

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE BIOMEDICINA**

ANDRESSA BAIENSE SOUZA

**DETECÇÃO DE BIOFILME EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS
EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**

UBERLÂNDIA

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE BIOMEDICINA**

ANDRESSA BAIENSE SOUZA

**DETECÇÃO DE BIOFILME EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS
EM UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção de Bacharel
em Biomedicina, pelo Curso de Graduação da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Paulo Amante Penatti

Banca Examinadora:

Dr. Mário Paulo Amante Penatti - UFU / ESTES

Dra. Ralciane de Paula Menezes - UFU / ESTES

Me. Priscila Guerino Vilela Alves - UFU

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de dedicar este trabalho e minha formação em memória da minha mãe Mylene Reis que foi uma das maiores incentivadoras para realização deste sonho, sempre me dando seu apoio, carinho e compreensão.

Agradecer a Deus por sempre me dar força, determinação e saúde para que eu pudesse chegar ao fim de uma etapa tão importante da minha vida.

A realização deste trabalho contou com a ajuda de várias pessoas, dentre as quais agradeço:

Minha irmã Rafa por sempre estar ao meu lado me ajudando nos momentos difíceis, fazendo com que eu superasse cada etapa. Ao meu irmão André por todo seu apoio e incentivo.

A minha família que de alguma forma torceu por mim e permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus amigos que permaneceram ao meu lado em todos os momentos me dando força e tornando toda a experiência inesquecível.

Ao meu orientador Mário Paulo que durante este período pôde me passar um pouco dos seus vastos conhecimentos.

Ao laboratório e grupo de pesquisa por me receberem tão bem e permitir que meu trabalho fosse executado da melhor forma possível.

RESUMO

Introdução: O Biofilme bacteriano é caracterizado como um agregado de células microbianas que, permite a adesão das bactérias em superfícies bióticas e abióticas. As bactérias Gram-negativas estão relacionadas às infecções em unidades hospitalares e à produção de Biofilme.

Objetivo: Avaliar a produção de Biofilme por bactérias Gram-negativas isoladas de uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

Métodos: A quantificação de Biofilme foi realizada através de três testes: Cristal Violeta para avaliação de Biomassa, Safranina para quantificação da Matriz Extracelular e as Células Viáveis foram quantificadas através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias.

Resultados e Discussão: 93 amostras foram isoladas e todas produziram Biofilme. Esses resultados indicam que, com essa produção, as bactérias podem permanecer no local por mais tempo podendo agravar o quadro dos pacientes internados na unidade.

Conclusão: Foi possível avaliar a produção de Biofilme de todos os isolados. Dado sua relevância clínica, é de extrema importância identificar esses micro-organismos correlacionando infecções à produção de Biofilme.

Palavras-chave: Produção de Biofilme, Bactérias Gram-negativas, Infecções Hospitalares.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial Biofilm is characterized as an aggregate of microbial cells that allows bacteria to adhere to biotic and abiotic surfaces. Gram-negative bacteria are related to infections in hospitals and Biofilm production. **Objective:** To evaluate Biofilm production by Gram-negative bacteria isolated from a Neonatal Intensive Care Unit. **Methods:** Biofilm quantification was performed by three tests: Violet Crystal for Biomass evaluation, Safranin for Extracellular Matrix quantification and Viable Cells were quantified by counting Colony Forming Units. **Results and Discussion:** 93 samples were isolated and all produced Biofilm. These results indicate that with this production, bacteria can stay in place longer and may worsen the condition of patients admitted to the unit. **Conclusions:** Was possible to evaluate the Biofilm production of all isolates. In view of their clinical relevance, it is of utmost importance to identify these microorganisms by correlating infections with Biofilm production.

Keywords: Biofilm Production, Gram-negative bacteria, Hospital infections.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	09
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Amostras	10
3.2 Formação de Biofilme “in vitro”	10
3.3 Quantificação	11
3.3.1 Quantificação Biomassa	11
3.3.2 Quantificação Matriz Extracelular	11
3.3.3 Contagem das Células Viáveis	12
3.4 Interpretação dos resultados	12
3.5 Ética da pesquisa	12
4. RESULTADOS	12
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXO 1 CEP	23

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes são agregados de células microbianas, envoltos por uma matriz extracelular polimérica (MEP), que auxilia na adesão da bactéria em superfícies abióticas e bióticas (COSTERTON et al., 1995). É composto por 10% de células microbianas e 90% de MEP, sendo esta última uma substância vital para manter a estrutura, funcionalidade do Biofilme e proteção das bactérias contra fagocitose e ação dos antimicrobianos. Seus componentes incluem proteínas, ácidos nucleicos, água e polissacarídeos (MOONEY et al., 2018; MIAO et al., 2019).

Em 1976, Marshall observou a presença de fibrilas poliméricas extracelulares, que ancoravam as bactérias nas superfícies. Após essa descoberta, estudos posteriores definiram o Biofilme como microcolônias embebidas por uma matriz de exopolímero aniônica. Porém, somente em 1978, Costerton com técnicas de microscopia mais avançadas, criou o termo Biofilme e definiu como microcolônias embebidas por uma matriz de glicocálix garantindo adesão das bactérias em superfícies. Já em 1990, Characklis e Marshall passaram a descrever as características estruturais e temporais do Biofilme com envolvimento de substâncias inorgânicas ou abióticas na matriz. Finalmente, Costerton e colaboradores (1995) definem o Biofilme como uma comunidade de micro-organismos aderidos entre si e em superfícies (DONLAN; COSTERTON, 2002).

