

Avaliação da eficácia de biocidas na remoção de biofilmes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* multidroga resistentes

Evaluation of the efficacy of biocides in removing biofilms produced by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Evaluación de la eficacia de los biocidas en la eliminación de biopelículas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos

Recebido: 21/07/2020 | Revisado: 31/07/2020 | Aceito: 04/08/2020 | Publicado: 13/08/2020

Keila de Cássia Ferreira de Almeida Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8617-9886>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: kcfasilva@gmail.com

Mariana Alcântara Calomino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8003-4144>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: mari.calomino3@gmail.com

Gabriela Deutsch

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4618-439X>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: gd85@globo.com

Bruna Maiara Ferreira Barreto Pires

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5584-8194>

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: bruna.barreto07@gmail.com

Luciana Maria Ramires Esper

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6789-8789>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: lumaesper@gmail.com

Geraldo Renato de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2748-1487>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: geraldopaula@id.uff.br

Lenise Arneiro Teixeira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3423-4871>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: tlenise@hotmail.com

Resumo

Pseudomonas aeruginosa é um dos patógenos mais frequentes em infecções acometendo pacientes queimados, tendo como importante determinante de patogenicidade sua capacidade de formar biofilmes. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a eficácia das soluções biocidas: clorexidina 4%, hipoclorito de sódio 1%, peróxido de hidrogênio 5% e álcool 70% na remoção de biofilmes de *P. aeruginosa* multidroga resistentes. Trata-se de um estudo descritivo de abordagem quantitativa. Foram avaliados biofilmes de nove cepas de *P. aeruginosa*, de diferentes tipos clonais, sendo oito resistentes a carbapenêmicos e uma sensível, coletadas de pacientes queimados e mesas de balneoterapia. As cepas estudadas foram cultivadas juntamente com cupons de aço inoxidável, e incubadas por 24 h. Posteriormente, os cupons foram tratados com e sem biocidas, nos tempos de contato de 15, 5 e 0 minutos. A remoção do biofilme foi avaliada através da contagem de células viáveis obtidas dos cupons com e sem tratamento. A concentração mínima inibitória ao imipenem e meropenem foi determinada para cepas avaliadas através do método epsilométrico. Foi observado formação de biofilme em todos os cupons não tratados com biocidas. Entretanto, não houve contagem de células viáveis após contato do biofilme com todas as soluções biocidas, nos tempos estudados. A concentração mínima inibitória aos carbapenêmicos variou entre 16 a $\geq 32\mu\text{g/mL}$. Concluiu-se que todas as soluções desinfetantes avaliadas, foram eficazes na remoção de biofilmes produzidos pelas cepas de *P. aeruginosa* estudadas.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilmes; Biocidas; Desinfecção; Carbapenêmicos.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most frequent pathogens in infections affecting burn patients, having as an important determinant of pathogenicity its ability to form biofilms. The present work aims to evaluate the effectiveness of biocidal solutions: 4% chlorhexidine, 1% sodium hypochlorite, 5% hydrogen peroxide and 70% alcohol on removal *P. aeruginosa* multidrug-resistant biofilms. This is a descriptive study with a quantitative approach. Biofilms from nine strains of *P. aeruginosa*, of different clonal types, were evaluated. Eight strains

were carbapenem-resistant and one susceptible, collected from burned patients and balneotherapy tables. Strains were grown together with stainless steel coupons and incubated for 24 h. Subsequently, the coupons were treated with and without biocides, at contact times of 15, 5 and 0 minutes. Biofilm removal was assessed by counting viable cells obtained from coupons with and without treatment. The minimum inhibitory concentration for imipenem and meropenem was determined by using the epsilometric method. Biofilm formation was observed in all coupons not treated with biocides. However, there was no count of viable cells after contact of the biofilm with all biocidal solutions, in all times. The minimum inhibitory concentration to carbapenems varied between 16 to $\geq 32\mu\text{g} / \text{mL}$. It was concluded that all the disinfectant solutions evaluated were effective in removing biofilms produced by the studied *P. aeruginosa* strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Biofilms; Biocides; Carbapenems.

