brasil, segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a cada 1000 neonatos nascidos vivos, 10 vão a óbito, sendo a infecção de corrente sanguínea a principal causa (Mizumoto et al., 2015; Rajabi; Dallal, 2015).

As UTINs podem ser colonizadas por diversos patógenos, incluindo bactérias produtoras de biofilme. Esses microrganismos podem formar biofilme em várias superfícies, bióticas ou abióticas, aumentando o tempo de permanência do microrganismo na unidade. Aproximadamente 65% das infecções bacterianas estão relacionadas a biofilme, aumentando os custos hospitalares e piorando o prognóstico dos neonatos (Jamal et al., 2018). Além disso, essa comunidade microbiana funciona como um reservatório de patógenos, principalmente os multirresistentes, (MR), já que o contato bacteriano constante no biofilme mediado principalmente pelo *Quorum-sensing* facilita a troca de genes de resistência a antimicrobianos (Yusef et al., 2018; Pammi et al., 2014).

Apesar de todos os avanços na ciência a respeito da produção de biofilme, esse fator de virulência ainda é negligenciado no ambiente hospitalar, constituindo-se como um desafio de saúde pública. São necessários mais estudos acerca dessa temática e a adoção de medidas de controle e prevenção eficazes nas unidades neonatais.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

Em 1960 a primeira Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) foi criada e desde então, várias inovações médicas foram implementadas tais como o desenvolvimento de circuitos respiratórios artificiais e o uso de cateteres para terapias com fluidos intravenosos. Porém, apesar desses avanços permitirem a sobrevivência de vários neonatos em estado crítico, eles também aumentam o risco de infecções, contribuindo para o aumento da morbi-mortalidade na unidade (Donà et al., 2017; Harrison; Goodman, 2015). As infecções nosocomiais afetam até 30% dos pacientes internados nas UTIN, ocorrendo de 5 a 10 vezes menos em pacientes internados em outras unidades hospitalares (Volles; Branam, 2008). A taxa de mortalidade neonatal chega a 1.6 milhões por ano, sendo a infecção de corrente sanguínea uma das principais causas, com 98% por cento dessas mortes ocorrendo em países em desenvolvimento e 75% nos primeiros sete dias de vida (Softić et al., 2017 Umran; Al-Jammali, 2017).

Os fatores de risco envolvidos na aquisição de infecção neonatal são intrínsecos, incluindo: prematuridade, fragilidade da pele e peso inferior a 1500g e extrínsecos como o uso de dispositivos invasivos incluindo Cateter Venoso Central (CVC), nutrição parenteral, ventilação mecânica, sonda vesical, dentre outros (Romanelli et al., 2013).

As infecções neonatais não dependem apenas das condições do hospedeiro, mas também da qualidade dos serviços prestados pelo hospital, como profissionais bem preparados, higienização das mãos, desinfecção das superfícies adequadas, boa preparação dos fluidos administrados para os neonatos e inserções seguras de cateteres (Djordjevic et al., 2015).

A vigilância é uma importante e necessária ferramenta para prevenção, melhorando a qualidade dos serviços neonatais prestados, assim como contribuindo para a redução das taxas de morbi-mortalidade na unidade (Worth et al., 2018).

### 2.2 Bactérias neonatais

Os neonatos são susceptíveis a serem colonizados e infectados por inúmeros patógenos Gram-positivos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e

*Enterococcus faecium*, bem como por Gram-negativos tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Johnson et al., 2017). Alguns estudos apontam, *E. coli* e *Enterococcus* spp. como os primeiros colonizadores neonatais, bem como *Streptococcus* alfa-hemolíticos (Basu et al., 2015).

As bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* são comensais ubiqüitários pertencentes à microbiota da pele, mas nas últimas décadas, vem causando grande parte das infecções neonatais. Nas últimas décadas, *Staphylococcus coagulase negativo* são apontados como um dos principais responsáveis pela maioria das infecções nosocomiais, sendo comumente isolados na corrente sanguínea (Ahmed et al., 2019; Awad et al., 2016; Guimarães et al., 2013).

As bactérias Gram-negativas são agentes causadores de aproximadamente 19% dos quadros de sepse nosocomiais e de mais de 30% das pneumonias, onde se destacam *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* como as principais responsáveis por surtos em UTIN (Giufreé et al., 2016). *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria extensivamente estudada devido ao grande número de infecções e sua crescente resistência aos antimicrobianos. São conhecidas por desempenharem o papel de reservatório de genes de resistência, que podem ser transmitidos para outras bactérias Gram-negativas (Bengoechea et al., 2018). *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria ubiqüitária, capaz de se adaptar a qualquer tipo de ambiente como tecidos humanos e ambientes hospitalares. É naturalmente resistente às principais classes de antimicrobianos comumente utilizados, dificultando o tratamento (Miryala et al., 2019).

## 2.3 Biofilme

Em 1800, os microbiologistas da época acreditavam que a maioria das bactérias viviam isoladas, sem comunicação com outro tipo de microrganismo, chamadas bactérias planctônicas. Porém, uma importante descoberta no século 17 modificou o modo de pensar dos microbiologistas da época, a respeito do comportamento bacteriano. Anton von Leuwenhoek, criador dos primeiros microscópios da época, analisando seu próprio raspado bucal, observou um agregado bacteriano, o que chamou na época de “Animalculi”. Essa observação despertou o interesse de outros pesquisadores. Claude Zobell em 1943 em seu estudo com bactérias marinhas constatou a formação de uma crosta bacteriana nos cascos dos navios, observando a atração das mesmas em superfícies. Mas foi apenas em 1982,

com técnicas de visualização mais sofisticadas como a microscopia, que o termo biofilme foi introduzido na medicina por Costerton, após observar a aderência de estirpes de *Staphylococcus aureus* em um marca- passo cardíaco (Menoita et al., 2012).

### 2.3.1 Definição

Biofilmes são comunidades bacterianas aderidas a uma superfície, biótica ou abiótica, envolvidas por uma matriz extracelular polimérica (Del Pozo et al., 2018). Essa comunidade microbiana desempenha um papel de proteção, garantindo a sobrevivência dos microrganismos mesmo em ambientes hostis (Erskine et al., 2018). Esses patógenos representam apenas 10% da massa total do biofilme. A distribuição populacional no biofilme, depende da difusão de oxigênio, sendo constituído por bactérias situadas nas camadas superficiais com maior contato com o oxigênio e metabolicamente mais ativas, bem como por bactérias nas zonas mais profundas do biofilme, em estado de dormência. A matriz constitui um dos componentes mais importantes para o biofilme, representando cerca de 70 a 95% da massa total do biofilme. É formada por lipídeos, ácidos nucleicos, polissacarídeos, proteínas e a principal substância: Substância Polimérica Extracelular (EPS). Sua função está relacionada a morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional da comunidade. Além disso, age como barreira defensiva, auxiliando as células microbianas a resistirem ao stress múltiplo (Alav et al., 2018). Outra parte significativa da massa total do biofilme é a água, podendo variar de 70 a 95%. A água, bem como nutrientes e genes de resistência conseguem penetrar a cadeia densa da matriz, através de canais proteicos formados para trocas gasosas e eliminação de toxinas (Menoita et al., 2012). A figura 1 mostra um modelo de um biofilme maduro proposto por Donlan e colaboradores, 2002.

**Figura 1:** Representação esquemática de um biofilme maduro



Fonte: DONLAN et al., 2002.

### 2.3.2 Formação do biofilme

A formação do biofilme pode ser dividida em quatro estágios: (I) Adesão inicial de células planctônicas nas superfícies; (II) Adesão irreversível e formação das microcolônias (III) Maturação do biofilme (IV) Liberação das células persisters (Alav et al., 2018).

#### I- Adesão inicial

Bactérias planctônicas chamadas de colonizadores primários aderem-se a uma superfície, formando um filme condicionante, que permitirá a aderência inicial (Menoita et al., 2012). Essa adesão inicial depende de condições ambientais como concentração de carbono e nitrogênio do meio, pH, temperatura, quantidade de substratos presentes na superfície, material da superfície (plástico, metal ou cobre), superfície de contato (lisa ou rugosa), bem como de condições intrínsecas a bactéria como presença de flagelos, adesinas, fímbrias e pili que irão contribuir na adesão a superfície (Menoita et al., 2012).

## II- Formação das microcolônias

Nesse estágio, inicia-se o a produção de EPS para a formação da matriz extracelular polimérica, resultando na aderência irreversível dos micro-organismos na superfície de contato. Nessa fase, os micro-organismos já aderidos à superfície, iniciam a multiplicação celular e o polissacarídeo extracelular atua como uma espécie de cola, para agrupar as células microbianas. Quando as distâncias de separação entre as células microbianas e a superfície são maiores que 50 nanômetros, as forças atrativas de Van der Waals atuam na adesão dos micro-organismos a superfície. A uma distância de 10 e 20 nanômetros, ocorrem interações de repulsão eletrostática, força que se opõe as de Van der Waals. Nessa etapa a adesão pode ser reversível, porém altera-se com o tempo para pouco reversível ou essencialmente irreversível, em razão do rearranjo da superfície da célula, levando interações de curta distância (Jamal et al., 2018).

## III- Maturação do biofilme

O terceiro estágio é caracterizado pela intensa multiplicação celular e a formação dos canais de água permitindo a entrada de proteínas, oxigênio e substratos. Nessa fase, o biofilme está na sua fase madura, com toda a sua arquitetura montada (Menoita et al., 2012).