A produção do Biofilme é um processo que pode ser dividido didaticamente em quatro estágios. O primeiro estágio consiste na adesão das células planctônicas à superfícies bióticas ou abióticas utilizando fatores de virulência característicos de cada micro-organismo como flagelos e fímbrias (MOORMEIER; BAYLES, 2017; KHIDER et al., 2019). Assim, neste primeiro estágio, a fase de adesão pode ser revertida visto que, as forças eletrostáticas ainda não atuam (SCHERRER; MARCON, 2016).

A adesão irreversível das bactérias ocorre devido à atuação de forças eletrostáticas como a de Van der Waals. Assim, no segundo estágio a fase de multiplicação se inicia ocorrendo a formação das microcolônias através de moléculas químicas. À medida que a intensidade de atuação dessas moléculas aumenta, o mecanismo genético de produção de exopolissacarídeo é ativado (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

O terceiro estágio consiste na formação da estrutura tridimensional e maturação do Biofilme, ocorre a expressão de moléculas autoindutoras caracterizando a comunicação célula-célula denominado *Quorum-sensing* (QS). A função dessas moléculas autoindutoras está

relacionada à expressão de genes envolvidos na produção de enzimas líticas, toxinas, exopolissacarídeos, para patogenicidade e virulência, bem como a produção do Biofilme, sendo este último um dos mais importantes fenótipos de virulência de patógenos humanos (CADAVID; ECHEVERRI, 2019).

O QS pode ocorrer intra e interespécies, abrangendo a adesão inicial dos micro-organismos até a produção final do Biofilme. Além disso, através do QS é possível detectar a escassez de nutrientes, condições de estresse ambiental como o ataque de antimicrobianos e também a regulação da produção coletiva de fatores de virulência (JAMAL et al., 2015). É mediado por autoindutores, moléculas químicas, por exemplo, Lactona Acylhomoserina (AHL) que permitem a comunicação entre as diferentes bactérias presentes no Biofilme (FONG et al., 2018). Nesse estágio também são formados canais de água que funcionam como um sistema usado para manutenção e sobrevivência dos micro-organismos, distribuindo os nutrientes e removendo os resíduos resultantes da produção do Biofilme (JAMAL et al., 2018).

No estágio final da produção do Biofilme ocorre a dispersão celular, acarretando no deslocamento programado de células que saem do modo sésil (fixo) e retornam ao estado planctônico (livre), podendo assim formar Biofilme em diferentes locais. Essa dispersão ocorre devido a diversos fatores como estresse mecânico, respostas relacionadas à densidade populacional e até mesmo escassez de nutrientes (KAMARUZZAMAN et al., 2018).

Calcula-se que 80% das infecções microbianas em humanos estejam associadas à presença do Biofilme (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018). Este é comumente encontrado em infecções nosocomiais, principalmente em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em dispositivos médicos como válvulas cardíacas mecânicas, cateteres vasculares, implantes mamários e marca-passos. O Biofilme ainda pode ser encontrado em mucosas, endotélio, tecidos e outras superfícies que forneçam nutrientes suficientes para sobrevivência dos micro-organismos (OLIVEIRA et al., 2018).

As bactérias Gram-negativas estão ativamente relacionadas à maioria das infecções. Estudos mostram um aumento significativo na ocorrência desses micro-organismos, sendo responsáveis pela maioria das infecções oportunistas e produção de Biofilme bacteriano. Geralmente essas bactérias estão associadas a pacientes críticos e imunocomprometidos ocasionando um aumento na morbimortalidade. Frequentemente, as bactérias Gram-negativas são as mais importantes causadoras de infecções nosocomiais, podendo estar relacionadas, por

exemplo, à pneumonia associada à ventilação mecânica dificultando ainda mais o tratamento dos pacientes, aumentando o tempo de permanência dos mesmos nas UTI (LIMA et al., 2017).

Dentro do grupo dos Gram-negativos, as bactérias mais comumente encontradas são as do gênero *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* e *Enterobacter* (TROYANO; SIBILA, 2017; MALHOTRA et al., 2019). O risco de infecções por esses micro-organismos aumenta principalmente em recém-nascidos críticos admitidos em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), devido a prematuridade, por não possuírem os mecanismos de defesa efetivos, pele imatura e necessidade de dispositivos invasivos (FERREIRA et al., 2019).

Assim, diante da capacidade de infecção dessas bactérias e as características estruturais do Biofilme como, a natureza da matriz extracelular, cooperatividade metabólica e QS, torna-se difícil o tratamento de infecções associadas ao Biofilme, pois sua proteção contra os agentes antimicrobianos e limitação da atividade do sistema imune do hospedeiro, auxilia na resistência bacteriana gerando significativos problemas de Saúde Pública (GRAF et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A resistência dos micro-organismos produtores de Biofilmes à substâncias biocidas vem se tornando crescente, dificultando ainda mais o tratamento dos pacientes. Como a produção do Biofilme está relacionada com a maioria das infecções hospitalares, o estudo desse fenômeno torna-se de extrema importância para um melhor prognóstico, assim como também diminuir gastos, prejuízos e taxa de morbimortalidade dos pacientes inclusive neonatos críticos internados na unidade.