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos más frecuentes en infecciones que afectan a pacientes con quemaduras, teniendo como determinante importante de patogenicidad su capacidad para formar biopelículas. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la efectividad de las soluciones biocidas: clorhexidina al 4%, hipoclorito de sodio al 1%, peróxido de hidrógeno al 5% y alcohol al 70% en la eliminación de biopelículas de *P. aeruginosa* multidrogas resistentes. Este es un estudio descriptivo con un enfoque cuantitativo. Se evaluaron biopelículas de nueve cepas de *P. aeruginosa*, de diferentes tipos clonales, ocho resistentes a carbapenems y una sensible, recolectada de pacientes quemados y tablas de balneoterapia. Las cepas estudiadas se cultivaron junto con cupones de acero inoxidable, y se incubaron durante 24 h. Posteriormente, los cupones se trataron con y sin biocidas, en tiempos de contacto de 15, 5 y 0 minutos. La eliminación de la biopelícula se evaluó contando las células viables obtenidas de los cupones con y sin tratamiento. La concentración inhibitoria mínima para imipenem y meropenem se determinó para cepas evaluadas usando el método epsilométrico. Se observó la formación de biopelículas en todos los cupones no tratados con biocidas. Sin embargo, no hubo recuento de células viables después del contacto de la biopelícula con todas las soluciones biocidas, en los tiempos estudiados. La concentración inhibitoria mínima para los carbapenémicos varió entre 16 y $\geq 32 \mu\text{g} / \text{ml}$. Se concluyó que todas las soluciones desinfectantes evaluadas fueron efectivas para eliminar las biopelículas producidas por las cepas estudiadas de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*; Biopelículas; Biocidas; Desinfecção; Carbapenêmicos.

1. Introdução

A lesão por queimadura é uma das mais graves agressões que o organismo humano pode sofrer. Estando entre os tipos mais comuns de trauma em todo o mundo, estima-se que mais de 11 milhões de pessoas por ano apresentem queimaduras que necessitem de atendimento médico (Varkey et al., 2019).

A complicação mais frequente que acomete pacientes com injúrias térmicas é a infecção, sendo a sepse, a principal causa de óbito nestes pacientes (Nunez Lopez et al., 2017). Além do comprometimento imunológico, fatores como hospitalização prolongada e submissão a procedimentos invasivos como uso de cateteres, contribuem para que o paciente queimado seja altamente suscetível à infecção (Schultz et al., 2013).

A balneoterapia em queimados é realizada a fim de prevenir e controlar a infecção, e consiste no desbridamento das áreas lesionadas através de fricção manual (Kowalske, 2011). A remoção física de substâncias tóxicas endo e exógenas, resíduos de tecidos, toxinas de várias origens e microrganismos, incluindo a remoção mecânica do biofilme bacteriano, auxiliam na limpeza da ferida de queimadura (Glik et al., 2018). Associado a este procedimento utilizam-se antimicrobianos tópicos objetivando evitar a infecção da lesão e contribuir para minimizar a carga microbiana local (Hajská et al., 2014).

Dentre os microrganismos Gram negativos isolados em queimados, *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno mais frequente, estando associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (Albayrak et al., 2018). A emergência de cepas de *P. aeruginosa* multidroga resistentes (MDR) é um grave problema de saúde pública, uma vez que infecções por estas cepas são de difícil tratamento devido à redução de opções terapêuticas. Neste cenário, os carbapenêmicos são os antimicrobianos de primeira escolha para tratamento de infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* MDR (Kao et al., 2016). Entretanto, elevadas taxas de resistência a estes antibióticos têm sido relatadas para este patógeno (Djuric et al., 2019).

Um importante fator de patogenicidade encontrado em *P. aeruginosa* é sua capacidade de formar biofilmes. Estudo avaliando cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes queimados, relataram que a produção de biofilme era significativamente maior em cepas MDR (Ghanbarzadeh Corehtash et al., 2015).

Biofilmes consistem em grupos de células bacterianas aderidas a uma superfície e envoltos por polissacarídeos, proteínas e ácido nucleico formando uma matriz polimérica extracelular autoproduzida (Costerton, 1999). O crescimento bacteriano sob a forma de biofilme, fornece população microbiana com propriedades fisiológicas e estruturais diferenciadas. A matriz polimérica funciona como uma barreira que dificulta tanto a atuação de drogas antimicrobianas como do sistema imune do hospedeiro (Singh et al., 2010). No ambiente do biofilme temos taxas de crescimento microbiano alteradas devido ao mesmo ser pobre em nutrientes e ter menor disponibilidade de oxigênio, resultando em atividade metabólica reduzida, levando a formação de *persisters* (Waters et al., 2016). *Persisters* são uma subpopulação específica de células bacterianas que exibem fenótipos temporários de resistência antimicrobiana, geralmente multidroga resistente (Miyae et al., 2018). Além disso, ocorre troca de material genético entre as células do biofilme, uma vez que estão próximas umas das outras, podendo levar a disseminação de resistência antimicrobiana (Flemming, Neu, & Wozniak, 2007).