## IV- Liberação das células *persisters* e *Quorum-sensing*

Após a formação do biofilme maduro, células microbianas específicas denominadas *persisters* são liberadas do biofilme, com o objetivo de se aderirem em outras superfícies, formando um novo biofilme em outro sítio. Essas bactérias foram inicialmente descritas por Joseph Bigguer em 1960, em seu estudo sobre a ação antimicrobiana de penicilinas em cepas de *Staphylococcus aureus*. Esse pesquisador observou que haviam algumas bactérias que eram capazes de modificar a estrutura do sítio onde atuava os antimicrobianos, impedindo a sua ligação, sendo consideradas bactérias resistentes. Já outras bactérias não modificavam o seu sítio alvo e conseqüentemente o antimicrobiano conseguia se acoplar no seu sítio de ligação específico, porém ele era ineficaz. Essas bactérias foram consideradas tolerantes aos antimicrobianos e muito mais virulentas do que as próprias bactérias resistentes, sendo denominadas células *persisters*. Essas bactérias receberam essa nomenclatura, devido a alta resistência aos antimicrobianos e células do sistema imune, tornando a infecção mais



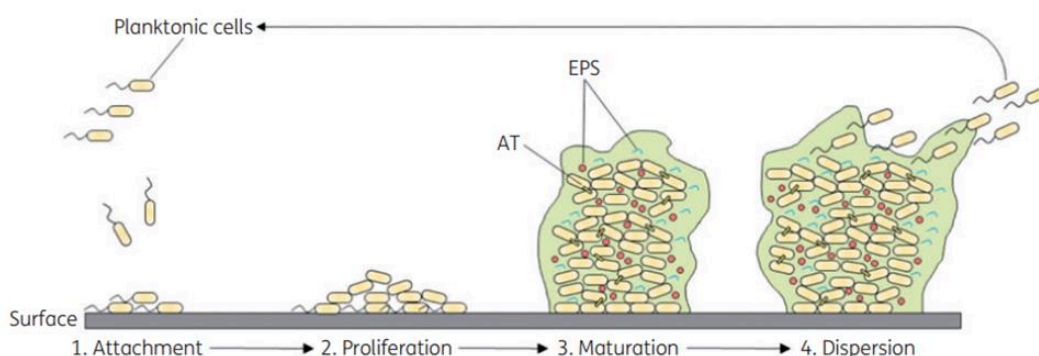
persistente e difícil de tratar, sendo portanto mais virulentas do que as próprias bactérias que permaneceram no seu biofilme de origem (Conlon et al., 2015).

Para a liberação das bactérias *persisters*, os micro-organismos dentro do biofilme adotaram um sistema de comunicação célula-célula denominado *Quorum-sensing* (QS). Essa comunicação é mediada por moléculas químicas denominadas Auto-indutores. Quando o biofilme atinge altas concentrações populacionais, os autoindutores são produzidos, ocorrendo a ligação dessa molécula química com a bactéria receptora, formando um complexo que ativa genes de transcrição em uma região denominada *box lux* (Echeverri et al., 2018).

Existem algumas diferenças no tipo de autoindutores utilizados nas diferentes espécies bacterianas, porém, três fatores são essenciais em todos os tipos de QS: detecção de AIs por receptores e ativação de genes específicos do quorum por transcritos. A constituição dos autoindutores também é variável, porém possui normalmente é formado por peptídeos. As bactérias Gram-negativas possuem um sistema de QS que consistem em moléculas químicas constituídas de lactona N-acil-homoserina (AHL) ativando genes homólogos a *LuxI* e *LuxR*. Já as Gram-positivas possuem um sistema de QS denominado *agr*, composto por duas subunidades: RNAII e RNAIII. Essas bactérias se ligam a uma transmembrana, que atua como um sensor quinase bacteriano (Kong et al., 2006).

A figura abaixo ilustra as quatro fases da formação de biofilme, bem como a liberação das células *persisters*.

**Figura 2:** Fases da formação de biofilme e liberação das células *persisters*



Fonte: Alav et al., 2018

## 2.4 Importância clínica

Aproximadamente 80% das infecções microbianas estão relacionadas ao biofilme (Chernysh et al., 2018). O biofilme desempenha um papel de reservatório de patógenos, ocasionando sérias infecções, como endocardites, osteomelites, sinusites, infecções do trato urinário, prostatite crônica, periodontite, otites e várias outras infecções hospitalares, principalmente aquelas relacionadas a dispositivos médicos, como cateter.

O número de infecções relacionadas ao biofilme nos ambientes hospitalares é significativo. Em países desenvolvidos, aproximadamente 80% dos pacientes que apresentam fibrose cística desenvolvem infecção crônica nos pulmões e nos seios paranasais. Em pacientes com feridas crônicas, mais de 60% irão desenvolver biofilmes. Dos pacientes que possuem dispositivos ortopédicos, 0,5% a 2% desenvolvem uma infecção no período de dois anos do procedimento cirúrgico. Adicionalmente, dos pacientes internados em UTI que fazem uso de cateteres intravenosos, 5 a cada 1000 desenvolvem infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de cateter, a maioria causadas por microrganismos produtores de biofilme. Além disso, cerca de 50% dos cateteres urinários implantados, tornam-se colonizados nos primeiro 10-14 dias após a inserção (Høiby et al., 2015).

Os microrganismos dentro uma unidade hospitalar podem ser transmitidos de duas formas: através da transmissão horizontal e transmissão vertical. A primeira é definida como a disseminação do patógeno de um paciente para o outro, através das mãos dos profissionais de saúde, visitantes ou o contato em superfícies contaminadas como estetoscópios e outros dispositivos médicos. A transmissão vertical é menos frequente, caracterizada pela transmissão de patógenos da mãe para o neonato durante o parto ou amamentação. Mães colonizadas por microrganismos produtores de biofilme podem transmitir esses patógenos no momento do parto, aumentando as chances do neonato adquirir infecções por esses patógenos (Ramirez et al., 2019).

Essas infecções relacionadas ao biofilme são mais persistentes e mais difíceis de combater. Esse fator de virulência é considerado como uma resistência adaptativa, tornando as bactérias sésseis de 10 a 1000 vezes mais resistente aos antimicrobianos do que as bactérias de vida livre, necessitando de antimicrobianos em concentrações mais altas (Mooney et al., 2018). Alguns estudos já mostraram que alguns antimicrobianos que são efetivos contra bactérias planctônicas não são efetivos para as bactérias sésseis (Ruiz et al., 2019). Essa resistência pode ser explicada pela impenetrabilidade dos agentes antimicrobianos e

antifúngicos devido à presença da matriz que reveste o biofilme, estratégias de liberação dos agentes antimicrobianos e antifúngicos, taxa de multiplicação alterada dos microrganismos e mudanças fisiológicas bacterianas (Wynn et al., 2012). Recentemente foi sugerido que a clínica utilizasse um valor específico de breakpoint para avaliar a susceptibilidade bacteriana frente à suspeitas de infecções associadas a biofilmes maduros, porém houve baixa aplicabilidade e outros testes para avaliar a farmacocinética do antimicrobiano são necessários para a confirmação do resultado (Ruiz et al., 2019).

Além da susceptibilidade reduzida a antimicrobianos, os biofilmes exibem resistência às células de defesa do hospedeiro, tornando a infecção mais persistente. Alguns estudos demonstraram que os biofilmes ficam circundados por anticorpos e células inflamatórias que não conseguem penetrar devido a presença da matriz extracelular (Stewart et al., 2017).

Um das estratégias do biofilme na persistência das infecções é resistir ao fluxo dos fluidos ou outras forças mecânicas que trabalham para lavar ou varrer microrganismos para fora do corpo. Como exemplo na placa dentária, um espectro de forças é exercido sobre o biofilme oral. O biofilme só se acumulará se for forte o suficiente para resistir à ruptura por forças frequentes ou é capaz de regredir nos intervalos entre as forças intensas, mas pouco frequentes. A escovação é eficaz justamente porque é suficientemente poderosa para remover grande parte do biofilme (Stewart et al., 2017).

Os biofilmes conseguem se aderir a variadas superfícies, tornando-se estável e viável por mais tempo devido a produção de matriz. Em ambientes naturais, as células microbianas necessitam adaptar-se a alterações no ambiente, enquanto que as células pertencentes ao biofilme não necessitam dessa adaptação, pois a matriz proporciona a troca de oxigênio e nutrientes orgânicos, além de proteger toda a comunidade de qualquer alteração do meio externo. A formação do biofilme permite que o micro-organismo sobreviva mesmo em ambientes hostis, até que consiga se multiplicar em um ambiente mais favorável. Nas UTIN, sabe-se que o risco de transmissão é diretamente proporcional ao tempo de sobrevivência da bactéria na unidade. Dependendo das condições ambientais, geográficas e a capacidade da bactéria em formar biofilme, esses patógenos conseguem permanecer nas superfícies neonatais por meses (Bhatta et al., 2018; Chowdhury et al., 2018).

Potencialmente, os biofilmes só se formarão em áreas molhadas ou úmidas, porém a presença de nutrientes também favorece esse fenômeno. Os procedimentos de limpeza devem assegurar a remoção eficaz de restos de alimentos e outros resíduos que possam fornecer nutrientes e ou conter microrganismos, fomentando sua multiplicação (Marques et al., 2005). Esses patógenos produtores de biofilme e multirresistentes representam um problema e saúde

pública, especialmente em países subdesenvolvidos como o Brasil, onde é comum a superlotação das unidades hospitalares e falta de recursos humanos e financeiros (Tsai et al., 2015).