A produção do Biofilme permite que as bactérias tenham uma forte adesão a superfícies abióticas, bióticas, biomateriais e maior tempo de sobrevivência. Em UTIN, essa forte adesão facilita a permanência do micro-organismo na unidade por mais tempo e isso ocorre devido a MEP que, confere proteção às bactérias contra o ataque do sistema imune, choque osmótico, desidratação, substâncias de limpeza e qualquer alteração do meio externo aumentando os riscos de infecção, assim como a morbimortalidade dos neonatos. Desse modo, o estudo da produção de Biofilme pelos micro-organismos encontrados em infecções irá contribuir não só para a melhora no tratamento dos pacientes, mas como diminuir a permanência dos mesmos na unidade. Além disso, com a avaliação da produção de Biofilme por micro-organismos presentes no ambiente da UTIN, o estudo contribuirá para uma informação adicional aos profissionais a

respeito da importância da limpeza da unidade e ampliação do conhecimento para a comunidade científica.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de Biofilme por bactérias Gram-negativas isoladas da Corrente Sanguínea, Secreção Ocular de Neonatos internados na UTIN do Hospital de Clínicas de Uberlândia (HCU) bem como das Mãos dos Profissionais de Saúde que trabalham no local e do Ambiente da unidade.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as amostras em produtoras e não produtoras de Biofilme;
- Quantificar Biomassa e Matriz do Biofilme produzido;
- Quantificar Atividade Metabólica e Células Viáveis do Biofilme produzido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

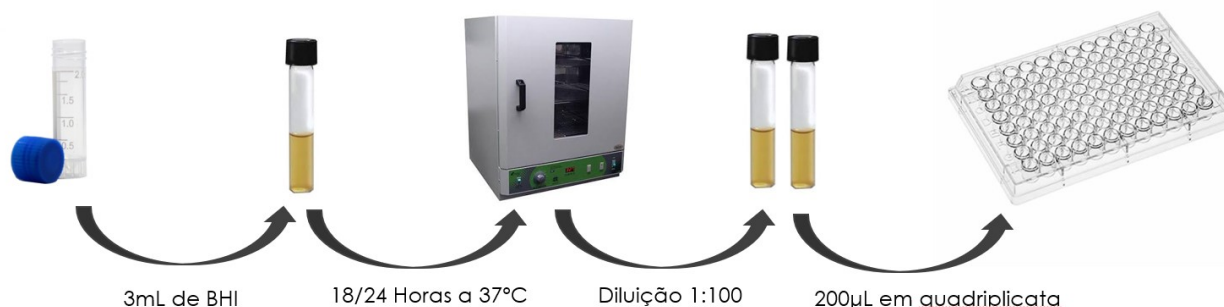
3.1 Amostras

Foram incluídas no estudo 93 isolados de Gram-negativos sendo, 53 das Mãos, 27 do Ambiente, 9 do Sangue e 4 de Secreção Ocular. Esses isolados foram identificados a nível de espécie e estocados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) + glicerol a 20% e armazenados no Laboratório de Microbiologia do Curso Técnico de Análises Clínicas (CTAC) da Escola Técnica de Saúde (ESTES) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

3.2 Formação de Biofilme “in vitro”

Para verificação da produção de Biofilme foi utilizado o protocolo descrito por Merrit et al. (2006), com algumas modificações descritas abaixo. Cada isolado foi inoculado em 3mL de caldo BHI, esse inóculo foi mantido por 18 a 24 horas em estufa a 37°C. Em seguida, foi feito uma diluição de 1:100 em meio BHI. Posteriormente, 200µL da diluição de cada micro-organismo foi pipetado em quadriplicata em microplacas de poliestileno estéreis com 96 poços em fundo chato. A placa permaneceu incubada a 37°C por 24 horas e em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com 100µL de Phosphate Buffered Saline (PBS) esterelizado (pH7,4) para retirada das células planctônicas, ou seja, as células que não aderiram a placa (Figura 1).

Figura 1. Formação de Biofilme “in vitro”



3.3 Quantificação

Para quantificação da produção do Biofilme seguiu-se a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2007). Foram utilizados dois corantes: Cristal Violeta (CV) para determinação da Biomassa produzida no Biofilme e Safranina para quantificar a Matriz Extracelular.

3.3.1 Quantificação da Biomassa

Para avaliação de Biomassa, foi realizado o teste com o corante CV. Este é um corante que se liga a moléculas negativamente carregadas presentes na superfície das bactérias. Assim, após a formação do Biofilme in vitro e lavagem das placas, foram adicionados 125µL de CV a 0,1% em cada poço e deixado por 5min. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com 200µL de Solução Salina estéril. Para solubilização do corante, foi adicionado 200µL de Ácido Acético a 30%. Após este processo a placa foi lida em um leitor de ELISA (Biotek) com comprimento de onda 540nm (MIAO et al., 2019).