Em pacientes queimados as feridas podem se contaminar com cepas produtoras de biofilmes. Cabe destacar que os biofilmes possuem importante papel no retardo da cicatrização das feridas e estão presentes em 6% das feridas agudas e 90% das feridas crônicas (Attinger & Wolcott, 2012).

Ao contrário dos antibióticos, os quais afetam processo fisiológico específico, os desinfetantes apresentam mecanismo de ação que não está limitado ao metabolismo bacteriano, tornando-os valiosos agentes antibiofilme (Gilbert, Allison, & McBain, 2002). Biocidas como quaternários de amônio, fenóis, biguanidas e álcoois têm como principal alvo a membrana citoplasmática, podendo promover precipitação do material celular (McDonnell & Russell, 1999). Já desinfetantes como peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido peracético penetram nas células e interagem com constituintes celulares como: proteínas, ácido nucleico, enzimas, levando à morte celular (McDonnell & Russell, 1999). A atividade dos biocidas contra os biofilmes está associada a diversos fatores dentre os quais podemos destacar: a concentração, o tempo de contato, a temperatura, e o pH. Um aumento na concentração do biocida e no tempo de contato, normalmente aumenta a eficácia dos desinfetantes (Surdeau et al., 2006).

As diretrizes clínicas para o uso de biocidas, em geral foram desenvolvidas para microrganismos planctônicos (Cerf, Carpentier, & Sanders, 2010). Entretanto, a maioria dos microrganismos vive como comunidade de células aderidas a uma superfície (biofilme), a qual pode ser até 1.000 vezes mais resistentes aos biocidas que as células planctônicas (Bonez

et al., 2013). Portanto, os desinfetantes comercializados podem ser eficazes contra células planctônicas, e não contra biofilmes.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de quatro soluções biocidas: clorexidina 4%, hipoclorito de sódio 1%, peróxido de hidrogênio 5% e álcool 70% na remoção de biofilmes produzidos por cepas de *P. aeruginosa* MDR isoladas de pacientes queimados e da mesa onde os mesmos eram submetidos à balneoterapia.

2. Metodologia

Trata-se de estudo descritivo com abordagem quantitativa (Pereira et al., 2018), realizado com cepas de *P. aeruginosa* coletadas de um Centro de Tratamento de Queimados (CTQ), localizado em um hospital público de grande porte na cidade do Rio de Janeiro, RJ, de setembro a dezembro de 2012. O presente estudo faz parte do projeto “Aspectos microbiológicos relacionados às infecções bacterianas ocorridas em pacientes internados em um centro de tratamento de queimados de um hospital de grande porte da cidade do Rio de Janeiro, RJ”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Fluminense com o número do parecer 68538.

O CTQ possui 12 leitos (04 infantis, 04 femininos e 04 masculinos) e duas mesas de banho, sendo possível a realização de até seis banhos no mesmo dia, na mesma mesa. O tempo de internação no CTQ pode variar entre 30 e 180 dias. Em média, 80 pacientes são admitidos por ano.

A balneoterapia é realizada diariamente, em uma mesa de aço inoxidável (mesa de Morgani), com quatro pontos de escoamento de água. O paciente não fica imerso, e uma mangueira estéril, é utilizada, ligada a uma torneira com misturador que permite o controle da temperatura e volume de água. Entre cada seção de banho, as mesas de inox são limpas com álcool 70%.

Neste estudo foram utilizadas nove cepas de *P. aeruginosa* MDR, sendo oito resistentes aos carbapenêmicos e uma sensível. Todas as cepas, provenientes do CTQ, foram coletadas de feridas dos pacientes (sete) e da mesa onde a balneoterapia era realizada (duas). Quatro cepas, incluindo uma sensível aos carbapenêmicos, pertenciam ao clone A (ST2236) e as outras cinco à diferentes tipos clonais, no entanto enquadradas no mesmo *Multi Locus Sequence Type* (MLST) - ST2237, obtidos em estudo prévio (de Almeida Silva et al., 2017; Deutsch et al., 2016).

As cepas estavam estocadas a -80°C em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) contendo 20% de glicerol (v/v), e foram ativadas em meio TSB, sendo posteriormente semeadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA) para a constatação da pureza das mesmas.

A formação de biofilme foi avaliada utilizando cupons de aço inoxidável *American Iron and Steel Institute* (AISI) 304 com acabamento número 4 (#4) e rugosidade de $0,36\ \mu\text{m}$ com $1,0\ \text{cm} \times 1,0\ \text{cm}$, de acordo com metodologia previamente descrita (Parizzi et al., 2004), com algumas modificações.

