

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM**

CRISTIANA DA COSTA LUCIANO

**AÇÃO DE DETERGENTES E DESINFETANTES EM BIOFILME
TRADICIONAL E *BUILDUP* NO MODELO MBEC**

GOIÂNIA, 2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: Cristiana da Costa Luciano

Título do trabalho: Ação de detergentes e desinfetantes em biofilme tradicional e *buildup* no modelo MBEC

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do (a) autor (a)

Data: 19/ 12 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

CRISTIANA DA COSTA LUCIANO

**AÇÃO DE DETERGENTES E DESINFETANTES EM BIOFILME
TRADICIONAL E *BUILDUP* NO MODELO MBEC**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Faculdade de Enfermagem - FEN, da Universidade Federal de Goiás - UFG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Enfermagem.

Área de concentração: A Enfermagem no cuidado à saúde humana.

Orientadora: Dr^a. Anaclara Ferreira Veiga Tipple

Coorientadora: Dr^a. Michelle J. Alfa

Linha de pesquisa: Epidemiologia, prevenção e controle de doenças infecciosas

GOIÂNIA, 2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa Luciano, Cristiana da
AÇÃO DE DETERGENTES E DESINFETANTES EM BIOFILME
TRADICIONAL E BUILDUP NO MODELO MBEC [manuscrito] /
Cristiana da Costa Luciano. - 2016.
CLXVI, 166 f.: il.

Orientador: Prof. Anaclara Ferreira Veiga Tipple; co-orientador
Michelle J. Alfa.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, , Programa
de Pós-Graduação em Enfermagem, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Apêndice.

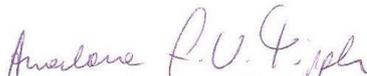
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Endoscópios Gastrointestinais . 2. Biofilmes . 3. Desinfecção. I.
Ferreira Veiga Tipple, Anaclara , orient. II. Título.

CDU 616-083

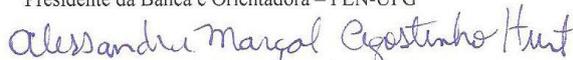
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE CRISTIANA DA COSTA LUCIANO. Aos dezoito dias do mês de dezembro de dois mil e dezesseis (19/12/2016), às 14h30 min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: **Profa. Dra. Anaclara Ferreira Veiga Tipple, Profa. Dra. Alessandra Marçal Agostinho Hunt, Prof. Dr. Evandro Watanabe, Profa. Dra. Dulcelene de Souza Melo e Profa. Dra. Sheila Araujo Teles** sob a presidência da primeira, em sessão pública realizada no Auditório da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás, para procederem à avaliação da defesa de Tese intitulada **AÇÃO DE DETERGENTES E DESINFETANTES EM BIOFILME, TRADICIONAL E BUILDUP NO MODELO MBEC**, em nível de **Doutorado**, área de concentração em **A ENFERMAGEM NO CUIDADO À SAUDE HUMANA**, de autoria de **Cristiana da Costa Luciano**, discente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da **Banca Examinadora: Profa. Dra. Anaclara Ferreira Veiga Tipple**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A seguir, a palavra foi concedida a autora da Tese que, em 50 minutos, fez a apresentação de seu trabalho. Logo em seguida, cada membro da Banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo em vista o que consta no Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, a Tese foi **APROVADA**, por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **DOCTORA EM ENFERMAGEM**, área de concentração em **A ENFERMAGEM NO CUIDADO À SAUDE HUMANA** pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega, na secretaria do programa, da versão definitiva da tese, com as correções solicitadas pela Banca e com o comprovante de envio de artigo científico, oriundo desta tese para publicação em periódicos de circulação nacional e ou internacional. Cumpridas as formalidades de pauta, às 18h30min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese de Doutorado e, para constar, foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em quatro vias de igual teor.



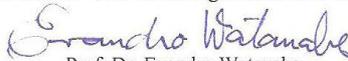
Profa. Dra. Anaclara Ferreira Veiga Tipple

Presidente da Banca e Orientadora – FEN-UFG



Profa. Dra. Alessandra Marçal Agostinho Hunt

Membro efetivo – PhD of Michigan State University/USA



Prof. Dr. Evandro Watanabe

Membro efetivo – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP



Profa. Dra. Dulcelene de Souza Melo

Membro efetivo – FEN-UFG



Profa. Dra. Sheila Araujo Teles

Membro efetivo – FEN-UFG

Pesquisa desenvolvida junto ao Núcleo de Estudos e Pesquisa de Enfermagem em Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (NEPIH) da Faculdade de Enfermagem – (FEN), Universidade Federal de Goiás – (UFG), com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico esta vitória aos meus queridos familiares. Sem o estímulo de vocês, com certeza, não conseguiria caminhar nesta longa jornada. Meu papai, Fausto (em memória), com suas conversas acolhedoras em momentos de desespero e com palavras de homem sábio nos momentos certos. À minha mamãe, Francisca, que, mesmo em momentos de tristeza e apuros, ela estava presente para sorrir e nunca me deixar desistir. Aos meus irmãos, Maísa e Flávio, que durante a minha ausência não deixaram a relação harmoniosa de irmãos se perder na distância. Vocês são mais que especiais em minha vida. Aos meus cunhados, Kelly e Juninho, por sempre estarem compartilhando comigo as minhas conquistas. E aos meus queridos sobrinhos, Manuella, Pedro, Teodoro e Isadora, que souberam lembrar com alegria da Tia Dedé que ficou ausente do nascimento, crescimento e desenvolvimento de vocês, mas eu os amo demais.

Sei que foi uma longa caminhada de mais de três anos, sendo um desses anos bem distante de todos vocês, literalmente separada por um enorme oceano. Não poderia deixar de mencionar meu amor maior a Deus, por sempre ser sublime nas coisas mais lindas da minha vida. Só tenho a agradecer por cuidar tão bem de todos os caminhos que tenho trilhado. Minha vida sempre foi maravilhosa e é porque sou guiada pelo Senhor.

Agradeço carinhosamente pela atenção da minha professora e orientadora Dr^a. Anaclara, que me ensinou muito bem o papel de um doutor perante a sociedade e a educação. Com certeza eu não poderia ter orientadora melhor. Seguirei os seus passos na minha vida de Doutora e professora universitária.

E finalmente, jamais esquecerei todo o meu aprendizado científico, pessoal e cultural da minha etapa do doutorado sanduíche na cidade de Winnipeg, Manitoba, Canadá. Foi quase um ano de muito conhecimento e desafios. Agradecidamente eu serei à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Educação, por proporcionarem essa oportunidade no meu desenvolvimento e caminho de Doutora em Enfermagem.