3.3.2 Quantificação da Matriz Extracelular

Para quantificação da Matriz produzida, utilizou-se o corante Safranina. A metodologia utilizada com adequações foi o protocolo descrito por Stepanovic et al. (2007). Foram adicionados 125µL de Safranina a 0,1% e deixados por 15min. Em seguida os poços foram lavados com Salina esterilizada e incubados a temperatura ambiente por 30seg. Foram pipetados 200µL de ácido acético a 30% para solubilizar a Safranina. A placa foi lida em um leitor de ELISA (Biotek) em um comprimento de onda de 530nm.

3.3.3 Contagem das Células Viáveis

Para análise das Células Viáveis e quantificação da Atividade Metabólica, foi utilizado o protocolo descrito por Melo et al. (2014). Assim, o Biofilme formado pelos micro-organismos em 24 horas nas microplacas de poliestileno, foram lavadas com 200µL de Solução Salina a 0,9%, com o objetivo de retirar as células que não se aderiram a placa. Foi feita novamente a adição de Salina a 0,9% e com o auxílio de um bastão de vidro, foi feita uma raspagem dos poços para suspensão das células que estavam aderidas. Essa suspensão foi transferida para um tubo tipo Falcon contendo 900µL de PBS e agitados por 30seg com a ajuda de um agitador tipo Vórtex. Em seguida foi realizada uma diluição de 10^{-1} a 10^{-6} . Após a diluição, 100µL de cada tubo foram semeados através da alça de Drigalski em placas de Petri contendo Trypticase Soy Agar (TSA). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e cada Unidade Formadora de Colônia (UFC) foi contada manualmente com auxílio de um aglutinoscópio.

3.4 Interpretação dos Resultados

Para interpretação dos resultados foi necessário estabelecer o valor de Cut-off (Valor de Corte) Densidade Óptica (DOc) que determina as amostras formadoras de Biofilme e as não formadoras. Assim, a DOc é calculada a partir de três desvios-padrão (DP) da média do controle negativo, ou seja, $DOc = \text{média do controle negativo} + 4 \times DP$. Assim, a partir da Densidade Óptica (DO), as amostras foram consideradas produtoras quando $DO > DOc$ e amostras não produtoras quando $DO < DOc$ (STEPANOVIC et al. 2007).

3.5 Ética da Pesquisa

O projeto de pesquisa foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFU com parecer de n. 2.678.162 (Anexo 1).

4. RESULTADOS

Dentro das amostras Gram-negativas trabalhadas 45% pertencem ao grupo das *Enterobacter* spp., seguida pela *Serratia* spp. (44%), *Escherichia coli* (9%) e *Pseudomonas* spp. (2%). Assim, dentre os isolados, as bactérias da família das *Enterobacteriaceae* foram mais frequentes (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies isoladas da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

Espécie (n)	Sítio
<i>Serratia marcescens</i> (27)	Sangue, Mãos, Ambiente e Secreção Ocular
<i>Enterobacter agglomerans</i> (22)	Mãos e Ambiente
<i>Enterobacter aerogenes</i> (14)	Mãos e Ambiente
<i>Escherichia coli</i> (8)	Ambiente, Sangue e Mãos
<i>Serratia rubidaea</i> (8)	Mãos
<i>Enterobacter cloacea</i> (6)	Sangue e Mãos
<i>Serratia liquefaciens</i> (6)	Mãos e Ambiente
<i>Pseudomonas putida</i> (1)	Sangue
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	Sangue

Para detecção do Biofilme produzido pelos isolados foi determinado o valor do Cut-off-Densidade Óptica (DOc), esse valor foi obtido através da média do controle negativo somado com quatro vezes o valor do DP. Foi considerada produtora de Biofilme a bactéria cujo valor obtido em cada teste realizado fosse maior que o DOc. Desse modo, o valor da média obtido através do controle negativo foi de 0,060875, o DP foi de 0,00285 e 0,072275 o valor do DOc.

Todos os isolados foram produtores de Biofilme. Para a quantificação da Biomassa produzida no Biofilme de cada micro-organismo, foi utilizado o teste com o CV. Os resultados desta avaliação variaram de 0,3 a 2,7 de produção (figura 1). Quando comparado os resultados dos dois testes, é possível observar que a Biomassa quantificada foi maior do que a Matriz Extracelular.

Com a avaliação da Matriz Extracelular produzida, foi encontrado uma variação de 0,25 a 2,7 nos resultados (figura 2). Apesar do intervalo entre os dois testes serem idênticos, podemos observar que as densidades apresentadas pela coloração Safranina foi menor quando comparado ao CV, o que já era esperado, visto que o corante Safranina é específico para coloração da Matriz Extracelular, já o CV cora tanto células vivas quanto mortas apresentando valores maiores. Para análise utilizando o teste da UFC, os resultados variaram entre 1 e 9 de Células Viáveis, levando em consideração o fator de diluição (tabela 2).

Figura 1. Média das quadriplicatas dos isolados em relação à avaliação de Biomassa.