Três a quatro colônias foram transferidas para 5 mL de TSB e incubadas a $36^{\circ}\ \text{C}$ por 24 horas. Diluições seriadas (1:10) do inóculo em água peptonada 0,1% (p/v) foram realizadas a fim de se obter a concentração inicial de 10^2 a 10^3 UFC/mL. Após obtenção da concentração inicial desejada, foi adicionado 1 mL do inóculo em 9 mL de TSB, seguido da adição do cupom em tubo (Falcon®) estéril de 15 mL. Em seguida os tubos, cada qual contendo uma cepa em contato com um cupom, foram incubados por 24 horas a $36^{\circ}\ \text{C}$.

Após incubação, os cupons de aço inoxidável foram retirados dos meios de cultivo e imersos em tubo (Falcon®) contendo 10 mL de solução tampão salina fosfato (PBS) por 1 minuto, a fim de remover as células planctônicas. Em seguida foram retirados desta solução e imersos em tubos (Falcon®) contendo 5 mL de PBS e agitados em vortex (QL-901 Vortex – Vertex) por 2 minutos para remoção das células sésseis. Diluições seriadas das soluções de PBS pós-vortex foram plaqueadas em TSA, a fim de se determinar o número de unidades formadoras de colônia (UFC)/ cm^2 . Todo o experimento foi realizado em triplicata.

O cálculo do número de UFC/ cm^2 , considerando a área do cupom e os volumes utilizados, foi realizado utilizando a equação abaixo:

$$\text{UFC}/\text{cm}^2 = \frac{\text{VD}}{\text{VA}} \times \text{M} \times \text{D}$$

A

Onde:

VD = volume de diluente utilizado na rinsagem do cupom (5mL); VA= volume da alíquota utilizada no plaqueamento (0,1mL); M= média das contagens obtidas nas placas (UFC); D= diluição realizada; A= área do cupom (2cm^2).

A fim de avaliar a remoção dos biofilmes formados, foram utilizadas soluções biocidas preparadas através de diluições com água MilliQ estéril das seguintes soluções obtidas comercialmente: Hipoclorito de sódio 44,99% (Sigma-Aldrich®), Peróxido de hidrogênio 30% (Isifar®), Clorexidina 20% (Sigma-Aldrich®), Etanol 99% (Isifar®) a fim

de se obter concentração final de hipoclorito de sódio 1% (v/v), peróxido de hidrogênio 5% (v/v), clorexidina 4% (v/v) e álcool 70% (v/v).

A formação do biofilme foi realizada de acordo com procedimento descrito anteriormente, sendo que após lavagem do cupom em 10 mL de PBS por 1 minuto, o mesmo foi retirado desta solução e imerso em 10 mL de cada solução biocida por 15, 5 e 0 minutos, sendo este último com imersão e retirada imediata, antes de ser transferido para tubo contendo 5mL de PBS adicionado de agente neutralizante para inativação do biocida, tiosulfato de sódio a 1% (p/v) para inativar o hipoclorito e Tween 80 a 1% (v/v) para inativar a clorexidina; o peróxido de hidrogênio e o álcool não necessitam de neutralização (Toté et al., 2010). Os tubos foram agitados em vortex por 2 minutos para remoção das células sésseis. Diluições seriadas das soluções de PBS pós-vortex foram plaqueadas em TSA a fim de se determinar o número de UFC/cm². Todo o experimento foi realizado em triplicata. O número de UFC/cm² foi determinado utilizando a mesma equação do item anterior.