Além disso, o biofilme maduro libera células de dentro do biofilme para o meio externo (células persistentes) com o objetivo de formar novas comunidades microbianas em outros sítios. Essas células persistentes são tolerantes a maioria dos antimicrobianos e substâncias de limpeza, sendo mais virulentas do que as próprias bactérias que ficaram no seu biofilme de origem. O tempo que um biofilme leva para chegar no seu estágio maduro e iniciar a liberação dessas células, varia de cada micro-organismo, porém a maioria das bactérias levam em torno de 24 horas e após liberadas, em questão de horas as células persistentes conseguem se aderir de forma irreversível nas superfícies. A contribuição das células persistentes com a patogênese da infecção vem sendo muito discutida nos últimos anos, mas já se sabe que as bactérias deficientes na produção da pili tipo IV necessária para a dispersão celular, são 200 vezes menos virulentas do que as bactérias produtoras. Essas células contribuem para a recidiva da infecção e sua persistência no paciente, contribuindo para o aumento da morbi-mortalidade das unidades hospitalares (Uppuluri et al., 2016)

## 2.5 Produção de biofilme e enzimas de resistência: um problema de saúde pública

Os microrganismos produtores de biofilme e de enzimas de resistência contribuem para a ampla disseminação de estirpes resistentes a múltiplas drogas nas UTIN, já que essas bactérias no biofilme compartilham genes de resistência, contribuindo para o aumento desses patógenos na unidade. Essas bactérias são responsáveis por implicar cronicidade, persistência e recidiva de infecções, levando a alta morbidade e mortalidade (Dumarú et al., 2019). Nos últimos cinco anos, alguns estudos apontam aumentos consistentes na colonização endêmica de microrganismos resistentes e produtores de biofilme, bem como a frequência de surtos por esses patógenos nas UTIN. Essas infecções estão frequentemente associadas ao aumento de custos para a unidade e um pior prognóstico para os neonatos, sendo um dos fatores de risco para o desenvolvimento dessas infecções o tempo prolongado de internação, pois quanto mais tempo o neonato permanece na unidade, maiores as chances de estar colonizado por patógenos epidemiologicamente importantes ou desenvolver uma infecção (Ramirez et al., 2019).

A relação do biofilme e microrganismos multirresistentes (MR) e *Staphylococcus* Resistentes a Meticilina (MRS) ainda é pouco compreendida, porém já foi descrito na literatura a relação de genes de adesão na produção de biofilme e amostras de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (MARSA). Foi observado que os microrganismos MRSA que expressavam genes que codificavam para adesinas, produziam um biofilme forte e apresentavam resistência a maioria dos antimicrobianos. Já as bactérias que não apresentavam esses genes, produziam um biofilme fraco a moderado, apresentando um perfil de resistência menor. Para a avaliação da relação da produção de biofilme e amostras MRSA são necessárias análises moleculares visando identificar esses genes e caracterizar possíveis diferenças na resistência antimicrobiana em amostras MRSA e não MRSA (Sohail et al., 2018).

Sobre a relação da produção de biofilme e amostras ESBL e AmpC, são necessários mais estudos acerca desse assunto, porém alguns já descreveram o papel do biofilme no aumento da expressão de alguns genes que codificam adesinas como *mrka*, *matB* e *pilQ* em bactérias produtoras de ESBL, aumentando a sua virulência (Alkhudhairy et al., 2019). Outro estudo como de Banerjee et al., 2019, correlacionou a produção de biofilme com a produção de AmpC, detectando que as amostras AmpC e produtoras de biofilme expressavam alguns genes em comum. Além disso, o papel dos genes plasmidiais Beta-Lactamase como um regulador dos genes associados a biofilme também já foi descrito (Schaufler et al., 2016). O contato e comunicação constante através do *Quorum-sensing* dentro de um biofilme pode facilitar a troca horizontal de informações genéticas, incluindo genes de resistência a antimicrobianos e outros fatores de virulência (Klingenberg et al., 2005).

Portanto, o monitoramento rotineiro dos microrganismos produtores de biofilme e de enzimas de resistência nas UTIN, deve ser recomendado em laboratórios clínicos, juntamente com a implementação de atividades de controle e prevenção de infecções. Além disso, a vigilância epidemiológica e o uso racional de antimicrobianos continuam sendo de extrema importância, contribuindo para criar um cenário mais favorável em relação às terapias antimicrobianas (Gkentzi et al., 2019).

Até o presente momento, ainda não se tem um método de detecção da produção de biofilme na clínica, bem como terapias totalmente efetivas e seguras para o tratamento de infecções associadas a esse fator de virulência. A produção de biofilme continua sendo um desafio na área da saúde, representando um risco principalmente para os neonatos que se encontram em situação de risco (FONG et al., 2018). Recentemente, algumas pesquisas vem tentando buscar estratégias antibiofilme através de extratos de plantas e moléculas produzidas

pelas próprias bactérias em biofilmes mistos antagônicos, na tentativa de inibir os estágios iniciais do biofilme, bem como o *Quorum-sensing*.

### **3. OBJETIVO**

Detectar a produção de biofilme por *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* isoladas das mãos dos profissionais de saúde, ambiente e corrente sanguínea de neonatos internados na UTIN do Hospital de Clínicas de Uberlândia.

### **4. RESULTADOS**

Os resultados dessa dissertação serão apresentados a seguir na forma de um artigo intitulado “Biofilm quantification produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical, environment and hands’strains using three colorimetric methods”, produtos das coletas e análises dos dados realizados durante a execução do mestrado.

**ARTIGO**

Biofilm quantification produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*  
clinical, environment and hands' strains using three colorimetric methods

## **Biofilm quantification produced by *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical, environment and hands's strains using three colorimetric methods**

### **Biofilm formation using three colorimetric methods**

Nagela Bernadelli Sousa Silva<sup>1</sup>, Priscila Guerino Vilela Alves<sup>1</sup>, Lara de Andrade Marques<sup>1</sup>, Felipe Flávio Silva<sup>1</sup>, Gabriel de Oliveira Faria<sup>1</sup>, Samuel Fernandes Silva<sup>2</sup>, Meliza Arantes de Souza Bessa<sup>2</sup>, Ralciane de Paula Menezes<sup>3</sup>, Lúcio Borges de Araújo<sup>4</sup>, Reginaldo dos Santos Pedroso<sup>3</sup>, Mário Paulo Amante Penatti<sup>3</sup>, Denise von Dolinger de Brito Röder<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>- Postgraduate Program in Health Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG;

<sup>2</sup>- Discente of the course of Graduation in Biology, Institute of Biology, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG;

<sup>3</sup>- Technical Course in Clinical Analysis, Technical School of Health (ESTES), Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG;

<sup>4</sup>- Federal University of Uberlândia, College of Mathematics, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>5</sup>- PhD in Clinical Microbiology. Institute of Biomedical Sciences. Associate Professor at the Federal University of Uberlândia, MG, Brazil.

**Corresponding author:** Nagela Bernadelli Sousa Silva

Av. Amazonas - Umuarama, Uberlândia - MG, 38405-317

Tel: 55 (34) 9 9894-2162

Email: nagela\_bernadelli.mg@hotmail.com



### Abstract

**Introduction:** *Klebsiella* species are opportunistic pathogens able to produce biofilms on biotic and abiotic surfaces, which is directly associated with hospital infections. **Objectives:** The aim of this study was to investigate biofilm production of clinical, environment and hand's strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*, using three colorimetric detection methods. **Methods:** The evaluate of biofilm production was done by microplate method using Crystal-violet to evaluate biomass, Safranin to extracellular matrix and 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl-5(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) to metabolic activity. Additionally, the number of viable cells present in the biofilm were quantified by counting the Colony Forming Units (CFU). **Results:** Of the twenty-eight isolates of *K. pneumoniae* and five of *K. oxytoca* used in the study, all were able to adhere to polystyrene surface by the three methods used in the study. However, *K. pneumoniae* strains were more effective in producing biomass biofilm and extracellular matrix than *K. oxytoca* strains. There were no statistically significant differences in the metabolic activity. The number of viable cells varied from  $1.0 \times 10^8$  to  $8.1 \times 10^8$ . **Conclusion:** These results shows that *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains have ability to adhere in the polystyrene plate producing biofilm biomass, extracellular matrix and metabolic activity. This ability represents an advantage and ideal niche for its extended prevalence in hospital settings and in various hostile environments, making treatment difficult and worsening the prognosis of neonates, increasing morbidity and mortality in the unit. Additionally, this study demonstrated the use of Crystal-violet, Safranin, XTT and CFU as an inexpensive and highly reproducible tool to study *Klebsiella* species bacterial biofilm.

**Keywords:** Biofilm production, *Klebsiella spp.*, neonates.

## Introduction

*Klebsiella* species are important nosocomial pathogen frequently involved in Neonatal Intensive Care Unit (NICU) outbreaks, with mortality around 30-40% associated to longer hospital stays. The hospital environment is susceptible to be contaminated in a rate close to 14%, with about 4% due to *K. pneumoniae* (Cadot et al., 2019; Ruiz et al., 2019).

Neonates admitted in NICU often require supporting medical devices and antibiotic treatment. The intensive care treatment associated with their immature immune system and the increased permeability of mucosa may become the neonates highly vulnerable to colonization and subsequent infections when exposed to pathogens. This situation could be even more alarming when this microorganism show the ability to form biofilm (Juma et al., 2015).

*K. pneumoniae* strains have the ability to produce biofilms on biotic and abiotic surfaces, which is directly associated to hospital-acquired infections. Biofilm structures protect *K. pneumoniae* from commonly used disinfectants, antibiotics and the attack of host immune (Cepas et al., 2019; Ostria-Hernandez et al., 2018). Additionally, some virulence factors found in *K. oxytoca* biofilm producer isolates, have shown increased pathogenicity of this bacteria, causing persistent infections and difficult to eradicate.

In order to understand biofilm production and biofilm acquired nosocomial infections, the investigation of biofilm production levels of these microorganisms becomes necessary (Gupta et al., 2019).

The aim of this study was to investigate biofilm production of clinical, environment and hand's *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* strains in NICU, using three colorimetric detection methods.

## Methods

### Samples

The samples used in the study were collected between March to December 2018 from environment, healthcare worker's hands and blood culture at the NICU of Clinical Hospital of Uberlandia. The hospital has 520 beds, of which 20 belong to the NICU. These strains were stored in Brain Heart Infusion (BHI) broth with 20% glycerol at -20°C until use. Test organisms were grown in a Tryptic Soy Broth (TSB) overnight at 37° C to biofilm research. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 35984 and ATCC 13182 *Klebsiella oxytoca* were used as control.

### **Biofilm formation**

The research of biofilm formation was done using the microplate technique as already shown by Merrit et al., 2007. The samples was suspended from the stock for four  $\mu\text{L}$  of TSB and incubated overnight at  $37^\circ\text{C}$ . Then the overnight cultures were diluted 1:100 into fresh medium to avoid the saturation of the medium. One hundred microliters of this dilution were added in the plates 96-well polystyrene and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24h. For quantification assays, the tests were done in triplicate and repeated three times.