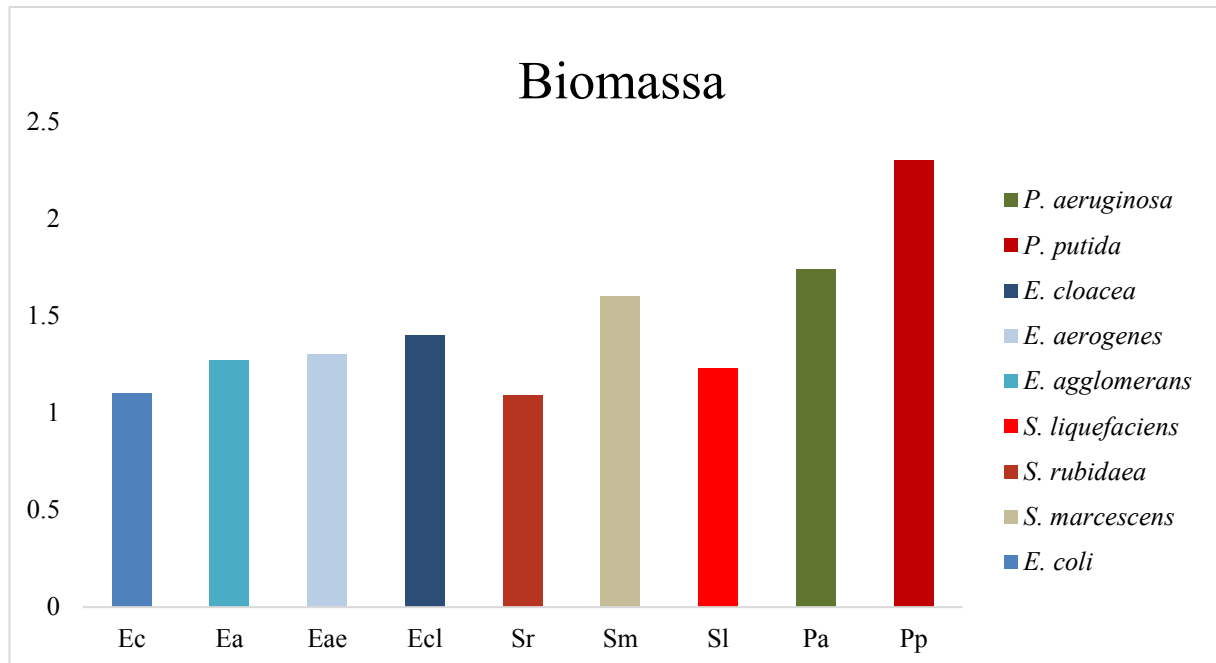


Figura 2. Média das quadriplicatas dos isolados em relação à avaliação da Matriz Extracelular.