Palavras são pequenas para manifestar meu carinho, admiração e agradecimento a duas pessoas especiais na minha caminhada do doutorado no Canadá. Dr^a Michelle Alfa e Nancy Olson. Acredito que consigo resumir vocês em uma palavra “sensacionais”. Como foi maravilhoso participar desta pesquisa com

vocês, adorei cada momento, cada aprendizado. Não poderia ter sido melhor o meu doutorado e a minha pesquisa com a presença de vocês.

*“Que Deus me dê a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar,
coragem para mudar as que posso, e sabedoria para distinguir entre elas”.*

(Reinhold Neibuhr)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	14
LISTA DE QUADROS	17
LISTA DE ARTIGOS	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	21
RESUMO	25
ABSTRACT	27
RESUMEN	29
APRESENTAÇÃO.....	30
1. INTRODUÇÃO	33
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. REVISÃO DA LITERATURA	40
3.1 ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS NA PRÁTICA CLÍNICA	41
3.1.1 TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS POR MEIO DE ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS	45
3.2 PROCESSAMENTO DOS ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS	49
3.2.1 ETAPAS DO PROCESSAMENTO DOS ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS.....	52
a) 1ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: PRÉ-LIMPEZA	53
b) 2ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: LIMPEZA.....	54
c) 3ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: DESINFECÇÃO DE ALTO NÍVEL.....	60
d) 4ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: ENXÁGUE.....	65
e) 5ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: SECAGEM	65
f) 6ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: ARMAZENAMENTO	66
3.3 BIOFILME EM PRODUTOS PARA A SAÚDE	67
4. METODOLOGIA.....	75
4.1 TIPO DE PESQUISA	76
4.2 LOCAL E PERÍODO	76
4.3 MATERIAL.....	76
4.4 MICRO-ORGANISMO E CULTURA.....	78
4.4.1 DESAFIO ORGÂNICO: BACTÉRIAS E ARTIFICIAL SOLO TESTE	78
4.5 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME.....	79

4.5.1 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME TRADICIONAL.....	79
4.5.2 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME <i>BUILDUP</i>	82
4.6 TESTES	84
4.6.1 TESTES COM DETERGENTES E DESINFETANTES DE ALTO NÍVEL..	84
4.7 EXTRAÇÃO DOS <i>PEGS</i> PARA ANÁLISES	86
4.8 EFICÁCIA DE EXTRAÇÃO DO BIOFILME EM MEBEC/<i>PEGS</i>	88
4.9 CONTROLES	90
4.9.1 CONTROLE NEGATIVO.....	90
4.9.2 CONTROLE POSITIVO	91
4.9.3 GRUPO TESTE	91
4.10 ANÁLISE DO BIOFILME	91
4.10.1 CONTAGEM BACTERIANA	91
4.10.2 ANÁLISE DE PROTEÍNA.....	92
4.10.3 ANÁLISE DE CARBOIDRATO.....	93
4.10.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	94
4.11 TESTE COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO	95
4.11.1 TESTE DOS DETERGENTES COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO	95
4.11.2 TESTE DE NEUTRALIZANTE COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO	96
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	96
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1 ARTIGO 01 – AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE DIFERENTES DETERGENTES E DESINFETANTES NA DESTRUIÇÃO E REMOÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NO BIOFILME TRADICIONAL.....	99
5.2 ARTIGO 02 – NOVO MODELO DE BIOFILME <i>BUILDUP</i> SIMULANDO A ACUMULAÇÃO DE MATERIAL NOS CANAIS DE ENDOSCÓPIO FLEXÍVEL	120
6. CONCLUSÃO.....	140
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
REFERÊNCIAS	146
APÊNDICE	164
APÊNDICE A	165
APÊNDICE B	166

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: <i>Design</i> do aparelho de endoscopia gastrointestinal flexível	42
Figura 02: Procedimentos de endoscopia – Endoscopia digestiva alta	44
Figura 03: Fluxograma das etapas do processamento de endoscópios (pré - desinfecção, desinfecção e armazenamento)	50
Figura 04: Etapas de processamento dos endoscópios gastrointestinais flexíveis	53
Figura 05: Círculo Sinner	54
Figura 06: Adaptadores para o <i>flushing</i>	56
Figura 07: Teste de adenosina trifosfato para aparelhos de endoscopia	59
Figura 08: Etapas do desenvolvimento do Biofilme	68
Figura 09: Tipo de adesão bacteriana	70
Figura 10: Desenvolvimento do biofilme tradicional	72
Figura 11: Desenvolvimento do biofilme <i>buildup</i>	73
Figura 12: MBEC (A) MBEC com <i>pegs</i> aderidos à tampa e sua base constituída por 96 poços utilizados para armazenar o solo formador do biofilme, (B) visão dos <i>pegs</i> quando suspensos da base.....	77
Figura 13: MBEC (A) demonstra os <i>pegs</i> com a capacidade de aderência do biofilme na superfície de plástico, (B) <i>pegs</i> submersos à base do MBEC, mostrando o contato com a substância utilizada para a formação do biofilme..	78
Figura 14: Cabine de segurança biológica com fluxo laminar	79
Figura 15: Fluxograma de desenvolvimento do biofilme tradicional em oito dias/etapas	80
Figura 16: (A) MBEC com a visão dos <i>pegs</i> sem presença de formação de biofilme, (B) Poços com presença de solo (AST e bactérias) para o desenvolvimento do biofilme tradicional.....	81

Figura 17: <i>Rocking table</i> utilizado para movimentar o MBEC durante a formação do biofilme.	81
Figura 18: MBEC com biofilme tradicional aderido aos <i>pegs</i>	82
Figura 19: Fluxograma de desenvolvimento do biofilme <i>buildup</i> em oito dias/etapas	83
Figura 20: Demonstração esquemática da análise de exposição dos biofilmes tradicional e <i>buildup</i> aos detergentes e desinfetantes	85
Figura 21: Processo de extração do biofilme para análise	87
Figura 22: Demonstração, na cabine, de modo a impedir que a umidade interferisse na análise de peso	89
Figura 23: Inspeção visual dos <i>pegs</i> após exposição e extração	89
Figura 24: Poços com 96 espaços para análise de proteína, após adição de reagente e incubação. As três primeiras colunas são correspondentes às amostras-padrão para a formação da curva de proteína e para a leitura das demais amostras	93
Figura 25: Poços com 96 espaços para análise de carboidrato, após adição de reagente/ácidos. As três primeiras colunas são correspondentes às amostras-padrão para a formação da curva de carboidrato e padrão para a leitura das demais amostras	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Síntese dos estudos referente a infecções e surtos por meio de aparelhos de endoscopia (GOIÂNIA, 2016)	48
Quadro 02: Tipos de procedimentos endoscópios e nível de descontaminação (WHO, 2016)	49
Quadro 03: Etapas do processamento de endoscópios flexíveis e suas finalidades (WHO; 2016)	51
Quadro 04: Comparação de diretrizes para o processamento de endoscópios gastrointestinais flexíveis (GOIÂNIA, 2016)	52
Quadro 05: Detergentes e desinfetantes avaliados quanto à destruição e remoção dos biofilmes tradicional e <i>buildup</i> (GOIÂNIA, 2016)	86

LISTA DE ARTIGOS

Artigo 01: Avaliação da habilidade de diferentes detergentes e desinfetantes na destruição e remoção de micro-organismos no biofilme tradicional 99

Autores: Cristiana da Costa Luciano, Nancy Olson, Anaclara Ferreira Veiga Tipple e Michelle Alfa.