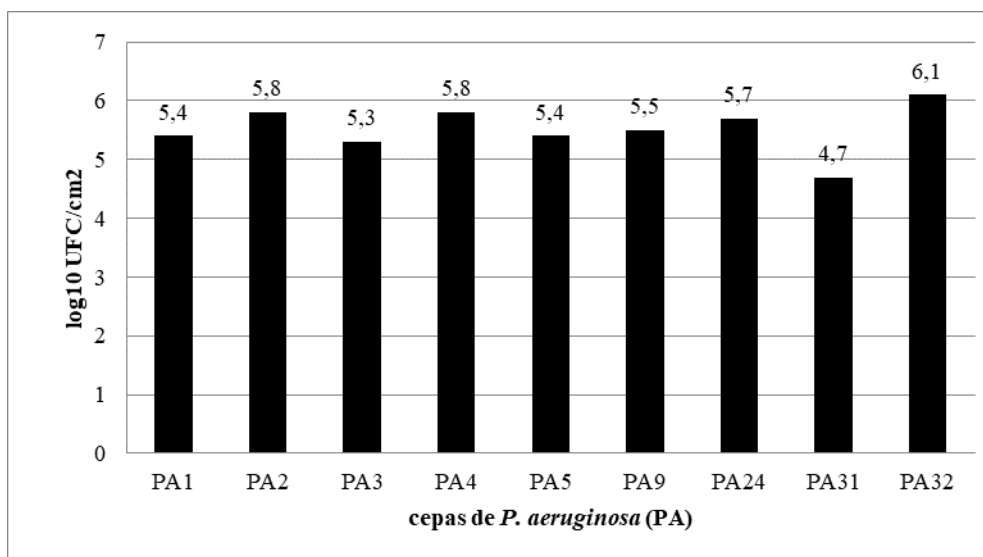
As concentrações mínimas inibitórias (CMI) ao imipenem e meropenem foram determinadas pelo Teste Epsilométrico (M.I.C.EvaluatorTM; Oxoid), de acordo com protocolo do fabricante, para as cepas resistentes aos carbapenêmicos, verificadas em estudo prévio (de Almeida Silva et al., 2017). Exceto para as cepas 9 e 32, pois não se encontravam mais viáveis no momento deste experimento. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle para este teste. Os valores de CMI obtidos para o imipenem e meropenem foram comparados com seus respectivos *breakpoints* constantes no *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Os resultados das contagens bacteriológicas do biofilme formado foram convertidos para log₁₀ UFC/cm². Nesta avaliação, foram realizados três experimentos independentes tendo sido o tratamento estatístico dos resultados obtido pela análise de variância (ANOVA) e teste de comparação múltipla de Tukey. Para tal, foi utilizado o programa GraphPad Prism[®], versão 5.01. Valores de p<0,05 foram considerados significativos.

3. Resultados

Todas as cepas de *P. aeruginosa* avaliadas foram capazes de formar biofilme em cupons de aço inoxidável.

Figura 1. Formação de biofilme em cupons de aço inoxidável para 9 cepas de *P. aeruginosa* MDR.



Fonte: Autores.

Conforme representado na Figura 1, a contagem de células sésseis (log₁₀ UFC/cm²) foi um pouco maior na cepa PA32 que nas demais analisadas, as quais apresentaram contagens semelhantes. A cepa PA31, apresentou menor contagem de células sésseis. No entanto, a análise estatística demonstrou que a capacidade de formação de biofilme não diferiu significativamente entre as cepas ($p > 0,05$).

A análise dos biocidas sobre os biofilmes formados demonstrou que todos os compostos analisados possuem atividade contra biofilme produzido pelas cepas de *P. aeruginosa* avaliadas, uma vez que, não houve contagens de células viáveis após contato com os 4 biocidas testados (hipoclorito de sódio 1%, peróxido de hidrogênio 5%, clorexidina 4% e álcool 70%) nos 3 tempos estudados (15, 5 e 0 minutos).

As cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos avaliadas no presente estudo apresentaram elevados valores de CMI para imipenem e meropenem (Tabela1).

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória para Imipenem e Meropenem em cepas de *P. aeruginosa* MDR.

Cepas	Origem	Perfil Clonal		CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
		PFGE	MLST	MER	IMP
PA1	P	A1	ST2236	*	*
PA2	P	D	ST2237	32	>32
PA3	P	A2	ST2236	>32	>32
PA4	M	E	ST2237	>32	16
PA5	P	NT	ST2237	>32	16
PA9	P	A2	ST2236	**	**
PA24	M	A1	ST2236	2	>32
PA31	P	C	ST2237	32	32
PA32	P	NT	ST2237	**	**

P= paciente; M= mesa onde era realizada a balneoterapia; NT= não tipado; IMP= imipenem; MER= meropenem; * = não realizado pois cepa era suscetível aos carbapenêmicos; **= não realizado devido à inviabilidade das cepas.

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 1, os valores de CMI variaram de 16 a $>32\mu\text{g/mL}$ para imipenem e $\geq 32\mu\text{g/mL}$ para meropenem. Exceto a cepa PA24, a qual apresentou suscetibilidade a este último antimicrobiano, apresentando um valor de CMI= $2\mu\text{g/mL}$, uma vez que o valor do *breakpoint* constante no CLSI (2018) para que sejam consideradas resistentes é $\geq 8\mu\text{g/mL}$ para ambos antibióticos.

4. Discussão

No presente estudo a formação de biofilme foi avaliada em cupons de aço inoxidável, com a finalidade de mimetizar a superfície das mesas onde era realizada a balneoterapia nos pacientes queimados. Devido ao fato, de cepas com o mesmo perfil clonal (PFGE), em sua maioria classificadas como clone A (A1 e A2), terem sido identificadas a partir de amostras obtidas tanto dos pacientes como da mesa de balneoterapia (Deutsch et al., 2016), postulou-se

que estava havendo falhas no processo de desinfecção da mesa e que isso seria a causa da contaminação cruzada entre pacientes.