### **Quantification of biofilm**

Measurement of biofilm formation was done by three methods: crystal violet to evaluate biomass, safranin to extracellular matrix, 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) to metabolic activity. The tests were done in triplicate and read in an ELISA plate reader (BioTek) at 595 nm for Crystal-violet, 530 nm for Safranin and 495 nm for XTT method. Sterile TSB were used as negative control. The tests were done three times independently. Additionally, the number of viable cells present in the biofilm were quantified by counting the Colony Forming Units (CFU).

#### ***Biomass quantification***

The biomass of biofilm was done by crystal violet staining as described previously (O'Toole et al., 2011). After 24 hours incubation of the polystyrene plates, the wells were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) to remove the non-adherent cells. Each well were stained with 125  $\mu\text{L}$  of 0,1% crystal violet solution for 15 min. To remove excess dye the wells were rinsed three times with sterile distilled water. Then, a suspension of 30% acetic acid in distilled water ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) was added to each well to solubilize the crystal violet and incubated at room temperature for 15 min. The wells were measured in a microtiter plater at 595nm.

#### ***Extracellular matrix quantification***

For this quantification, after 24h incubation of the polystyrene plates, the wells were washed with PBS to remove the non-adherent cells. Then, 125  $\mu\text{L}$  of 0,1% safranin were added and incubated at room temperature for 15 minutes. To remove excess of dye, another washing was done with  $\text{DH}_2\text{O}$  and left at room temperature for 30 seconds. A suspension of 33% of acetic acid were added and the wells were read at 530nm (Stepanović et al., 2007).

### ***Metabolic activity quantification***

After 24h incubation of the polystyrene plates, the wells were washed with PBS to remove non-adherent bacteria. Then, aliquots of 50  $\mu\text{L}$  of XTT salt solution ( $1\text{mg mL}^{-1}$  in PBS) and 4  $\mu\text{L}$  of vitamin K were added to each well and incubated at  $37\text{C}^\circ$  for 3h. The electron transport system in the cellular membrane of live bacteria reduces XTT tetrazolium salt to XTT formazan changing the color of the wells to orange. The reading was made at 495 nm (Chandra et al., 2008).

### **Colony Forming Unit enumeration**

Adhered cells and the biofilms formed after 24h of incubation in the microplate wells were washed with PBS to remove the non-adherent bacteria. Then 100  $\mu\text{L}$  of PBS were added to each well, to scraping of the adhered cells. The resulting suspension was placed in falcon tube and was shaken for 30s with vortex. After a serial dilution ( $10^{-1}$  to  $10^{-6}$ ) were done and 100  $\mu\text{L}$  of the highest dilution ( $10^{-6}$ ) were drop plated in Petri dishes of Trypticase Soy Agar (TSA) using a drigalski handle. The plates were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 48 hours. The colonies were counted in each Petri dish (Melo et al., 2011).

### **Interpretation of results**

Biofilm formation was interpreted according to Stepanovic et al., 2007. The Optical Density Cut-off value (ODc) was established as three standard deviations (SD) above the mean of the optical density (OD) of the negative control:  $\text{ODc} = \text{average OD of negative control} + 3 \times \text{standard deviation (SD) of negative control}$ . For easier interpretation of the results, the strains were divided into the following categories according to their OD:  $\text{OD} < \text{ODc}$  = non-biofilm producer;  $\text{ODc} < \text{OD} < 2 \times \text{ODc}$  = weak biofilm producer;  $2 \times \text{ODc} < \text{OD} < 4 \times \text{ODc}$  = moderate biofilm producer;  $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$  = strong biofilm producer (Stepanović et al., 2007).

### **Statistical analysis**

Quantitative assays were compared using t-test for a sample. For the comparison of the three tests used and biofilm formation for the two bacterial species used in the study, the ANOVA followed by the Tukey test was used. All test were performed with statistical significance of  $P < 0,001$ .

## Research ethics

The study was conducted in accordance with the Commitment of ethics in research with human beings number n. 2.678.16.

## Results

In total 28 samples of *Klebsiella pneumoniae* and five of *Klebsiella oxytoca* were used in the study from blood, hands and environment, as shown in table 1.

The ability of the *Klebsiella* spp. isolates to form biofilms was investigated and biofilm formation was compared among the *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains, after 24h of incubation in polystyrene microtiter wells. Of the twenty-eight isolates of *K. pneumoniae* and five of *K. oxytoca*, all were able to produce biofilm, as show in figure 1.

We also used an established protocol to compare biomass, extracellular matrix and metabolic activity of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains using the Crystal-violet, Safranin and XTT reduction, respectively. The table 2 shows the mean optical density of biofilm formation of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains by the three methods.

By Crystal-violet method, 8 (28,6%) *K. pneumoniae* strains (Kp 1.1, Kp 10, Kp 15, Kp 17, Kp 21, Kp 68, Kp 85 and Kp 9) produced extensive biofilms mass, being statistically higher than the positive control ( $P < 0.001$ ). However, 7 (25,0%) *K. pneumoniae* strains (Kp 137, Kp 142, Kp 145, Kp 3, Kp 4, Kp 92 and Kp 98) were less effective in producing biofilm mass, with absorbance value below the positive control ( $P < 0.001$ ). The other 13 (46,4%) *K. pneumoniae* strains were not different in adhesion compared to the positive control.

Regarding extracellular matrix production, 4 (14,2%) *K. pneumoniae* strains (Kp 10, Kp 100, Kp 72 and Kp 85) were able to produce more extracellular matrix than positive control ( $P < 0.001$ ). However, 12 (42,8%) *K. pneumoniae* strains (Kp 1, Kp 137, Kp 140, Kp 142, Kp 145, Kp 17, Kp 3, Kp 40, Kp 50, Kp 63, Kp 92 and Kp 98) showed lower production compared to the positive control ( $P < 0.001$ ). The other 12 (43,0%) *K. pneumoniae* strains showed similar behavior to the positive control.

For the production of metabolic activity, 3 (10,7%) *K. pneumoniae* strains (Kp 20, Kp, 4 and Kp 85) produced more metabolic activity than positive control ( $P < 0.001$ ), while 4 (14,3%) *K. pneumoniae* strains (Kp 126, Kp 142, Kp 15, Kp and Kp 63) produced less ( $P < 0.001$ ). The other 20 (71,0%) *K. pneumoniae* strains did not show statistically significant differences compared to the positive control.

Regarding five *K. oxytoca* strains, 3 (60,0%) were less effective in producing biofilm biomass (Ko 125, Ko 143, and Ko 6), with absorbance values below to the positive control ( $P$

<0.001). The other two (40,0%) *K. oxytoca* strains (were not different in adhesion compared to the positive control.

For extracellular matrix production, all *K. oxytoca* strains produced less to the positive control ( $P < 0.001$ ), while for metabolic activity production 3 (60,0%) *K. oxytoca* (Ko 66, Ko 125, Ko 143) strains showed different behavior to the positive control ( $P < 0.001$ ). The other 2 (40,0%) strains did not show statistically significant differences to the positive control.

In general, 14 (42,4%) *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains produced more biofilm than to the positive control, at least one method. Eleven (78,57%) were isolated from the hands, two from the environment (14, 29%) and one from the blood (7,14%). Fifteen (45,5%) *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains were less effective in producing biofilm compared to the positive control, at least one method. Fourteen (94,2) were isolated from the hands and one (6,6%) from the blood. The other four (12,2%) samples were not different in adhesion compared to the positive control.

To evaluate the number of viable cells present in each biofilm, the CFU test was performed. The number of adhered cells to the polystyrene surface varied according to the strain, ranging from  $1.0 \times 10^8$  to  $8.1 \times 10^8$ . The statistical analysis showed, that number of viable cells present in the biofilm produced by *Klebsiella pneumoniae* strains does not show difference from the number of cells present in the biofilm produced by *Klebsiella oxytoca*.

The figure 2 shows the average of all absorbance values of biofilm production of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* obtained by Crystal-violet, Safranin and XTT methods. Through this average, biofilm production was evaluated among these two species considering biomass, extracellular matrix and metabolic activity production. It was observed that *K. pneumoniae* strains isolated from environment and hands, are more effective in producing biofilm mass and extracellular matrix than *K. oxytoca* strains isolated from the same locations ( $P < 0,001$ ). However regarding metabolic activity production, the two species did not present statistically significant differences, showing similar metabolic behavior.

Biofilm formation was classified in weak, moderate and strong formation according to Stepanovick (2007). Even with differences in the level of biofilm production of each species, through the three methods used, all isolates of *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* studied (33/33) formed strong biofilms in polystyrene plates. There were no weak biofilm producers in our observations.

Regarding of the three colorimetric detection methods used in the study to evaluate the biofilm formation, the obtained values of Crystal-violet and Safranin are more similar than the values obtained by XTT, as shown in figure 3. Considering the average of all OD values of

biofilm formation of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains by Crystal-violet (Mean OD 1.86) Safranin (Mean OD 1.33) and XTT (Mean OD 0.56), the method with the highest absorbance value was Crystal-violet.

## Discussion

Biofilms are the complex structural consortium of exopolysaccharide matrix, of microbial origins and shaped by many host factors, within which bacteria lives. These microbial communities are extensively investigated over the past few decades mainly due to the involvement in almost 80% of bacterial infections. *Klebsiella* isolates forms biofilm as an essential step in its pathogenesis. The biofilm can be formed on the skin, soft tissues, lungs, urinary bladder and other sources (Singh et al., 2019).

Several studies have shown the ability of *Klebsiella* strains to form biofilm on biotic and abiotic surfaces (Juma et al., 2015; Campos et al., 2015). In this study, of the 33 *Klebsiella* isolates isolated from the hands of health professionals, blood of neonates and environment, all samples were able to produce biofilm in polystyrene surface, being considered biofilm producer's strains. These data are corroborate by Yang and Zhang (2008) that demonstrated the ability of 150 *K. pneumoniae* strains to produce biofilm evaluated with crystal violet. These results are alarming because *Klebsiella*-producing biofilm *in vivo* results in more difficult to treat infections (Juma et al., 2015).