Revista: American Journal of Infection Control

Situação: Publicado em novembro de 2016

Artigo 02: Novo modelo de biofilme *Buildup* simulando a acumulação de material nos canais de endoscópio flexível 120

Autores: Cristiana da Costa Luciano, Nancy Olson, Patricia DeGagne, Rodrigo França, Anaclara Ferreira Veiga Tipple e Michelle Alfa.

Revista: Journal of Microbiological Methods

Situação: Publicado em agosto de 2016

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APH	Acelerador Peróxido de Hidrogênio
ASGE	Sociedade Americana de Endoscopia Gastrointestinal
ATNC	Agentes Transmissíveis Não Convencionais
ATS	<i>Artificial Soil test</i> (Artificial Solo Teste)
ATP	Adenosina Trifosfato
AP	Ácido Peracético
AS	Ágar de Sangue
BBF	Biofilme <i>Buildup</i>
BSG	<i>British Society of Gastroenterology</i> (Sociedade Britânica de Gastroenterologia)
CC	Centro Cirúrgico
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CIM	Concentração Inibitória Mínima (MIC - <i>Minimum Inhibitory concentration</i>)
CEM	Concentração Mínima Eficaz (MEC - <i>Mimumum effective concentration</i>)
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CME	Centro de Material e Esterilização
CS	Corrente Sanguínea
D1 ou DET1	Detergente <i>Prolystica</i> Enzimático
D2 ou DET2	Detergente <i>Prolystica</i> Neutro
D3 ou DET3	Detergente <i>Neodisher</i>
D4 ou DET4	Detergente <i>Endozime</i>
DAN 1	Desinfetante de Alto Nível Glutaraldeído
DAN 2	Desinfetante de Alto Nível Ortoftaldeído
DAN 3	Desinfetante de Alto Nível Acelerador Peróxido de Hidrogênio
DAN	Desinfecção de Alto Nível e Desinfetante de Alto Nível
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ADN - Ácido desoxirribonucleico)

EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EGF	Endoscópios Gastrointestinais Flexíveis
ETO	Óxido de Etileno
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EPS	Exopolissacarídeos
ERCP	Endoscopia Retrograda por Colangiopancreatografia
ESGE	Sociedade Europeia de Endoscopia Gastrointestinal
ESGENA	Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Enfermeiros Associados à Endoscopia
FEN	Faculdade de Enfermagem
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administração de medicamentos e alimento)
GESA	<i>Gastroenterological Society of Australia</i> (Sociedade Australiana de Gastroenterologia)
GLUT	Glutaraldeído
HA-MBEC ou	<i>Eradication Biofilm Minimum concentration</i> (com Hidroxiapatita)
HMPEC	(Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme)
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HEPA	<i>High Efficiency particulate arrestance</i> (Prisão de partículas de alto eficiência)
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
HM	Higienização das mãos
IEC	<i>International equipment company</i> (Companhia de Equipamentos Internacionais)
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
Mm	Milímetro
MBEC™	<i>Eradication Biofilm Minimum concentration</i> (Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Miligramas
mL	Mililitro
MPM	Movimentos por Minuto

MMR	Micro-organismos Multirresistentes
NEPIH	Núcleo de Estudos e Pesquisa de Enfermagem em Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
OPA	Ortoftaldeído
OME	Organização Mundial de Endoscopia
OMG	Organização Mundial de Gastroenterologia
OMS	Organização Mundial de Saúde
PPS	Produtos para Saúde
PTFE	Politetrafluoretileno
PHAC	<i>Public Heath Agency of Canada</i> (Agência de Saúde Pública do Canadá)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Tampão Fosfato Salino Esterilizado)
PH	Peróxido de Hidrogênio
PPH	Plasma de Peróxido de Hidrogênio
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ARN – Ácido Ribonucleíco)
SOBEEG	Sociedade Brasileira de Enfermagem em Endoscopia Gastrointestinal
SOBECC	Associação Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico, Recuperação Anestésica e Centro de Materiais Esterilizados
TAS	Trabalhadores da Área da Saúde
TBF	Biofilme Tradicional
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
TGI	Trato Gastrointestinal
TR	Trato Respiratório
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i> (Agar de soja trípico)
UFC/cm²	Unidades Formadoras de Colônias/ centímetros cúbicos
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias/ mililitro
UFG	Universidade Federal de Goiás
μL	Microlitro
UR	Umidade Relativa
URL	Unidades Relativas de Luz
VBNC	<i>Viable but non-culturable cells</i> (Células viáveis mas não Cultiváveis)

RESUMO

COSTA LUCIANO, C. Ação de detergentes e desinfetantes em biofilme tradicional e *buildup* no modelo MBEC. 2016. 166p. Tese (Doutorado). Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