Estudos envolvendo *P. aeruginosa* em pacientes queimados demonstraram que mais de 90% das cepas eram formadores de biofilme (Ghanbarzadeh Corehtash et al., 2015; Jabalameli et al., 2012). Dados do *National Institutes of Health e Center for Disease and Prevention* relataram uma estimativa de que 65-80% das infecções acometendo humanos sejam causadas por biofilme (Ramos-Gallardo, 2016).

Biofilme produzido por *P. aeruginosa* é amplamente estudado em queimados, uma vez que está associado a lesões crônicas nestes pacientes (Ramos-Gallardo, 2016; Wolcott & Dowd, 2011), pois favorece a permanência do patógeno na lesão, já que protege o mesmo do sistema imunológico do hospedeiro e aumenta resistência a antimicrobianos (Høiby et al., 2010; Singh et al., 2010).

A presença de microrganismos formadores de biofilme na ferida, em especial nas lesões provenientes de injúrias térmicas, deve ser observada com atenção e cuidado pela equipe de enfermagem, uma vez que pode promover hipóxia tecidual e aumento da resposta inflamatória, retardando o processo de reparo tecidual fisiológico (Malone et al., 2017).

P. aeruginosa é o microrganismo mais comum relacionado a sepse em pacientes queimados (Banu et al., 2017). Sua capacidade de produzir biofilmes pode estar associada à falência terapêutica nestes pacientes. Sendo assim a prevenção da reinfecção de pacientes queimados, através da desinfecção das mesas de balneoterapia é de extrema importância.

A desinfecção é uma etapa crucial no controle das infecções relacionadas à assistência em saúde (IRAS), as quais têm sido responsáveis por significantes morbidades e mortalidades em ambientes hospitalares (Bonez et al., 2013). O aumento do uso de desinfetantes em concentrações menores do que as recomendadas pelo fabricante, compromete a eficácia do processo de desinfecção, bem como pode facilitar a seleção de cepas resistentes aos biocidas. Acredita-se que, o ambiente hospitalar constitui reservatório de bactérias que apresentam alta tolerância a produtos desinfetantes, devido à má utilização dos mesmos (Marino, Frigo, Bartolomeoli, & Maifreni, 2011).

A matriz de constituintes do biofilme de *P. aeruginosa* é formada por exopolissacarídeos (alginate, Pel ou Psl), proteínas e DNA extracelular (Abdallah et al., 2014). Essa matriz atua como um aparato que dificulta as trocas entre os ambientes intra e extra biofilme, impedindo a atuação dos biocidas; promove a troca de material genético, possibilitando que genes de resistência sejam compartilhados. Sendo assim, mesmo que o

desinfetante reduza completamente a contagem de células sésseis viáveis, alguns biocidas deixam a matriz intacta, e possibilita a recolonização (Toté et al., 2010).

Estudo prévio demonstrou que somente agentes oxidantes fortes como peróxido de hidrogênio a 5% e hipoclorito de sódio a 1% foram ativos contra ambos, massa viável e matriz em biofilmes de *P. aeruginosa* (Toté et al., 2010). Sendo este, o motivo para escolha destes biocidas para análise da remoção dos biofilmes em cupons de aço inoxidável.

Apesar da metodologia aplicada no presente estudo, não avaliar redução da matriz exopolissacarídica (EPS), a contagem de células sésseis foi analisada. No presente estudo, estes biocidas também se demonstraram eficazes, não havendo contagem de células sésseis viáveis em todos os biofilmes analisados, após o tempo de contato de 15, 5 e 0 minutos.

Outro biocida que teve sua atividade avaliada neste estudo foi a clorexidina 4%. Estudo anterior sobre este biocida relatou sua eficácia sobre células planctônicas, porém não sobre biofilmes (Bonez et al., 2013). O amplo uso deste agente em ambientes hospitalares, fez com que o mesmo também fosse selecionado para o estudo. Ao contrário do resultado obtido no trabalho anteriormente citado, a clorexidina 4% foi eficaz na remoção de todos os biofilmes avaliados, não havendo contagem de células sésseis viáveis após os tempos de contato previamente estabelecidos.

O álcool 70% foi selecionado para o teste, pois foi o biocida mais utilizado para desinfecção das mesas de balneoterapia no CTQ onde foram coletadas as amostras. Quando avaliado em estudo prévio (Toté et al., 2010), o álcool 70% apresentou redução do biofilme de *P. aeruginosa* em 96% após 15 minutos de contato. No atual estudo, este biocida se mostrou ainda mais eficaz, eliminando todo biofilme formado, mesmo no tempo zero quando a imersão do cupom na solução alcóolica foi instantânea.