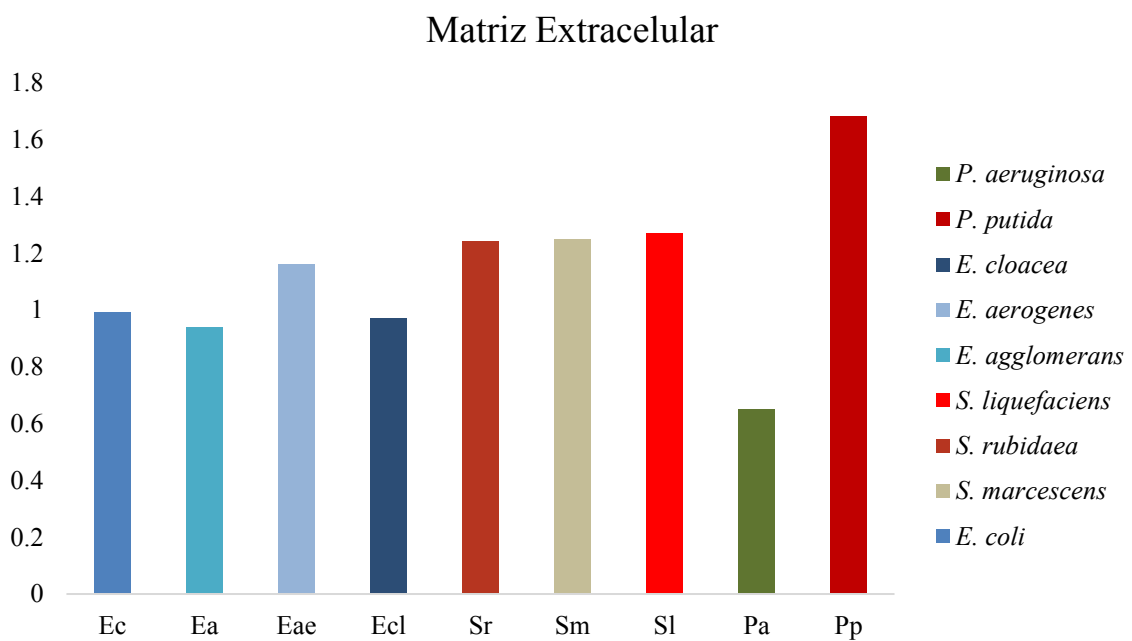


Tabela 2. Contagem de células viáveis de bactérias Gram-negativas

Amostra	Células viáveis	Sítio
Sm 78	2×10^9	Ambiente
Sm 80	$1,5 \times 10^9$	Ambiente
Sm 79	$1,6 \times 10^9$	Ambiente
Sm 85	$4,4 \times 10^8$	Sangue
Sm 86	$2,4 \times 10^9$	Secreção Ocular
Sm 87	2×10^9	Secreção Ocular
Sm 88	2×10^9	Secreção Ocular
Sm 89	$1,9 \times 10^9$	Secreção Ocular
Sm 84	$1,7 \times 10^9$	Sangue
Sm 1	2×10^8	Mãos
Sm 10	$1,9 \times 10^9$	Mãos
Sm 15	2×10^9	Mãos
Sm 20	$1,6 \times 10^9$	Mãos
Sm 22	$6,4 \times 10^8$	Mãos
Sm 29	$7,9 \times 10^8$	Mãos
Sm 31	$7,9 \times 10^8$	Mãos
Sm 32	$1,9 \times 10^9$	Mãos
Sm 34	$1,3 \times 10^9$	Mãos
Sm 38	1×10^9	Mãos
Sm 39	2×10^9	Mãos
Sm 40	8×10^8	Mãos
Sm 41	$1,7 \times 10^9$	Mãos
Sm 42	3×10^9	Mãos
Sm 43	3×10^9	Mãos
Sm 47	$5,7 \times 10^8$	Mãos
Sm 50	$1,6 \times 10^9$	Mãos
Sm 53	$1,5 \times 10^9$	Mãos
Ea 3	$1,5 \times 10^9$	Mãos
Ea 4	2×10^9	Mãos
Ea 5	$2,6 \times 10^8$	Mãos
Ea 6	$9,2 \times 10^8$	Mãos
Ea 7	$1,7 \times 10^9$	Mãos
Ea 12	$3,1 \times 10^9$	Mãos
Ea 14	$1,2 \times 10^9$	Mãos
Ea 21	3×10^9	Mãos
Ea 25	$2,7 \times 10^9$	Mãos
Ea 26	1×10^9	Mãos
Ea 28	$1,1 \times 10^9$	Mãos
Ea 30	$1,8 \times 10^9$	Mãos
Ea 36	$2,1 \times 10^9$	Mãos
Ea 44	$1,5 \times 10^9$	Mãos
Ea 46	$8,9 \times 10^8$	Mãos

Sm: *Serratia marcescens*; Ea: *Enterobacter agglomerans*; Eae: *Enterobacter aerogenes*; Ec: *Escherichia coli*; Sr: *Serratia rubidaea*; Ecl: *Enterobacter cloacae*; Sl: *Serratia liquefaciens*; Pp: *Pseudomonas putida*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2. Contagem de células viáveis de bactérias Gram-negativas (continuação)

Amostra	Células viáveis	Sítio
Ea 49	$2,7 \times 10^9$	Mãos
Ea 51	$2,2 \times 10^9$	Mãos
Ea 52	1×10^9	Mãos
Ea 54	$3,3 \times 10^9$	Ambiente
Ea 55	$2,9 \times 10^9$	Ambiente
Ea 56	$1,9 \times 10^9$	Ambiente
Ea 57	$2,2 \times 10^9$	Ambiente
Eae 16	$2,3 \times 10^9$	Mãos
Eae 58	$2,2 \times 10^9$	Ambiente
Eae 59	$2,1 \times 10^9$	Ambiente
Eae 60	$2,9 \times 10^9$	Ambiente
Eae 61	$2,6 \times 10^9$	Ambiente
Eae 62	2×10^9	Ambiente
Eae 63	$2,4 \times 10^9$	Ambiente
Eae 64	$2,4 \times 10^9$	Ambiente
Eae 65	$5,6 \times 10^8$	Ambiente
Eae 66	$1,4 \times 10^9$	Ambiente
Eae 67	2×10^9	Ambiente
Eae 68	$2,5 \times 10^9$	Ambiente
Eae 69	$1,2 \times 10^9$	Ambiente
Eae 70	$1,5 \times 10^9$	Ambiente
Ec 74	$2,2 \times 10^9$	Ambiente
Ec 75	$4,4 \times 10^8$	Ambiente
Ec 76	$7,2 \times 10^8$	Ambiente
Ec 83	$1,2 \times 10^9$	Sangue
Ec 23	$9,6 \times 10^8$	Mãos
Ec 73	$1,7 \times 10^9$	Ambiente
Ec 72	$1,6 \times 10^9$	Ambiente
Ec 71	$1,4 \times 10^9$	Ambiente
Sr 9	2×10^9	Mãos
Sr 8	2×10^8	Mãos
Sr 17	$1,6 \times 10^9$	Mãos
Sr 24	4×10^8	Mãos
Sr 33	$1,6 \times 10^9$	Mãos
Sr 45	$3,2 \times 10^8$	Mãos
Sr 48	$1,7 \times 10^9$	Mãos
Sr 2	$4,6 \times 10^8$	Mãos
Ecl 11	2×10^9	Mãos
Ecl 91	$2,3 \times 10^9$	Sangue
Ecl 92	$1,5 \times 10^9$	Sangue
Ecl 93	$1,1 \times 10^8$	Sangue
Ecl 94	4×10^8	Sangue