INTRODUÇÃO: Endoscópios Gastrointestinais Flexíveis (EGF) são utilizados para procedimentos de diagnóstico e terapêutica, classificados como Produtos Para Saúde (PPS) semicríticos, que necessitam ser submetidos ao processamento de Desinfecção de Alto Nível (DAN) entre usuários. Os *designs* dos EGF são complexos, dificultando o processamento e favorecem a ocorrência de falhas que contribuem para o acúmulo de matéria orgânica na superfície dos canais internos dos endoscópios e para a formação do biofilme. **OBJETIVO:** Desenvolver um modelo de acumulação de Biofilme *Buildup* (BBF), baseado em exposição repetida de solo teste, contendo *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio de ciclos repetidos de fixação e avaliar a capacidade de detergentes e desinfetantes para destruir e remover Bactérias nos Biofilmes Tradicional (TBF) e *buildup*. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O TBF foi desenvolvido em MBEC™ *peg*, sem hidroxiapatita, e o BBF, com hidroxiapatita, ao longo de oito dias. Para o desenvolvimento de ambos os biofilmes, utilizaram-se *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, contendo $8 \log_{10}$ unidades formadoras de colônias por centímetros cúbicos (UFC/cm²). Testaram-se os detergentes, *Prolystica* enzimática (D1), *Prolystica* Neutro (D2), *Neodisher* (D3) e *Endozime* (D4) isoladamente e em combinação com o Glutaraldeído (GLUT), Ortoftaldeído (OPA) e Acelerador Peróxido de Hidrogênio (APH) para determinar se ambos os biofilmes poderiam ser removidos. Avaliou-se a remoção dos biofilmes tradicional e *buildup*, utilizando contagem de bactérias viáveis, quantificação de proteína e carboidratos e por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). **RESULTADOS:** Após oito dias de desenvolvimento BBF, foram atingidos $6,14 \log_{10}$ UFC/cm² de *E. faecalis* e $7,71 \log_{10}$ UFC/cm² de *P. aeruginosa*. Nenhum dos detergentes e desinfetantes conseguiu remover os biofilmes tradicional e *buildup* ou reduzir o nível de bactérias. A combinação de detergentes e desinfetantes testada em BBF proporcionou uma redução de 3 a 5 \log_{10} em bactérias viáveis, mas nenhuma combinação pôde proporcionar a redução esperada de \log_{10} . Apenas *Prolystica* enzimática e *Endozime* removeram ambos *E. faecalis* ($3,90 \log_{10}$ unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) e *P. aeruginosa* ($3,96 \log_{10}$ UFC/mL) em bactérias em suspensão. Nenhum dos detergentes testados removeu $> 1 \log_{10}$ UFC/cm² das bactérias dentro do biofilme tradicional. Nenhuma combinação de detergente e desinfetante de alto nível reduziu o nível de ambos *E. faecalis* e *P. aeruginosa* do interior de biofilme tradicional (3 a 5 \log_{10} UFC/cm²). Embora a combinação de *Endozime* e Glutaraldeído reduziu $6 \log_{10}$, não eliminou ambas as bactérias no biofilme tradicional. **CONCLUSÃO:** Os dados indicam que, se TBF e BBF acumularem nos canais de EGF durante ciclos repetidos de processamento, nem os detergentes nem os desinfetantes de alto nível irão fornecer o nível esperado de sua remoção ou destruição bacteriana. Pesquisas futuras, utilizando o modelo *buildup*, podem ajudar a desenvolver novos métodos de limpeza e desinfecção que consigam evitar ou eliminar a BBF dentro dos canais do endoscópio.

PALAVRAS-CHAVE: Endoscópios gastrointestinais, Biofilmes e Desinfecção.

ABSTRACT

ABSTRACT

COSTA LUCIANO, C. Action of detergents and disinfectants in traditional biofilm and buildup in the MBEC model. 2016. 166p. Thesis (Doctorate). Faculty of Nursing, Federal University of Goiás, Goiânia, 2016.

INTRODUCTION: Flexible Gastrointestinal Endoscopes (FGE) are used for diagnostic and therapeutic procedures, classified as semicritical health products (HP), requiring High-Level Disinfection (HLD) processing among users. The FGE designs are complex, making it difficult to process and favor the occurrence of faults that contribute to the accumulation of organic matter on the surface of the internal channels of the endoscopes, contributing to the formation of the biofilm.

OBJECTIVE: To develop a Biofilm Buildup (BBF) accumulation model, based on repeated exposure of test soil containing *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* by means of repeated cycles of fixation and to evaluate the ability of detergents and disinfectants to destroy and remove bacteria in the Traditional Biofilm (TBF) and Buildup.

MATERIALS AND METHODS: TBF was developed in MBEC™ peg, without hydroxyapatite, and BBF, with hydroxyapatite, over a period of eight days. For the development of both biofilms, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, containing $8 \log_{10}$ colony forming units per cubic centimeters (CFU/cm²) were used. Prolystica Enzymatic (D1), Prolystica Neutral (D2), Neodisher (D3) and Endozime (D4) were tested alone and in combination with Glutaraldehyde (GLUT), Orthophthaldehyde (OPA) and Hydrogen Peroxide Accelerator (APH) to determine if both biofilms could be removed. The removal of the traditional biofilm and buildup, using viable bacteria count, quantification of protein and carbohydrates and by means of scanning electron microscopy (SEM) was evaluated.

RESULTS: After eight days of BBF development, $6.14 \log_{10}$ CFU/cm² of *E. faecalis* and $7.71 \log_{10}$ CFU/cm² of *P. aeruginosa* were reached. None of the detergents and disinfectants have been able to remove the traditional biofilms and buildup or reduce the level of bacteria. The combination of detergents and disinfectants tested in BBF provided a reduction of 3 to 5 \log_{10} in viable bacteria, but no combination could provide the expected reduction of 1 \log_{10} . Only enzyme Prolystica and Endozime removed both *E. faecalis* (3.90 \log_{10} colony forming units per milliliter (CFU/mL)) and *P. aeruginosa* (3.96 \log_{10} CFU/mL) in suspension bacteria. None of the detergents tested removed $> 1 \log_{10}$ CFU/cm² from the bacteria within the traditional biofilm. No combination of high-level disinfectant and detergent reduced the level of both *E. faecalis* and *P. aeruginosa* from the traditional biofilm interior (3 to 5 \log_{10} CFU/cm²). Although the combination of Endozime and Glutaraldehyde reduced 6 \log_{10} , it did not eliminate both bacteria in the traditional biofilm.

CONCLUSION: Data indicate that if TBF and BBF accumulate in the EGF channels during repeated processing cycles, neither detergents nor high level disinfectants will provide the expected level of bacterial removal or destruction. Future research using the buildup model can help develop new cleaning and disinfection methods that can prevent or eliminate the BBF within the endoscope channels.

KEYWORDS: Gastrointestinal Endoscopes, Biofilms and Disinfection.