The prerequisites for optimal biofilm formation vary considerably among bacteria and their composition is likely to be unique for each hospital. The matrix content of a biofilm as well as biofilm biomass formation and metabolic activity, could differ in quantity and nature of its constituents, depending on the environment factors (Costa et al., 2019; Singh et al., 2019). Unfortunately, the majority of published studies evaluate biofilm production only by crystal violet and/or Congo red agar experiments without assessing the biofilm cell concentration or adherence. In our study, we evaluated the biofilm biomass, extracellular matrix and production of metabolic activity by Crystal-violet, Safranin and XTT methods, respectively.

Environment contamination has been estimated to be the source of pathogenic bacteria involved in 20% of Healthcare associated infections (HAIs). Additionally, 25-79% of noncritical medical devices have been found to be contaminated, therefore, this microorganism contaminating may be sourced from any part of the hospital environment (Chowdhury et al., 2018). Within biofilms, bacteria are more resistant to desiccation, more difficult to remove during cleaning and are more persistent to disinfectants, which become

the cleaning of surfaces a challenge. Several bacteria have been shown to survive for months on dry hospital contact surfaces, including *Acinetobacter* spp. for 3 days to 11 months and *Klebsiella* spp. remained viable between 2h and 20 months (Costa et al., 2019; Slate et al., 2019). In this study, the *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains isolated from the environment were able to produce extensive biofilm at least one method.

Additionally, it has been estimated that 20-40% of pathogenic bacteria are thought to be sourced from healthcare workers' hands, which are just as likely to be contaminated by the environment (Costa et al., 2019). Only ungloved hand contact with a contaminated surface results in a variable degree of pathogens transfer, with planktonic bacterial transfer rates, of between 38 to 65% occurring from surfaces to hands (Chowdhury et al., 2018). In our study, 35,7% of *K. pneumoniae* strains isolated from hands produced extensive biofilms and 20,0% of *K. oxytoca* strains isolated in the same source produced activity metabolic, more than positive control, at least in one method used in the study. The other samples had biofilm producing similar to the positive control. This is alarming since bacteria within dry surface biofilms have been shown to survive for more than 12 months. In biofilm, these bacteria are protected from desiccation and the biofilm formed in dry surface like hands, play a role in the endemic transmission of HAI (Thair et al., 2019).

In this study two isolated from blood produced extensive biofilms at least one method tested, and it is particularly alarming in neonates, since *Klebsiella* biofilm formation, in these immunocompromised patients, often results in worsening of the patient's prognosis, since biofilms can protect bacterial cells against the host immune responses and antimicrobial therapies (Wang et al., 2017).

*Klebsiella* species produce biofilms via several types of adhesive structures found in both *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* (Ghasemian et al., 2018). However our data shows that *K. pneumoniae* strains were more effective of producing biofilm biomass and extracellular matrix than *K. oxytoca*. These data are corroborated by Maldonado (2007) that observed differences in biofilm production of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains. This author showed that *K. pneumoniae* strains isolated from a urinary catheter produced the highest biofilm, while *K. oxytoca* strains produced a poor biofilm. Curiel (2013) also states that there are differences in the composition of the matrix among the species of *K. oxytoca* and *K. pneumoniae*, mainly in the production of fimbrial adhesins. In their study Curiel (2013) observed that some strains showed abundant fimbrial adhesins while others showed moderate to no production.

In recent years, there has been an increased research focus on the matrix in biofilms, which has led to a better comprehension of matrix complexity, its structural, chemical and



physical organization, being mainly used the confocal microscopy (Reichhardt et al., 2019). This study demonstrated that that it is possible to detect and quantify matrix through safranin dye. Although not a visual method, it's a dye which selectively stains acid mucopolysaccharides (Stepanovic et al., 2007). It's a simple, quick and inexpensive technique to be reproduced in research laboratories in biofilms, constituting as an alternative in the absence of an electronic microscopy.

Even with these differences in the production of biomass and extracellular matrix, both samples of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* were classified as strong biofilm producers, following Stepanovic (2007). However, these data differ from the data found by Campos (2015). In their study of 10 clinical samples of *K. pneumoniae*, four were classified as moderate, six as poor producers and one as a strain non-biofilm-producer. Araujo (2019) also studied clinical and environment *K. pneumoniae* strains and showed that only the clinical strains was classified as moderate biofilm producer, while the others samples were strong biofilm producers. This classification is subjective and varies according to the parameter used for classification.

There one results that required to be further discussed and studied. Some *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains were able to produce more biofilm biomass than to the control but these same sample, were less effective in metabolic activity. Biofilms formation are a dynamic process controlled by internal mechanism, such as genes, regulatory reaction and *Quorum* -sensing. However, the expression and locus of these genes differs among bacteria species. Besides that, various testing times could also affect the biofilm-related protein expression. This could be the major cause of these different results (Xu et al., 2016).

In summary, these results shows that *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains have ability to adhere in the polystyrene plate producing biofilm biomass, extracellular matrix and metabolic activity, being confirmed by the Crystal-violet, Safranin and XTT methods respectively, characterized as strong biofilm formation. This ability represents an advantage and ideal niche for its extended prevalence in hospital settings and in various hostile environments, which constitutes a reservoir of pathogens, surviving longer due to the formation of the biofilm, and can be transferred through the hands. Both *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* are able to produce biofilm via several types of adhesins, but this study has shown that *K. pneumoniae* is more effective in view of the three methods of the study. Futhermore, despite some differences between methods, our study demonstrated the use of Crystal-violet, Safranin, XTT and CFU as a tool to study *Klebsiella* species bacterial biofilm, being cheap and highly reproducible.

## Acknowledgment

We would like to thank the Federal University of Uberlândia for the support and encouragement of this work. We also thank A Prof Poliana de Castro Melo for all the important considerations that were valuable for the writing of this work. Prof. Maria José Gianni and all of the Mycology laboratory at the Paulista State University for all the help that was essential for this work to be done . To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial aid and Escola Técnica em Saúde (ESTES) for the availability of the laboratory and all financial aid for the development of this work.

## Conflict of interest

No declared conflict of interest.

## References

Araújo LCA, Purificação-Júnior AF, Silva SM, Lopes ACS, Veras DL, Alves LC, et al. In vitro evaluation of mercury (Hg<sup>2+</sup>) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;169:669-77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.036>.

Alcántar-Curiel, María Dolores et al. Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed research international*, v. 2018, 2018..

Cadot L, Bruguière H, Jumas-Bilak E, Didelot MN, Masnou A, Barry G, et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak reveals incubators as pathogen reservoir in neonatal care center. *Eur J Pediatr* 2019;178:505-13. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03323-w>.

Cepas V, López Y, Muñoz E, Rolo D, Ardanuy C, Martí S, et al. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist* 2019;25:72-9. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>.

Chandra, J., Mukherjee, P. K. & Ghannoum, M. A. (2008). In vitro growth and analysis of *Candida* biofilms. *Nat Protoc* 3, 1909–1924. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.192>.

Chowdhury D, Tahir S, Legge M, Hu H, Prvan T, Johani K, et al. Transfer of dry surface biofilm in the healthcare environment: the role of healthcare workers' hands as vehicles. *J Hosp Infect* 2018;100:85-90. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.021>.

COSTA, D. M. et al. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Letters in Applied Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 269-276, 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13127>

Melo PC, Sousa C, Botelho C, Oliveira R, Nader-Filho A. NaOCl effect on biofilm produced by *Staphylococcus aureus* isolated from the milking environment and mastitis infected cows. *Pesq Vet Bras* 2014;34:109-13. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200002>.

Costa DM, Johani K, Melo DS, Lopes LKO, Lopes Lima LKO, Tipple AFV, et al. Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett Appl Microbiol* 2019;68:269-76. <https://doi.org/10.1111/lam.13127>.

Ghasemian A, Mobarez AM, Peerayeh SN, Bezmin Abadi AT. The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes New Infect* 2018;27:36-9. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.07.001>.

Gupta A, Cheepurupalli L, Vigneswaran S, Singh Rathore S, Suma Mohan S, Ramakrishnan J. In vitro and in silico investigation of caprylic acid effect on multi drug resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *J Biomol Struct Dyn* 2019:1-9. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1581087>.

Juma NA, Forsythe SJ. Microbial biofilm development on neonatal enteral feeding tubes. *Adv Exp Med Biol* 2015;830:113-21. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-7_7)

Maldonado NC, Ruiz CS, Cecilia M, Nader-Macias ME. A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology* 2007:52-9.

Merritt, Judith H.; KADOURI, Daniel E.; O'TOOLE, George A. Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology*, v. 22, n. 1, p. 1B. 1.1-1B. 1.18, 2011. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s22>

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp* (47). <https://doi.org/10.3791/2437>

Ostria-Hernandez ML, Juárez-de la Rosa KC, Arzate-Barbosa P, Lara-Hernández A, Sakai F, Ibarra JA, et al. Nosocomial, Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Mexico City Produce Robust Biofilms on Abiotic Surfaces but Not on Human Lung Cells. *Microb Drug Resist* 2018;24:422-33. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0073>.

Reichhardt C, Parsek MR. Confocal laser scanning microscopy for analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture and matrix localization. *Front Microbiol* 2019;10:677. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00677>

RUIZ, Jesus et al. In vitro study of antimicrobial activity on *Klebsiella Pneumoniae* biofilms in endotracheal tubes. *Journal of Chemotherapy*, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1601801>

Singh AK, Yadav S, Chauhan BS, Nandy N, Singh R, Neogi K, et al. Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro Biofilm forming capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry with special reference to the Protein content. *Front Microbiol* 2019;10:669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00669>.

Slate AJ, Shalamanova L, Akhidime ID, Whitehead KA. Rhenium and Yttrium ions as antimicrobial agents against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13154>.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* 2007;115:891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x).