O teste de suscetibilidade aos carbapenêmicos apresentou elevados valores da CMI tanto para o imipenem quanto para o meropenem. Este fato, agrava ainda mais a condição dos pacientes infectados pelas cepas estudadas, devido à falta de opções terapêuticas, uma vez que estas cepas são MDR. Os carbapenêmicos apresentam amplo espectro de atividade antibacteriana, e por isso, são mais confiáveis como último recurso terapêutico para infecções bacterianas graves (Meletis, 2016). Portanto, a disseminação de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a estes antimicrobianos entre pacientes deste CTQ, que utilizavam a mesma mesa de balneoterapia é de grande importância para saúde pública.

A contaminação cruzada entre pacientes que utilizavam a mesma mesa de balneoterapia, demonstram a necessidade de treinamento da equipe de profissionais envolvida no processo de limpeza e desinfecção deste CTQ. A eficácia deste procedimento é

imprescindível para reduzir a reinfecção em pacientes altamente suscetíveis, como é o caso dos queimados.

Medidas simples como essa, poderão levar a diminuição da estadia hospitalar e gastos com uso prolongado de antimicrobianos; além de contribuir para redução das taxas de mortalidade por infecção nestes pacientes.

5. Conclusão

A remoção de biofilme em cupom de aço inoxidável demonstrou-se eficaz, com todas as soluções desinfetantes avaliadas (hipoclorito de sódio 1%, peróxido de hidrogênio 5%, clorexidina 4% e álcool 70%). Tal fato indica possível falha no processo de desinfecção nesta unidade hospitalar, a qual pode ter ocorrido na etapa de higienização da mesa ou diluição dos biocidas, pois um mesmo clone foi detectado infectando paciente e contaminando a mesa de balneoterapia.

Se a desinfecção for realizada corretamente, a contaminação cruzada entre pacientes, bem como, a disseminação de cepas resistentes a antimicrobianos de alta relevância como os carbapenêmicos, podem ser evitadas.

Para trabalhos futuros, sugere-se que uma nova análise microbiológica seja realizada neste CTQ, a fim de verificar se *P. aeruginosa* ainda permanece como principal patógeno causando infecções nos pacientes ali tratados e qual tipo clonal permaneceu neste ambiente. Bem como monitorar seu perfil de resistência antimicrobiana e a eficácia da desinfecção das mesas de balneoterapia.

Referências

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol*, 196(7), 453-472.

Albayrak, Y., Temiz, A., Albayrak, A., Peksöz, R., Albayrak, F., & Tanrıku, Y. (2018). A retrospective analysis of 2713 hospitalized burn patients in a burns center in Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 24(1), 25-30.

Attinger, C., & Wolcott, R. (2012). Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1(3), 127-132.

Banu, A., Mathew, P., Manasa, S., & Shetty, A. B. (2017). Bacteriological profile of burn wound infections with reference to biofilm formation. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 4(4), 127-129.

Bonez, P. C., Dos Santos Alves, C. F., Dalmolin, T. V., Agertt, V. A., Mizdal, C. R., Flores, V. C., Marques, J. B., Santos, R. C. V., & Anraku de Campos, M. M. (2013). Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control*, 41(12), e119-122.

Cerf, O., Carpentier, B., & Sanders, P. (2010). Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. *Int J Food Microbiol*, 136(3), 247-254.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, (28th ed.), CLSI, Wayne, P.A.

Costerton, J. W. (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 11(3-4), 217-221; discussion 237-219.

de Almeida Silva, K. C., Calomino, M. A., Deutsch, G., de Castilho, S. R., de Paula, G. R., Esper, L. M., & Teixeira, L. A. (2017). Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns*, 43(1), 137-143.

Deutsch, G., Bokehi, L. C., Silva, A. E. G. P. R., Guimarães Junior, L. M., Rodrigues, R., Esper, L. M. R., Gonzalez, A. G. M., Paula, G. R., Castilho, S. R., & Teixeira, L. A. (2016). Balneotherapy is a potential risk factor for *pseudomonas aeruginosa* colonization. *Braz J Pharm Sci*, 52(1), 125-132.

Djuric, O., Markovic-Denic, L., Jovanovic, B., & Bumbasirevic, V. (2019). High incidence of multiresistant bacterial isolates from bloodstream infections in trauma emergency department and intensive care unit in Serbia. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 66(3), 307-325.

Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*, 189(22), 7945-7947.