RESUMEN

COSTA LUCIANO, C. Detergentes y desinfectantes de acción en la acumulación de biofilm tradicional y en el modelo de MBEC. 2016. 166p. Tesis (Doctorado). Escuela de Enfermería de la Universidad Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

INTRODUCCIÓN: Gastrointestinal Endoscopios Flexibles (GEF) se utilizan para procedimientos diagnósticos y terapéuticos, distintos a los Productos Sanitarios (PS) semi-crítica y que han de ser sometido al proceso de Desinfección de Alto Nivel (DAN) entre los usuarios. Los diseños de la GEF son complejos, el procesamiento difícil y favorecen la aparición de fallos que contribuyen a la acumulación de materia orgánica en la superficie de los canales internos de los endoscopios, contribuyendo a la formación de biopelículas. **OBJETIVO:** Para desarrollar un modelo de acumulación de la Acumulación de Biofilm (BBF), sobre la base de suciedad de ensayo que contiene la exposición repetida *Enterococcus faecalis* y *P. aeruginosa* por ciclos repetidos de montaje y la evaluación de la capacidad de los detergentes y desinfectantes para la destrucción y eliminación de bacterias en la Biopelícula Tradicional (TBF) y la acumulación. **MATERIAL Y MÉTODOS:** El TBF se desarrolló en MBEC™ PEG sin hidroxiapatita, hidroxiapatita y con BBF más de ocho días. Para el desarrollo de ambos biofilms, utilizado para *E. faecalis* y *P. aeruginosa* que contiene 8 unidades formadoras de colonias \log_{10} por centímetro cúbico (UFC/cm²). detergentes, enzimáticos Prolystica se ensayaron (D1), Prolystica Neutral (D2) Neodisher (D3) y Endozime (D4) solo y en combinación con Glutaraldehído (GLUT) Ortoftaldeído (OPA) y Peróxido de Hidrógeno del Acelerador (HDA) para determinar si podrían eliminarse ambos biofilms. Se evaluó la eliminación de biopelículas tradicionales y buildup utilizando recuento de bacterias viables, la cuantificación de proteínas y carbohidratos y por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). **RESULTADOS:** Después de ocho días de desarrollo BBF se vieron afectados 6,14 \log_{10} UFC/cm² *E. faecalis* y 7,71 \log_{10} UFC/cm² de *P. aeruginosa*. Ninguno de los detergentes y desinfectantes podría eliminar la acumulación de biopelículas tradicional y o reducir el nivel de bacterias. La combinación de detergentes y desinfectantes ensayados proporcionan una BBF reducción de 3 a 5 \log_{10} bacterias viables, pero cualquier combinación puede proporcionar la reducción esperada en \log_{10} . Única enzima Prolystica y Endozime eliminan tanto en *E. faecalis* (3,90 unidades formadoras de colonias por mililitro \log_{10} (CFU/mL)) y *P. aeruginosa* (3,96 \log_{10} UFC/mL) de las bacterias en suspensión. Ninguno de los detergentes ensayados retira > 1 \log_{10} UFC/cm² de bacterias en el biofilm tradicional. Ninguna combinación de detergente y desinfectante de alto nivel redujo el nivel de ambos *E. faecalis* y *P. aeruginosa* dentro de la biopelícula tradicional (3 a 5 \log_{10} UFC/cm²). Aunque la combinación de glutaraldehído y Endozime 6 \log_{10} reduce, no eliminado en ambas bacterias de biopelícula tradicional. **CONCLUSIÓN:** Los datos indican que si TBF y BBF se acumulan en los canales de EGF durante repetidos ciclos de procesamiento, o detergentes o desinfectantes de alto nivel proporcionará el nivel esperado de la eliminación o destrucción bacteriana. Las investigaciones futuras utilizando el modelo de acumulación puede ayudar a nuevos métodos de limpieza y desinfección que pueden evitar o eliminar BBF dentro de los canales del endoscopio.

PALABRAS CLAVE: Los endoscopios gastrointestinales, las biopelículas y desinfección.

APRESENTAÇÃO

Em toda a minha jornada de 10 anos como Enfermeira, sempre mantive o interesse pela área de prevenção e controle de infecção, de forma direta e indiretamente. Durante a minha graduação, tive a oportunidade de realizar meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) e estágio supervisionado na área de Centro Cirúrgico (CC), quando minhas preocupações e indagações se voltaram para o estado emocional do paciente cirúrgico no pré-operatório. Entretanto, no decorrer desta trajetória, despertaram o interesse e as inquietações em aprofundar no estudo do risco para infecção na assistência à saúde e seu controle.

Ao concluir o mestrado na área de genética, iniciei os investimentos no aprendizado e aprimoramento sobre as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) de forma a contribuir para a minha excelência profissional como Enfermeira. Assim, essa busca foi ratificada, em oportunidade, com a minha integração ao Núcleo de Estudos e Pesquisa de Enfermagem em Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (NEPIH), da Faculdade de Enfermagem (FEN) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

Durante o cumprimento da matriz curricular do doutorado, realizei o estágio docência da disciplina de Centro de Material Esterilização (CME), sob coordenação e orientação da Professora Dr^a Anaclara. A participação nessa disciplina, acompanhando os alunos da graduação, pôde amadurecer e fortalecer, definitivamente, o desejo em aprimorar meus conhecimentos científicos na área de controle de infecção hospitalar, sobretudo, porque o profissional Enfermeiro tem uma ligação contínua e extremamente importante na promoção de uma assistência segura, sendo esta área fundamental deste pressuposto.

Na assistência aos serviços de saúde, há uma imensa demanda de pacientes que necessita de Produtos Para Saúde (PPS), que são rotineiramente submetidos ao processamento, estando as etapas e controle de qualidade sob a responsabilidade do Enfermeiro. Durante a minha prática profissional como Enfermeira, presenciei recorrentemente a falta de cuidado com o processamento de PPS, por vezes, relegado à importância secundária. Sempre causou-me angústia e ansiedade em pensar que pacientes buscam a rede de assistência, para a realização de um exame de controle ou diagnóstico, como uma endoscopia por exemplo, e pode sair contaminado por micro-organismos e desenvolver uma IRAS.

Estas e outras situações de assistência inseguras direcionaram-me ao aprofundamento sobre processamento de PPS.

Gradativamente houve o refinamento do turbilhamento de ideias e inquietações presentes na minha trajetória profissional a fim de que pudéssemos responder aos desafios da prática clínica, resultados que ora apresentamos aqui sobre a perspectiva do processamento de endoscópios. Apresentaremos e discutiremos a formação e desenvolvimento de Biofilmes *Buildup* (BBF) e Tradicional (TBF), simulando a possível formação de biofilme em canais de endoscópios, e sua destruição e remoção com o uso de diferentes detergentes na etapa de limpeza e Desinfetantes de Alto Nível (DAN), utilizados no processo de desinfecção destes aparelhos.

A pesquisa está estruturada em oito partes (introdução, objetivos, referencial teórico, metodologia, resultados e discussão, conclusão e considerações finais). Os resultados e discussão foram apresentados em formato de artigos científicos, sendo o primeiro intitulado “**Avaliação da habilidade de diferentes detergentes e desinfetantes na destruição e remoção de micro-organismos no biofilme tradicional**” e o segundo “**Novo modelo do biofilme *buildup* simulando a acumulação de material nos canais de endoscópios flexíveis**”.