Maldonado NC, Ruiz CS, Cecilia M, Nader-Macias ME. A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology* 2007:52-9.

Tahir, Shamaila et al. Transmission of *Staphylococcus aureus* from dry surface biofilm (DSB) via different types of gloves. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 40, n. 1, p. 60-64, 2019. <https://doi.org/10.1017/ice.2018.285>

Maldonado NC, Ruiz CS, Cecilia M, Nader-Macias ME. A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology* 2007:52-9.

Xu, Zhenbo et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current microbiology*, v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>

Yang D, Zhang Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Hosp Infect* 2008; 68:369–71. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.02.001>.

Wang H, Li W, Gu L, Gao X, Ni B, Deng H, et al. Emergence of two distinct subpopulations from *Klebsiella pneumoniae* grown in the stimulated microgravity environment. *Future Microbiol* 2017;12:939-51. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0032>.

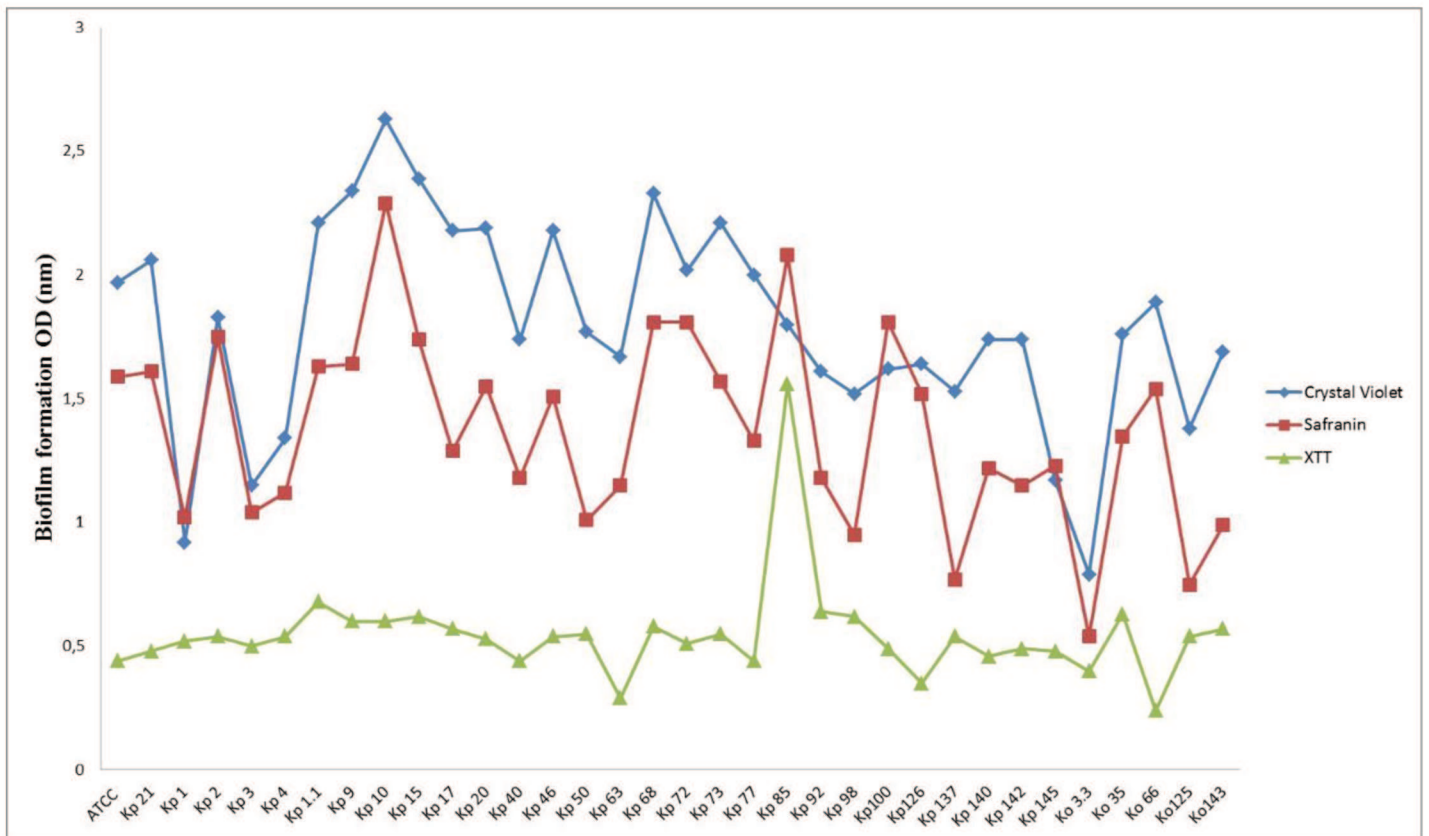
**Table 1** List of microorganisms included in the study and their isolation sites.

<b>Isolate (n=33)</b>	<b>Bacterial species</b>	<b>Site of isolation</b>
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Kp 21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Environment
Kp 1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blood
Kp 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blood
Kp 3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blood
Kp 4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Blood
Kp 1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 63	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 68	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 72	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 73	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 77	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 98	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 100	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 137	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 140	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 142	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
Kp 145	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hand
ATCC 13182	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Ko 3.3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Environment
Ko 35	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hand
Ko 66	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hand
Ko 125	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hand
Ko 143	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Hand

**Tabela 2:** Biofilm production by the three colorimetric methods and CFU of *Klebsiella* species

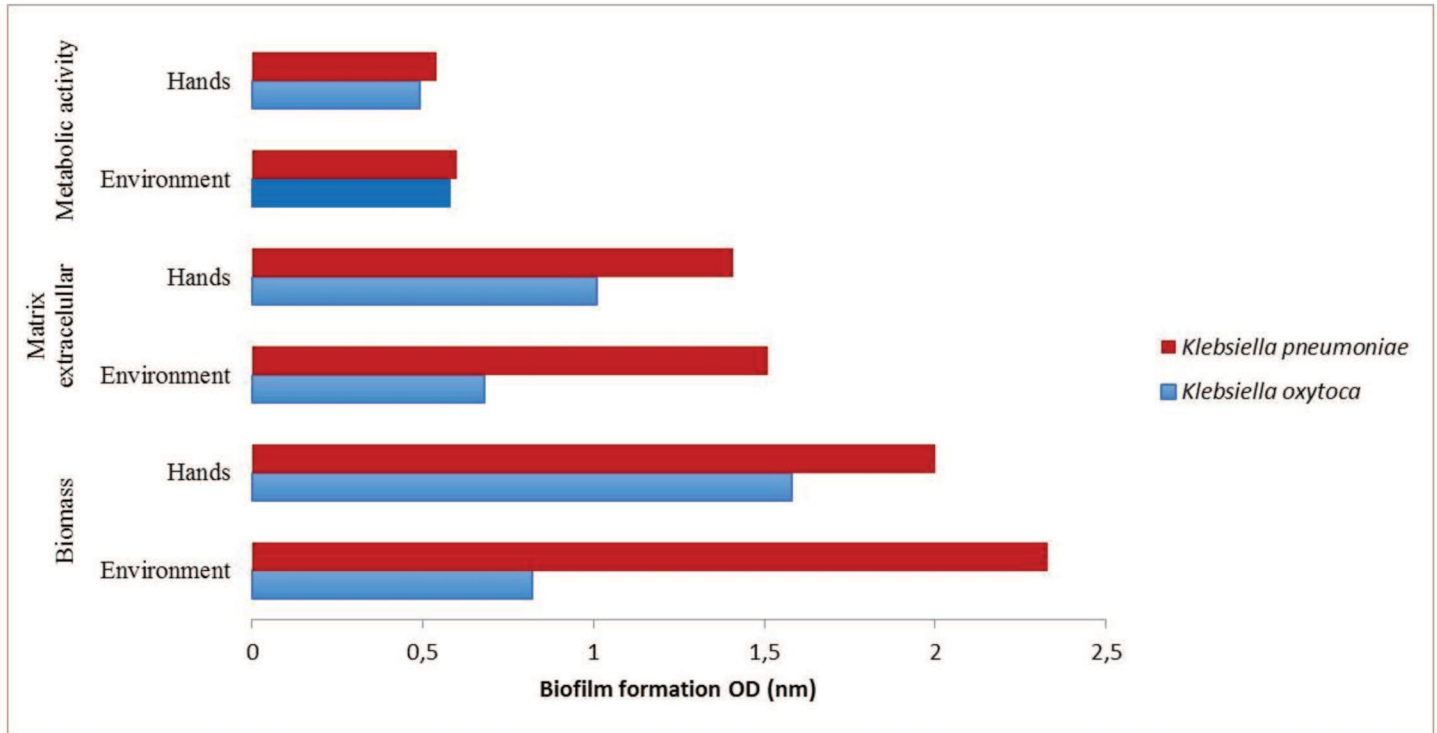
Isolates	Biomass Mean OD	Extracellular matrix Mean OD	Metabolic activity Mean OD	Viable cells
<i>K.pneumoniae</i>				
ATCC 35984	1,97	1,59	0,44	6.2x10 <sup>8</sup>
Kp 21	2,33*	1,51	0,60	2.2x10 <sup>8</sup>
Kp 1	1,51	1,14*	0,64	3,1x10 <sup>8</sup>
Kp 2	1,70	1,66	0,64	7,2x10 <sup>8</sup>
Kp 3	1,30*	1,06*	0,63	6,6x10 <sup>8</sup>
Kp 4	1,55*	1,22	0,84*	2,4x10 <sup>8</sup>
Kp 1.1	2,49*	1,24	0,63	5,4x 10 <sup>8</sup>
Kp 9	2,59*	1,42	0,57	4,3x10 <sup>8</sup>
Kp 10	2,77*	2,27*	0,55	1,0x10 <sup>8</sup>
Kp 15	2,52*	1,43	0,38*	5,7x10 <sup>8</sup>
Kp 17	2,35*	1,24*	0,55	1,1x10 <sup>8</sup>
Kp 20	2,15	1,43	0,48*	8,1x10 <sup>8</sup>
Kp 40	1,83	1,13*	0,43	6,6x10 <sup>8</sup>
Kp 46	2,25	1,57	0,55	2,3x10 <sup>9</sup>
Kp 50	1,85	0,88*	0,46	2,6x10 <sup>9</sup>
Kp 63	1,77	0,79*	0,27*	7,9x10 <sup>8</sup>
Kp 68	2,19*	1,73	0,53	5,0x10 <sup>8</sup>
Kp 72	1,81	1,99*	0,57	4,3x10 <sup>9</sup>
Kp 73	2,09	1,69	0,85	6,8x10 <sup>8</sup>
Kp 77	2,04	1,54	0,53	7,8x10 <sup>8</sup>
Kp 85	2,59*	2,39*	1,01*	1,2x10 <sup>8</sup>
Kp 92	1,50*	1,24*	0,53	7,7x10 <sup>8</sup>
Kp 98	1,53*	1,03*	0,64	2,3x10 <sup>8</sup>
Kp100	1,91	1,82*	0,59	2,6x10 <sup>8</sup>
Kp126	1,68	1,65	0,36*	1,3x10 <sup>8</sup>
Kp 137	1,60*	0,81*	0,56	4,6x10 <sup>8</sup>
Kp 140	1,72	1,19*	0,46	1,6x10 <sup>8</sup>
Kp 142	1,55*	0,96*	0,37*	6,0x10 <sup>8</sup>
Kp 145	1,07*	1,04*	0,60	1,3x10 <sup>9</sup>
<i>K. oxytoca</i>				
ATCC 13182	1,85	1,45	0,43	5,2x10 <sup>8</sup>
Ko 3.3	1,26*	0,79*	0,50	5,8x10 <sup>8</sup>
Ko 35	1,38*	0,80*	0,54	6,6x10 <sup>8</sup>
Ko 66	0,82*	0,68*	0,58*	4,8x10 <sup>8</sup>
Ko125	1,86	1,18*	0,62*	4,1x10 <sup>9</sup>
Ko143	1,84	1,29*	0,29*	2,4x10 <sup>8</sup>