Sm: *Serratia marcescens*; Ea: *Enterobacter agglomerans*; Eae: *Enterobacter aerogenes*; Ec: *Escherichia coli*; Sr: *Serratia rubidaea*; Ecl: *Enterobacter cloacae*; Sl: *Serratia liquefaciens*; Pp: *Pseudomonas putida*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 2. Contagem de células viáveis de bactérias Gram-negativas (continuação)

Amostra	Células viáveis	Sítio
Eas 37	1×10^9	Mãos
Sl 77	$2,6 \times 10^9$	Ambiente
Sl 13	$1,6 \times 10^9$	Mãos
Sl 18	$8,9 \times 10^8$	Mãos
Sl 19	2×10^9	Mãos
Sl 27	$3,2 \times 10^8$	Mãos
Sl 35	3×10^9	Mãos
Pa 81	$2,2 \times 10^9$	Sangue
Pp 82	$6,8 \times 10^8$	Sangue

Sm: *Serratia marcescens*; Ea: *Enterobacter agglomerans*; Eae: *Enterobacter aerogenes*; Ec: *Escherichia coli*; Sr: *Serratia rubidaea*; Ecl: *Enterobacter cloacae*; Sl: *Serratia liquefaciens*; Pp: *Pseudomonas putida*; Pa: *Pseudomonas aeruginosa*.

5. DISCUSSÃO

As infecções hospitalares são frequentemente relatadas nas UTIN, estas complicam ainda mais o quadro clínico dos pacientes dificultando o tratamento e aumentando a permanência dos mesmos na unidade. Essas infecções estão, em sua maioria, relacionadas à produção de Biofilme pelo agente infeccioso. Os micro-organismos responsáveis por essa produção expressam fatores de virulência que auxiliam na sua adesão em superfícies bióticas ou abióticas permitindo que permaneçam no local por mais tempo, impedindo a ação dos antimicrobianos, dos produtos de limpeza e defesa do sistema imune do indivíduo (KHIDER et al., 2019).

A produção de Biofilme pode ser observada por diversas espécies de micro-organismos, porém alguns estudos revelam que a maioria dos isolados bacterianos que apresentam a produção de Biofilme pertence à família *Enterobacteriaceae*. Assim, dentre os achados pode-se destacar os gêneros, *Serratia*, *Enterobacter*, bem como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são consideradas em grande parte da microbiota intestinal do próprio indivíduo (HASSON; AL-HAMADANI; AL-AZAWI H, 2018).

Para análise da formação do Biofilme o teste mais comumente utilizado é a quantificação com o corante CV. O ensaio com este corante permite a análise do biofilme como um todo, corando células viáveis, células mortas e matriz extracelular, sendo por isso os valores da DO relativamente maiores. Em diversos estudos a utilização deste corante é a primeira

escolha, pois permite caracterizar os isolados em amostras produtoras ou não produtoras de Biofilme (XU et al., 2016; CORTE et al., 2019).

O teste utilizando a coloração com a Safranina resultou em densidades ópticas mais baixas que a coloração CV, o que também foi observado em um estudo por Ommen et al. (2017). Porém apesar da diferença dos resultados não há indicação de que a Safranina é menos precisa do que o CV para quantificar o biofilme.

Neste estudo a quantificação das Células Viáveis presentes no Biofilme, foi feita manualmente. Muitos autores utilizam o sal tetrazólico XTT ((2,3-bis (2-methoxy-4- nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2H tetrazolium hydroxide) e apesar de ser eficaz na quantificação de células viáveis, possui a desvantagem de ser mais caro. Assim, muitos estudos mostram bons resultados na análise das células utilizando a UFC, sendo uma prática mais econômica e análoga ao XTT (ROY et al., 2018).

As infecções nosocomiais estão relacionadas à produção do Biofilme, portanto grande parte dos isolados encontrados nas UTIN são capazes de exibir esse tipo de resistência. Assim como neste estudo, diversas pesquisas, mostram que mais de 70% das bactérias trabalhadas são classificadas como produtoras de Biofilme e os ensaios utilizando o CV e a Safranina são eficazes para detecção do mesmo (OLEJNICKOVA et al., 2014).

As mãos são consideradas importantes veículos de patógenos. No nosso estudo mais de 50% das bactérias foram isoladas das mãos, sabe-se que a não correta higienização das mesmas permite que o micro-organismo permaneça ali por mais tempo podendo ser transferido para superfícies e de pessoa para pessoa. Assim, o risco de contaminação nas UTIN aumenta, visto que o profissional, ao ter contato com os pacientes, é capaz de transferir as bactérias presentes em suas mãos, podendo complicar o quadro dos pacientes internados na unidade (CHOWDHARY, 2018).

O ambiente é considerado também um importante reservatório de micro-organismos. Dependendo dos fatores ambientais em que a bactéria está exposta, esta pode permanecer no local por muito mais tempo. No nosso estudo cerca de 30% dos isolados foram obtidos do ambiente da UTIN. Um estudo realizado a respeito de infecções adquiridas em ambientes hospitalares, mostra a importância da correta higienização do local evitando a presença dessas bactérias no ambiente e impedindo o agravamento do quadro dos pacientes, diminuição da permanência dos mesmos na unidade diminuindo o risco de infecção (DANCER, 2014).