Procedimentos de endoscopia são realizados diariamente por meio de endoscópios gastrointestinais flexíveis (EGF) amplamente utilizados na área médica para realização de procedimentos minimamente invasivos, tanto para diagnóstico quanto terapêutica (RUTALA; WEBER, 2004; ALFA *et al.*, 2012a; KOVALEVA; BUSS, 2012; FUSHIMI *et al.*, 2013). Por exemplo, EGF em condições mundiais é o padrão ouro para o diagnóstico de câncer gástrico, úlceras gástricas e úlceras duodenais (RUTALA; WEBER, 2004; SGNA, 2013).

Os endoscópios são aprovados para reutilização após o uso, apesar de apresentarem um *design* complexo, com presença de estreitos e longos lúmens compostos internamente por politetrafluoretileno (PTFE) (SOBEEG, 2005; BALSAMO *et al.*, 2012; KNUDSON, 2014; AAMI, 2015). Conforme o *Food and Drug Administration* (FDA), os fabricantes de dispositivos reutilizáveis devem considerar projetos que facilitem a limpeza, bem como o processamento do equipamento, ou desinfecção e/ou esterilização necessárias para o reuso (FDA, 2015a).

A Sociedade Brasileira de Enfermagem em Endoscopia Gastrointestinal (SOBEEG) classifica os EGF como reutilizáveis. Estes equipamentos entram em contato com membrana e mucosas durante procedimentos de endoscopia, resultando em níveis elevados de contaminação microbiana na superfície e no interior dos canais do dispositivo (SOBEEG, 2005), e o seu *design* favorece o acúmulo de *bioburden*¹ por micro-organismos após o uso, dificultando o processamento, na etapa da limpeza e desinfecção (AUMERAN *et al.*, 2012).

Essa presença de *bioburden*¹ tem a capacidade de originar o desenvolvimento de biofilmes, que são multicamadas de células bacterianas ou fungos, denominadas comunidade sésil, embebidas em matriz autoexcretada composta por polissacarídeos, glicoproteínas, proteínas, carboidratos, material genético e destritos de células mortas que aderem facilmente à superfície dos endoscópios. A remoção desses biofilmes do interior dos canais dos instrumentos é um desafio, além de estarem relacionados com surtos de infecções (DOLAN; COSTERTON, 2001; DOLAN; COSTERTON, 2002; FANG *et al.*, 2010; KOVALEVA *et al.*, 2010; BRIDIER *et al.*, 2012).

¹*Bioburden* é a carga de contaminação microbiana adquirida dentro da cavidade do corpo humano durante o uso dos endoscópios flexíveis (RUTALA; WEBER, 2004).

Incidências de infecções podem estar associadas ao nível de alterações da superfície do endoscópio e à correlação de quantas vezes o equipamento foi utilizado, podendo danificar os canais, os quais possuem um tempo de vida entre cinco a 10 anos. O tempo de uso destes dispositivos tem correlação com o risco de contaminação, sendo que, quanto mais velho o endoscópio, maior a possibilidade de danificação dos seus canais internos e maior a facilidade de contaminação e desenvolvimento de biofilmes (LEE *et al.*, 2015).

O sistema de classificação dos Produtos Para Saúde (PPS), desenvolvido pelo Doutor Earle H. Spaulding em 1968 (SPAULDING, 1968) tem resistido ao tempo e continua sendo usado nos dias atuais para a definição dos métodos de processamento (ASGE, 2011; AORN, 2017). Esta proposta separa em três categorias os PPS considerando potencial de transmissão de micro-organismos causadores de infecção durante o uso destes materiais, classificados em: críticos, semicríticos e não críticos (SPAULDING, 1968; SOBECC, 2013; AORN, 2017).

Conforme classificação mencionada acima, os endoscópios são equipamentos semicríticos, pois entram em contato com mucosa não intacta (RUTALA; WEBER, 2004; ASGE, 2011; SOBEEG, 2005; SGNA, 2013; AORN, 2017). Esse contato direto com o Trato Gastrointestinal (TGI) contamina o endoscópio, por isso necessita de limpeza, desinfecção ou esterilização (RUTALA; WEBER, 2004; SOBEEG, 2005; ASGE, 2011; SGNA, 2013), conforme instruções do fabricante (KNUDSON, 2014).

São recomendados pelo FDA, nos Estados Unidos, uma limpeza e desinfecção de alto nível (DAN) (FDA, 2015a; AORN, 2017), corroborando as recomendações brasileiras, em que o método predominante de processamento dos EGF é a DAN em glutaraldeído (GLUT) a 2% (SOBEEG, 2005).

Porém, existe possibilidade de envolvimento com perda da mucosa gástrica nos procedimentos com endoscópios, por exemplo, no momento da biópsia, enquadrando estes equipamentos à condição de críticos (AORN, 2017). Assim, o processo indicado seria a esterilização, mas esses aparelhos não resistem à esterilização pelos métodos convencionais, devido à constituição de materiais sensíveis à alta temperatura (SOBEEG, 2005). Dessa forma, a característica de termossensibilidade dos endoscópios inviabiliza a esterilização por meio de autoclave, que poderá ser esterilizado por métodos à baixa temperatura, como Óxido de Etileno (ETO), Plasma de Peróxido de Hidrogênio (PPH), Ácido Peracético

(AP) ou esterilizante constituído pelos dois últimos produtos (SOBEEG, 2005; CDC, 2008).

O processamento adequado dos EGF e seus componentes é uma parte essencial da segurança e qualidade da Endoscopia Digestiva Alta (EDA). Desde 1994, o Comitê de Diretrizes da Sociedade Europeia de Endoscopia Gastrointestinal (ESGE) e a Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Enfermeiros Associados à Endoscopia (ESGENA) desenvolvem uma série de orientações e diretrizes voltadas para o processamento e controle de infecção associados aos procedimentos endoscópios (BEILENHOFF *et al.*, 2008).

O processamento de EGF é, predominantemente, manual e propenso ao erro, embora existam processadores automatizados que validam limpeza em vários níveis. Para garantir a segurança do próximo paciente nos serviços de endoscopia, é necessário que ocorram todas as etapas do processamento, que consistem em pré-lavagem do endoscópio na cabeceira, limpeza manual, seguida de DAN ou esterilização, posteriormente, enxágue e secagem completa antes de armazenar (SOBEEG, 2005; CDC, 2008; ALFA; HOWIE, 2009a, b; CDC, 2011; ALFA *et al.*, 2012b; ALFA; FÁTIMA; OLSON, 2013; SGNA, 2013).

Partindo-se do princípio de que todos os pacientes deverão ser considerados, potencialmente, de risco para a transmissão de micro-organismos infecciosos, exige-se rigor em todas as etapas, independente das condições clínicas apresentadas (BRASIL, 2006; BSG, 2008).

Embora a incidência de infecção associada à utilização de EGF é considerada baixa, sendo um em 1,8 milhões de procedimentos (ASGE, 2008), um recente surto com *Klebsiella pneumoniae* foi associada a lacunas de processamento dos endoscópios, mais precisamente dos duodenoscópios (GASTMEIER, VONBERG, 2014).