\* Amostras estatisticamente significantes  $P < 0,001$



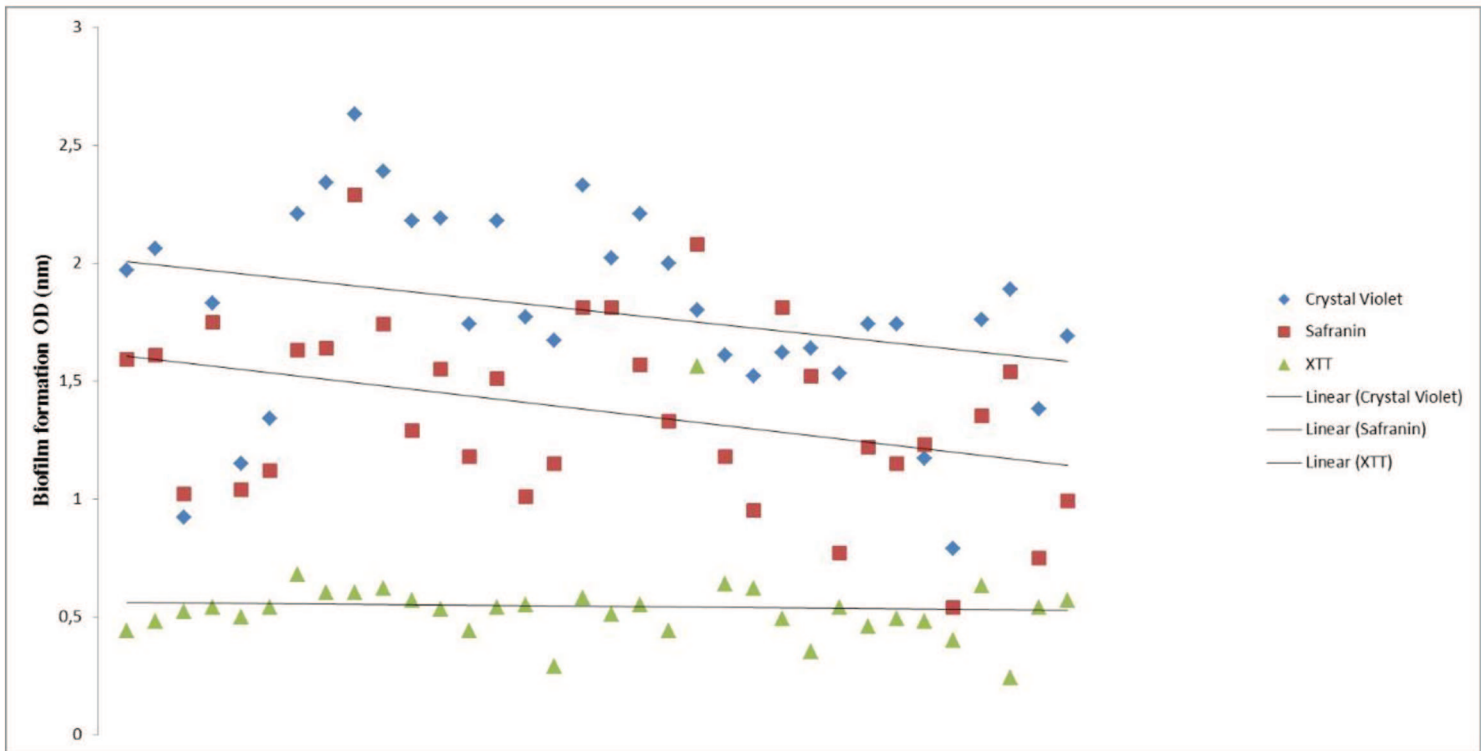
**Fig 1:** Analysis of biofilm formation through Crystal-Violet, Safranin and XTT methods.

Biofilm-producing samples were considered those with  $OD > 0.1$ .



**Fig 2:** Comparison biofilm production by *K. oxytoca* and *K. pneumoniae* strains used in the study.





**Fig 3:** Comparison of the three methods for detection of biofilm formation by *Klebsiella* spp.

## Referências

- Ahmed DM, Messih MAWA, Ibrahim NH, Meabed MH, Abdel-Salam SM. Frequency of *icaA* and *icaD* determinants and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci associated with nasal carriage in neonatal intensive care units. *Germs*, v. 9, n. 2, p. 61, 2019. <http://doi.org/10.18683/germs.2019.1159>
- Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018. <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>
- Alkhudhairy MK, Alshadeedi SMJ, Mahmood SS, Al-Bustan SA, Ghasemian A. Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. *Microbial pathogenesis*, v. 134, p. 103558, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103558>
- Awad HA, Mohamed MH, Badran NF, Mohsen M, Abd-Elrhman AS. Multidrug-resistant organisms in neonatal sepsis in two tertiary neonatal ICUs, Egypt. *Journal of the Egyptian Public Health Association*, v. 91, n. 1, p. 31-38, 2016. <https://doi.org/10.1097/01.EPX.0000482038.76692.3>
- Banerjee A, Bardhan R, Chowdhury M, Joardar SN, Isore DP, Batabyal K, et al. Characterization of beta-lactamase and biofilm producing Enterobacteriaceae isolated from organized and backyard farm ducks. *Letters in applied microbiology*, v. 69, n. 2, p. 110-115, 2019. <https://doi.org/10.1111/lam.13170>
- Basu S. Neonatal sepsis: the gut connection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 34, n. 2, p. 215-222, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2232-6>
- Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS microbiology reviews*, v. 43, n. 2, p. 123-144, 2018. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>
- Bhatta DR, Hamal D, Shrestha R, Hosuru Subramanya S, Baral N, Singh RK, et al. Bacterial contamination of frequently touched objects in a tertiary care hospital of Pokhara, Nepal: how safe are our hands?. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 7, n. 1, p. 97, 2018. <http://doi.org/10.1186/s13756-018-0385-2>
- CONLON, Brian P.; ROWE, Sarah E.; LEWIS, Kim. Persister cells in biofilm associated infections. In: *Biofilm-Based Healthcare-Associated Infections*. Springer, Cham, 2015. p. 1-9. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-09782-4_1)
- Echeverri FCE. The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation and the Activity of the Autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. *Biomolecules*, v. 9, n. 2, p. 49, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9020049>
- Chernysh S, Gordya N, Tulin D, Yakovlev A. Biofilm infections between *Scylla* and *Charybdis*: interplay of host antimicrobial peptides and antibiotics. *Infection and drug resistance*, v. 11, p. 501-514, 2018. <https://doi.org/10.2147/IDR.S15784>

Chowdhury D, Tahir S, Legge M, Hu H, Prvan T, Johani K, et al. Transfer of dry surface biofilm in the healthcare environment: the role of healthcare workers' hands as vehicles. *Journal of Hospital Infection*, v. 100, n. 3, p. e85-e90, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.021>

Del Pozo JL. Biofilm-related disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 16: 51-65, 2018. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1417036>

Djordjevic ZM, Markovic-Denic L, Folic MM, Igrutinovic Z, Jankovic SM. Health care-acquired infections in neonatal intensive care units: Risk factors and etiology. *American journal of infection control*, v. 43, n. 1, p. 86-88, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.10.005>

Donà D, Mozzo E, Mardegan V, Trafojer U, Lago P, Salvadori S et al. Antibiotics prescriptions in the neonatal intensive care unit: how to overcome everyday challenges. *American journal of perinatology*, v. 34, n. 12, p. 1169-1177. 2017. <http://doi.org/10.1055/s-0037-1602426>

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>

Dumaru R; Ratna B, Shrestha LB. Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. *BMC research notes*, v. 12, n. 1, p. 38, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4084-8>

Erskine E, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Functional amyloid and other protein fibers in the biofilm matrix. *Journal of molecular biology*, v. 430, n. 20, p. 3642-3656, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.026>

Fong J, Zhang C, Yang R, Boo ZZ, Tan SK, Nielsen TE, et al. Combination therapy strategy of quorum quenching enzyme and quorum sensing inhibitor in suppressing multiple quorum sensing pathways of *P. aeruginosa*. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1155, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19504-w>

Giuffrè, Mario et al. The increasing challenge of multidrug-resistant gram-negative bacilli: results of a 5-year active surveillance program in a neonatal intensive care unit. *Medicine*, v. 95, n. 10, 2016. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003016>.

Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, de Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of dairy science*, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5864>

Gkentzi D, Kortsalioudaki C, Cailles BC, Zaoutis T, Kopsidas T, Tsolia M, et al. Epidemiology of infections and antimicrobial use in Greek Neonatal Units. *Archives of disease in childhood-Fetal and Neonatal Edition*, v. 104, n. 3, p. F293-F297, 2019. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-315024>

Harrison W, Goodman D. Epidemiologic trends in neonatal intensive care, 2007-2012. *JAMA Pediatrics*, v. 169, n. 9, p. 855-862, 2015. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.1305>

Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, et al. Escmid guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the european society of clinical microbiology and infectious diseases*. 1-25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>

Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

Johnson J, Quach C. Outbreaks in the neonatal ICU: a review of the literature. *Current opinion in infectious diseases*, v. 30, n. 4, p. 395-403, 2017. <https://doi.org/10.1097/QCO.000000000000038>

Klingenberg C, Aarag E, Rønnestad A, Sollid JE, Abrahamsen TG, Kjeldsen G, et al. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates: association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 24, n. 9, p. 817-822, 2005. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000176735.20008.cd>

Kong KF, Vuong C, Otto M. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 296, n. 2-3, p. 133-139, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.042>

Marques, Simone Cristina. Formação de biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras.

Menoita E, Santos V, Testas C, Gomes C, Santos AS. Biofilms: Knowing the entity. *Journal of aging and innovation*, 2012.

Miryala SK, Anbarasu A, Ramaiah S. Systems biology studies in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 to understand their role in biofilm formation and multidrug efflux pumps. *Microbial pathogenesis*, v. 136, p. 103668, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103668>

Mizumoto BR, Moreira BM, Santoro-Lopes G, Cunha AJ, Santos RM, Pessoa-Silva CL, et al. Antenatal care as a risk factor for early onset neonatal infections in Rio de Janeiro, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 19, n. 3, p. 272-277, 2015. <http://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.02.003>

Mooney JA, Pridgen EM, Manasherob R, Suh G, Blackwell HE, Barron AE, et al. Periprosthetic bacterial biofilm and quorum sensing. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 36, n. 9, p. 2331-2339, 2018. <https://doi.org/10.1002/jor.24019>

Pammi M, Zhong D, Johnson Y, Revell P, Versalovic J. Polymicrobial bloodstream infections in the neonatal intensive care unit are associated with increased mortality: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 390, 2014. <http://doi.org/10.1186/1471-2334-14-390>

Rajabi Z, Soltan Dallal MM. Study on bacterial strains causing blood and urinary tract infections in the neonatal Intensive Care Unit and determination of their antibiotic resistance pattern. *Jundishapur journal of microbiology*, v. 8, n. 8, p. e19654, 2015. <http://doi.org/10.5812/jjm.19654v2>

Ramirez CB, Cantey JB. Antibiotic Resistance in the Neonatal Intensive Care Unit. *NeoReviews*, v. 20, n. 3, p. e135-e144, 2019. <https://doi.org/10.1542/neo.20-3-e135>

Romanelli RM, Anchieta LM, Mourão MV, Campos FA, Loyola FC, Jesus LA, et al. Notification of healthcare associated infections based on international criteria performed in a reference neonatal progressive care unit in Belo Horizonte, MG. *Revista brasileira de epidemiologia*, v. 16, n. 1, p. 77-86, 2013. <http://doi.org/10.1590/S1415-790X2013000100008>

Ruiz J, Sanjuan E, Amaro C, Gordon M, Villarreal E, Castellanos-Ortega A, et al. In vitro study of antimicrobial activity on *Klebsiella pneumoniae* biofilms in endotracheal tubes. *Journal of Chemotherapy*, v. 31, n. 4, p. 202-208, 2019. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2019.1601801>

Softić I, Tahirović H, Di Ciommo V, Auriti C. Bacterial sepsis in neonates: Single centre study in a Neonatal intensive care unit in Bosnia and Herzegovina. *Acta medica academica*, v. 46, n. 1, p. 7-15, 2017. <http://doi.org/10.5644/ama2006-124.181>

Sohail M, Latif Z. Molecular analysis, biofilm formation, and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing community-and health care-associated infections in central venous catheters. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 51, n. 5, p. 603-609, 2018. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0373-2017>

Stewart PS. Biophysics of biofilm infection. *Pathogens and disease*, v. 70, n. 3, p. 212-218, 2017. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12118>

Tsai MH, Chu SM, Hsu JF, Lien R, Huang HR, Chiang MC, et al. Breakthrough bacteremia in the neonatal intensive care unit: incidence, risk factors, and attributable mortality. *American journal of infection control*, v. 43, n. 1, p. 20-25, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.09.022>

Umran RM, Al-Jammali A. Neonatal outcomes in a level II regional neonatal intensive care unit. *Pediatrics International*, v. 59, n. 5, p. 557-563, 2017. <http://doi.org/10.1111/ped.13200>

Uppuluri Priya, Lopez-Ribot JL. Go forth and colonize: Dispersal from clinically important microbial biofilms. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 2, p. e1005397, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005397>

Volles DF, Branam TN. Antibiotics in the intensive care unit: focus on agents for resistant pathogens. *Emergency Medicine Clinics of North America*, v. 26, n. 3, p. 813-834, 2008. <http://doi.org/10.1016/j.emc.2008.04.006>

Wynn, J. L. et al. Very late onset infections in the neonatal intensive care unit. *Early Human Development*, v. 88, p. 217–225, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.08.009>

Worth LJ, Daley AJ, Spelman T, Bull AL, Brett JA, Richards MJ. Central and peripheral line-associated bloodstream infections in Australian neonatal and paediatric intensive care units: findings from a comprehensive Victorian surveillance network, 2008–2016. *Journal of Hospital Infection*, v. 99, n. 1, p. 55-61, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.021>

Yusef D, Shalakhti T, Awad S, Algharaibeh H, Khasawneh W. Clinical characteristics and epidemiology of sepsis in the neonatal intensive care unit in the era of multi-drug resistant organisms: a retrospective review. *Pediatrics and Neonatology*, v. 59, n. 1, p. 35-41, 2018. <http://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.06.001>

**ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA (CEP - UFU)**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Impacto da transmissão cruzada de micro-organismos epidemiologicamente importantes em uma UTI neonatal

**Pesquisador:** Denise Röder

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 86046318.4.0000.5152

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.678.162

**Apresentação do Projeto:**

O projeto em análise é uma projeto observacional prospectivo de vigilância epidemiológica para avaliar a transmissão cruzada de microorganismos no ambiente de UTI neonatal em um hospital universitário.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo principal do estudo segundo os pesquisadores é: "Análise prospectiva da transmissão cruzada por micro-organismos: bactérias gram positivas, gram negativas e leveduras em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os autores relatam o risco de identificação mas apresentam medidas para minimiza-lo. O benefício apresentado é o da própria produção dos dados não havendo nenhum para os participantes.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto apresentado apresenta um estudo de vigilância epidemiológica que avalia contaminação por microorganismos no ambiente da UTI neonatal de um hospital universitário. Coletas serão realizadas para avaliar contaminação ambiental e dos profissionais da unidade. Os neonatos serão monitorados diariamente utilizando a metodologia National Healthcare Safety Network. Os microorganismos serão também identificados por metodologia próprias da área de conhecimento.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 2.678.162

Os autores apresenta como tamanho de amostra um número de 500 participantes entre profissionais e pacientes em 4 meses de observação. Apesar de não justificarem o tamanho da amostra o tipo de estudo com os objetivos que são propostos (vigilância epidemiológica) são realizados nesse formato. Os autores relatam que armazenarão amostras em bancos. Entretanto a justificativa demonstra que não foi bem compreendido que "banco de amostras" nesse contexto refere-se aos repositórios de amostra aprovados para pesquisas futuras que exigem termos específicos. Aqui os autores relatam que farão o armazenamento dos microorganismos durante o estudo, o que é prática laboratorial de rotina.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória são apresentados e estão adequados. Os termos de consentimento apresentam linguagem adequada.

**Recomendações:**

O armazenamento em banco de amostras como descrito nos comentários não deve ser compreendido nos mesmos termos de "repositório" para pesquisas futuras devendo se comprometer a não utilizarem mais essas amostras para outros fins mesmo que necessário armazena-las por período posterior ao do estudo. O CEP/UFU solicita o envio de uma declaração assinada pelos pesquisadores firmando esse compromisso. Essa declaração deverá ser enviada pela Plataforma Brasil como forma de notificação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Março de 2019.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Março de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Março de 2021.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLÂNDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Página 02 de 04



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 2.678.162





Continuação do Parecer: 2.678.162

Outros	FICHANHSN.pdf	22/03/2018 14:47:03	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
Outros	LINKDOCURRICULOLATTES.docx	22/03/2018 14:46:01	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEresponsavepormenorde18anos.pdf	22/03/2018 14:45:27	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMAIORESDE18ANOS.pdf	22/03/2018 14:45:08	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.pdf	22/03/2018 14:44:30	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaoinstituicao.pdf	14/03/2018 10:44:29	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromissoequipeexecutora.pdf	14/03/2018 10:41:39	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	14/03/2018 10:40:58	Priscila Guerino Vilela Alves	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLANDIA, 27 de Maio de 2018

Assinado por:  
Karine Rezende de Oliveira  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica  
**Bairro:** Santa Mônica **CEP:** 38.408-144  
**UF:** MG **Município:** UBERLANDIA  
**Telefone:** (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br