Ghanbarzadeh Corehtash, Z., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H., & Mahmoudi Aznaveh, A. (2015). Biofilm Formation and Virulence Factors Among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients. *Jundishapur J Microbiol*, 8(10), e22345.

Gilbert, P., Allison, D. G., & McBain, A. J. (2002). Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J Appl Microbiol*, 92 Suppl, 98S-110S.

Glik, J., Łabuś, W., Kitala, D., Mikuś-Zagórska, K., Roberts, C. D., Nowak, M., Kasperczyk, A., & Kawecki, M. (2018). A 2000 patient retrospective assessment of a new strategy for burn wound management in view of infection prevention and treatment. *Int Wound J*, 15(3), 344-349.

Hajská, M., Slobodníková, L., Hupková, H., & Koller, J. (2014). In vitro efficacy of various topical antimicrobial agents in different time periods from contamination to application against 6 multidrug-resistant bacterial strains isolated from burn patients. *Burns*, 40(4), 713-718.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35(4), 322-332.

Jabalamehi, F., Mirsalehian, A., Khoramian, B., Aligholi, M., Khoramrooz, S. S., Asadollahi, P., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2012). Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*, 38(8), 1192-1197.

Kao, C. Y., Chen, S. S., Hung, K. H., Wu, H. M., Hsueh, P. R., Yan, J. J., & Wu, J. J. (2016). Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol*, 16(1), 107.

Kowalske, K. J. (2011). Burn wound care. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 22(2), 213-227.

Malone, M., Bjarnsholt, T., McBain, A. J., James, G. A., Stoodley, P., Leaper, D., Tachi, M., Schultz, G., Swanson, T., & Wolcott, R. D. (2017). The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care*, 26(1), 20-25.

Marino, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., & Maifreni, M. (2011). Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *J Appl Microbiol*, 110(2), 550-561.

McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*, 12(1), 147-179.

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*, 3(1), 15-21.

Miyae, S., Suzuki, E., Komiyama, Y., Kondo, Y., Morikawa, M., & Maeda, S. (2018). Bacterial Memory of Persisters: Bacterial Persister Cells Can Retain Their Phenotype for Days or Weeks After Withdrawal From Colony-Biofilm Culture. *Front Microbiol*, 9, 1396.

Nunez Lopez, O., Cambiaso-Daniel, J., Branski, L. K., Norbury, W. B., & Herndon, D. N. (2017). Predicting and managing sepsis in burn patients: current perspectives. *Ther Clin Risk Manag*, 13, 1107-1117.

Parizzi, S. Q. F., Andrade, N. J. d., Silva, C. A. d. S., Soares, N. d. F. F., & Silva, E. A. M. d. (2004). Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol*, 47(1), 77-83.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J., & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [*e-book*]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Ramos-Gallardo, G. (2016). Chronic Wounds in Burn Injury: A Case Report on Importance of Biofilms. *World J Plast Surg*, 5(2), 175-180.

Schultz, L., Walker, S. A., Elligsen, M., Walker, S. E., Simor, A., Mubareka, S., & Daneman, N. (2013). Identification of predictors of early infection in acute burn patients. *Burns*, 39(7), 1355-1366.

Singh, G., Wu, B., Baek, M. S., Camargo, A., Nguyen, A., Slusher, N. A., Srinivasan, R., Wiener-Kronish, J. P., & Lynch, S. V. (2010). Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxins is dependent on pseudomonas quinolone signal concentration. *Microb Pathog*, 49(4), 196-203.

Surdeau, N., Laurent-Maquin, D., Bouthors, S., & Gellé, M. P. (2006). Sensitivity of bacterial biofilms and planktonic cells to a new antimicrobial agent, Oxsil 320N. *J Hosp Infect*, 62(4), 487-493.

Toté, K., Horemans, T., Vanden Berghe, D., Maes, L., & Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol*, 76(10), 3135-3142.

Varkey, M., Visscher, D. O., van Zuijlen, P. P. M., Atala, A., & Yoo, J. J. (2019). Skin bioprinting: the future of burn wound reconstruction? *Burns & Trauma*, 7, s41038-019-0142-7.

Waters, E. M., Rowe, S. E., O'Gara, J. P., & Conlon, B. P. (2016). Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathog*, 12(12), e1006012.

Wolcott, R., & Dowd, S. (2011). The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg*, 127 Suppl 1, 28S-35S.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Keila de Cássia Ferreira de Almeida Silva - 30%

Mariana Alcântara Calomino – 15%

Gabriela Deutsch - 15%

Bruna Maiara Ferreira Barreto Pires – 10%

Luciana Maria Ramires Esper – 10%

Geraldo Renato de Paula – 10%

Lenise Arneiro Teixeira – 10%