Lacunas no processamento de endoscópios também foram demonstradas em relatórios recentes de taxas de infecções, por surtos com micro-organismos multirresistentes (MMR), decorrentes de duodenoscópios contaminados em endoscopias retrogradadas por colangiopancreatografia (ERCP) (KOVALEVA *et al.*, 2009; EPSTEIN *et al.*, 2014; WENDORF *et al.*, 2015). Muitos destes estudos sugerem que a sobrevivência de MMR, após o processamento de endoscópios, pode ser devido à formação de biofilme (KOVALEVA *et al.*, 2010; EPSTEIN *et al.*, 2014; WENDORF *et al.*, 2015).

Diante do exposto, levantam-se os seguintes questionamentos: A contaminação dos canais internos de endoscópios leva ao desenvolvimento do biofilme *buildup* quando submetidos a ciclos repetidos de desinfecção de alto nível? Os detergentes e os desinfetantes de alto nível são capazes de destruir ou remover biofilmes presentes nos canais internos de endoscópios?

Respostas a esses questionamentos poderão auxiliar na definição de indicadores de qualidade no processamento de EGF e contribuir diretamente com a prática do enfermeiro, profissional que atua como responsável técnico do CME e unidades de endoscopias.

Sabe-se que o processamento dos EGF é em grande parte manual e que falhas podem ocorrer devido a erros humanos, e a presença de contaminação nos canais de endoscópios é um grande determinante para o desenvolvimento de biofilmes e infecções. Por outro lado, erros subsequentes no processamento vêm contribuindo para a formação do biofilme.

Assim, o estudo pode auxiliar na construção de protocolos, voltados para a melhoria das etapas do processamento desses equipamentos que requerem capacidade operativa para implementação das ações, além da *expertise* necessária dos Trabalhadores da Área da Saúde (TAS) envolvidos de forma direta com o processamento (COSTA *et al.*, 2011), visando à segurança do paciente submetido ao procedimento. Nesse sentido, necessita-se de busca constante de alternativas eficientes e eficazes para a destruição e remoção de biofilmes bacterianos nos canais de endoscópios, visando ao reuso seguro e conseqüente diminuição de surtos de infecções.

O biofilme encontra-se presente em grande número de casos de infecções, é um desafio para as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) no que diz respeito a seu controle e prevenção. Um outro caminho para diminuição dos surtos associados aos usos de endoscópios seria o emprego de saneantes que possuem a capacidade de eliminar os biofilmes que foram desenvolvidos. No mercado de saneantes, têm-se vários produtos que afirmam destruir ou remover os biofilmes, entretanto poucos estudos avaliam essa capacidade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação de detergentes e desinfetantes de alto nível na destruição e remoção de micro-organismos presentes nos biofilmes tradicional e *buildup*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um novo modelo de biofilme *buildup*.
- Mensurar o *bioburden* com contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), no desenvolvimento dos biofilmes tradicional e *buildup*.
- Determinar a contagem de proteínas e carboidratos presentes nos biofilmes tradicional e *buildup*.
- Verificar a eficácia de detergentes e desinfetantes em destruir e remover os biofilmes tradicional e *buildup* em MBEC™ model.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS NA PRÁTICA CLÍNICA

Os endoscópios são destinados para a visualização interna de órgãos, e esse conceito foi criado por Philippe Bozzini (1773 – 1809), um jovem médico alemão, que afirmava que uma pequena ferida ou orifício natural possibilitava uma visão interior da fisiologia humana. O primeiro endoscópio utilizado foi um instrumento que usava luz de vela e espelho côncavo para inspeção das estruturas humanas. Em 1845, Desormeaux, urologista francês, introduziu o termo endoscopia e em 1879, Max Nitze, em Viena, descreveu o primeiro sistema endoscópio que continha uma série de lentes (ROMERO; SILVA; AGUIAR, 2010).

Com o desenvolvimento tecnológico na área da saúde, ocorrido nas últimas décadas, houve um impulso e aumento da produção de diversos produtos na assistência hospitalar, dentre eles, os equipamentos endoscópios que, atualmente, possuem uma abordagem minimamente invasiva (COSTA, 2015). Os aparelhos de endoscopia foram introduzidos na prática clínica nos anos 60, como sendo equipamentos de conformação rígida e, desde então, são utilizados em todo o mundo para visualizar, detectar, diagnosticar e tratar diversas alterações médicas (ALFA *et al.*, 2002; COSTA, 2015).

Frente à evolução de dispositivos médicos, os endoscópios inicialmente rígidos evoluíram para equipamentos flexíveis, os quais passaram a permitir diversas angulações, facilitando a visualização no momento do exame e minimizando eventos adversos nas estruturas internas dos pacientes (COSTA, 2015).

Estimam-se, nos Estados Unidos, mais de 23 milhões de ambulatorios de endoscopia e mais de 10 milhões de procedimentos realizados anualmente usando EGF (ALFA; OLSON; DEGAGNE, 2006; ZHANG *et al.*, 2011; HOLODNIY *et al.*, 2012). Em Osaka, no Japão, são realizados, aproximadamente, sete milhões de endoscopia e procedimentos de diagnósticos e tratamentos por ano (FUSHIMI *et al.*, 2013).

Os endoscópios são equipamentos diariamente manuseados em clínicas e possuem inventário restrito, pois são utilizados em serviços especializados com alta demanda de exames e considerados de alto custo (valor aproximado de R\$ 60.000), constituídos por material flexível com luz e câmera de vídeo, destinados a

procedimentos minimamente invasivos (Figura 01) (FORTE; SHUM, 2011; BALSAMO *et al.*, 2012; KNUDSON, 2014).

Os Endoscópios Gastrointestinais Flexíveis (EGF) possuem um desenho com características estruturais, conforme figura 01, constituídos de fibra ótica, compostos por botões de controle, denominados cabeça, (vídeo remoto), tubo de inserção, que abriga lúmens longos e canais estreitos, como os de ar/água e de sucção/biópsia, além de diversos orifícios, fendas e válvulas, constituindo um *design* complexo. A imagem proveniente da fonte de luz dos EGF é projetada no monitor do aparelho de endoscopia, permitindo, assim, melhor compreensão das estruturas analisadas, facilita a retirada de fragmentos para biópsia e possibilita a impressão de imagens (ALFA; HOWIE, 2009a,b; RIBEIRO, 2011).