6. CONCLUSÃO

A capacidade de produção de Biofilme das bactérias isoladas pôde ser bem observada através da metodologia pela coloração com CV, Safranina e Contagem das Células Viáveis. Com o estudo foi possível avaliar que das bactérias isoladas todas foram produtoras de Biofilme, permitindo a correlação da produção com a ocorrência das infecções nosocomiais. Além disso, com as amostras isoladas de quatro sítios diferentes, é possível verificar a capacidade dos micro-organismos produzirem Biofilme em ambientes distintos, destacando também a importância da correta higienização das mãos e do ambiente da UTIN.

REFERÊNCIAS

- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in Biofilm Formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- CADAVID, E.; ECHEVERRI, F. 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.
- COSTERTON, J. W. et al. Microbial Biofilms. **Microbiology Review**, n. 49, p. 711-45, 1995.
- CORTE, L. et al. Biofilm Specific Activity: A Measure to Quantify Microbial Biofilm. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 73, 2019.
- CHOWDHARY, D. et al. Transfer of dry surface Biofilm in healthcare environment: The role of healthcare worker's hands as vehicles, **Journal of Hospital Infection**, n. 100, v. 3, p. 85-90, 2018.
- DANCER, S. J. Controlling hospital-acquired infection: Focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 665-690, 2014.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, n. 2, v. 15, p. 167-193, 2002.
- EZE, E. C.; CHENIA, H. Y.; ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* Biofilms: Effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2277-2299, 2018.
- FERREIRA, B. R. R. et al. Osmotic stress induces Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, n. 94, v. 4, p. 337-341, 2019.
- FONG, J. 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.
- GRAF, A. C. et al. Virulence factors produced by *Staphylococcus aureus* Biofilms have a moonlighting function contributing to Biofilm integrity. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 6, p. 1036-1053, 2019.
- HASSON O. S.; AL-HAMADANI H. A.; AL-AZAWI H. I. Occurrence of Biofilm Formation in *Serratia fonticola* and *Pantoea* sp. isolates among Urinary Catheterized Patients. **Nano Biomedicine and Engineering**, n.10, v. 3. p. 295-304, 2018.
- JAMAL, M. et al. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. **Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 4, p. 1-14, 2015.

JAMAL, M. et al. Bacterial Biofilm and associated Infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7-11, 2018.

KAMARUZZAMAN, N. et al. Targeting the Bacterial Protective Armour: Challenges and Novel Strategies in the Treatment of Microbial Biofilm. **Materials**, v. 11, n. 9, p. 1705, 2018.

KHIDER, M. et al. Differential expression profiling of Δ litR and Δ rpoQ mutants reveals insight into QS regulation of motility, adhesion and Biofilm formation in *Aliivibrio salmonicida*. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-18, 2019.

LIMA, J. L. C. et al. Análise da produção de Biofilme por isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com Pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017.

MALHOTRA, R. et al. A comparison of bacterial adhesion and Biofilm Formation on commonly used orthopedic metal implant materials: An In vitro study. **Indian Journal of Orthopedics**, v. 53, n. 1, p. 148, 2019.

MELO, P. C. et al. NaOCl effect on Biofilm produced by *Staphylococcus aureus* isolated from the milking environment and mastitis infected cows. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 109-113, 2014.

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE. G. A. Growing and Analyzing Static Biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, n. 1, p. 1-29, 2006.

MIAO, J. et al. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* under Food Heat Processing Conditions: First Report on CML Production within Biofilm. **Scientific Reports**, v. 1, n. 9, p. 1-9, 2019.

MOORMEIER, D. E.; BAYLES, K. W. *Staphylococcus aureus* Biofilm: A complex developmental organism. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 3, p.365-376, 2017.

MOONEY, J. A. et al. Periprosthetic bacterial Biofilm and quorum sensing. **Journal of Orthopedic Research®**, v. 36, n. 9, p. 2331-2339, 2018.

OLIVEIRA, A. C. et al. Evaluation of *Staphylococcus aureus* Biofilm growth, in vitro, in the lumen of polyurethane catheters. **Review UNIVAP**, v. 25, n. 46, p. 74-83, 2018.

OLEJNICKOVA, K.; HOLA, V.; RUZICKA, F. Catheter-related infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence factors involved and their relationships. **Pathogens and Disease**, v. 72, n. 2, p. 87-94, 2014.

OMMEN, P.; ZOBOK, N.; MEYER, R. L. Quantification of Biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of microbiological methods**, v. 141, p. 87-89, 2017.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial Biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, n. 9, v. 1, p. 522-554, 2018.

SCHERRER, V. J.; MARCON, N. L. Biofilm Formation and food safety in food services. **Revista Associação Brasileira de Nutrição**, n. 2, p. 91-99, 2016.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of Biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of Biofilm production by *Staphylococci*. **Journal Compilation**, p. 891- 899, 2007.

TROYANO, R.; SIBILA, A. The respiratory threat posed by multidrug resistant Gram-negative bacteria. **Respirology**, v. 22, n. 7, p. 1288-1299, 2017.

XU, Z. et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm quantification. **Current microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016.

Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



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