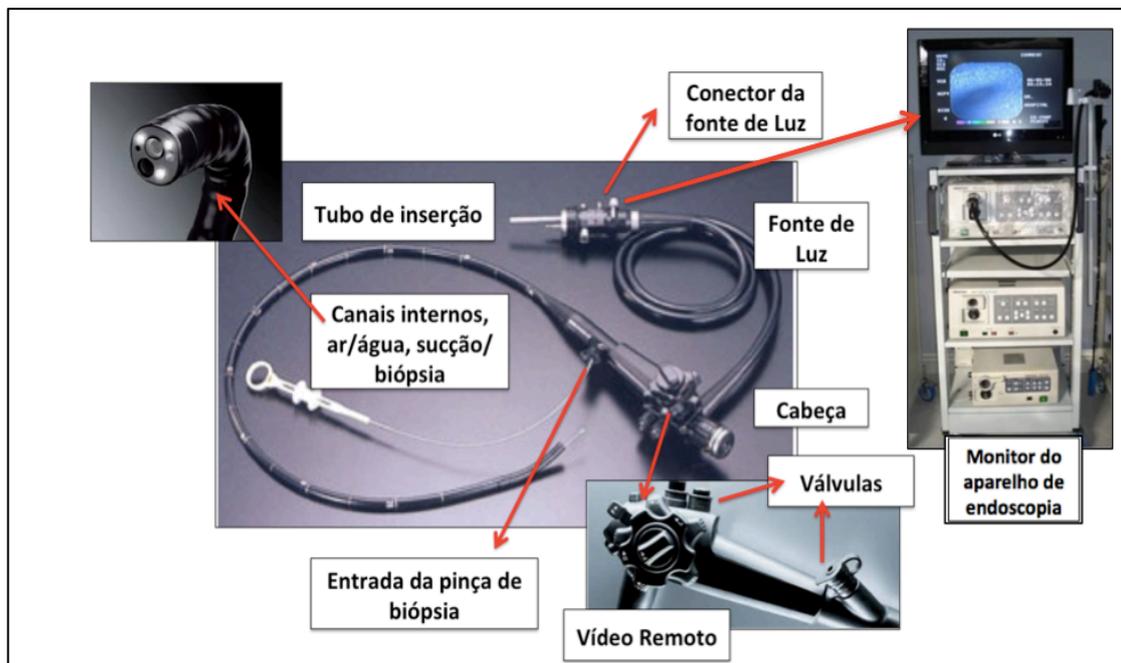


Figura 01: *Design* do aparelho de endoscopia gastrointestinal flexível
Fonte: (Ilustração adaptada e modificada) <https://www.googleimagens.com.br>
 (acesso em 01/03/2017)

No interior da porção denominada “tudo de inserção”, encontram-se os canais do EGF e um lúmen, para a condução de imagem e luz por meio de fibra ótica. Pelo canal de sucção/biópsia, as pinças são inseridas para remoção de fragmentos, e as secreções dos pacientes são aspiradas. Pelo canal de ar/água, o ar é inserido, visando à distensão do órgão a ser analisado e à água para limpar a lente do equipamento (ALFA; HOWIE, 2009a,b; RIBEIRO; 2011). O diâmetro dos canais depende da marca do endoscópio, entretanto a média do diâmetro é de 9,2

milímetros (mm), tanto na extremidade distal quanto no tubo de inserção, sendo que, nos canais de sucção/biópsia, a variação é de dois a quatro milímetros de diâmetro, e do de ar/água, de apenas um milímetro.

Conforme o *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC), a característica de flexibilidade dos endoscópios, como por exemplo, os gastrointestinais, permite a introdução do equipamento no Trato Gastrointestinal (TGI) (boca, esôfago, duodeno, intestino delgado e grosso, reto e ânus) com menos resistência em relação àqueles de conformação rígida e conseqüente redução de complicações traumáticas para o paciente. Alguns tipos de equipamentos flexíveis permitem, ainda, o exame completo do órgão analisado, já que a extremidade distal do tubo de inserção pode se movimentar, facilitando a movimentação em diferentes ângulos (CDC, 2008; 2011).

A angulação permitida das extremidades distais dos EGF é diferente de acordo com marca e modelo dos mesmos, porém todos permitem movimento angular para melhor visualização do órgão analisado (CDC, 2008; 2011). Segundo Hervé e Keevil (2013), essa extremidade distal possui cavidades as quais possibilitam a flexibilidade do mesmo e têm dobradiças que permitem a deposição de contaminantes como fluidos corporais dos pacientes, dificultando o processamento do equipamento, inclusive a etapa da limpeza, sendo indicadores de surto de infecções.

A unidade de endoscopia destinada aos serviços de saúde é um componente essencial no auxílio a diagnóstico e tratamento de doenças, tais como distúrbios gástricos, câncer gástrico, úlceras gástricas e duodenais, além de hemorragias internas (FORTE; SHUM, 2011; PARK *et al.*, 2013; FUSHIMI *et al.*, 2013). Segundo a *Public Health Agency of Canada* (PHAC), os endoscópios flexíveis fazem diagnóstico de diversas patologias, com a possibilidade de visualização e coleta de amostras, bem como propostas terapêuticas (PHAC, 2010).

Os endoscópios são abordados em muitas *guidelines*², podendo ser um dispositivo utilizado em muitas condições, envolvendo Trato Respiratório (TR), os broncoscópios, esôfago, estômago e partes do intestino; os gastroscópios, trato biliar e pâncreas; os duodenoscópios, intestino grosso; os colonoscópios, bexiga e

² *Guidelines*: conjunto de regras ou diretrizes para determinado assunto que está sendo abordado (Fonte: <http://www.dclick.com.br/2012/01/29/guidelines/>).

ureter; os cistoscópios, além dos equipamentos utilizados em cirurgias como os artroscópios, para visualização do joelho (PHAC, 2010). Entretanto, a colonoscopia é padrão ouro para o diagnóstico precoce de câncer de cólon, e a endoscopia, para o câncer gástrico (ALFA; HOWIE, 2009a,b).

Além dos exames de rotina, os endoscópios flexíveis podem ser utilizados, também, em intervenções cirúrgicas, como cirurgias laparoscópicas, tendo uma larga aplicação em múltiplas áreas da medicina (ALFA; OLSON; DEGAGNE; 2006), pois possibilitam procedimentos minimamente invasivos (FORTE; SHUM, 2011). Contudo, esses equipamentos são utilizados em maior escala para procedimentos clínicos.

O procedimento de Endoscopia Digestiva Alta (EDA) começou a ser realizado na década de 1950, no Brasil, e consiste em introduzir um aparelho tubular pela boca do paciente com a finalidade de visualizar o esôfago, estômago, duodeno e, se necessário, remover fragmentos para realizar biópsias da mucosa para caracterizar a natureza anatomopatológica de possíveis alterações (Figura 02) (SAKAE *et al.*, 2012).

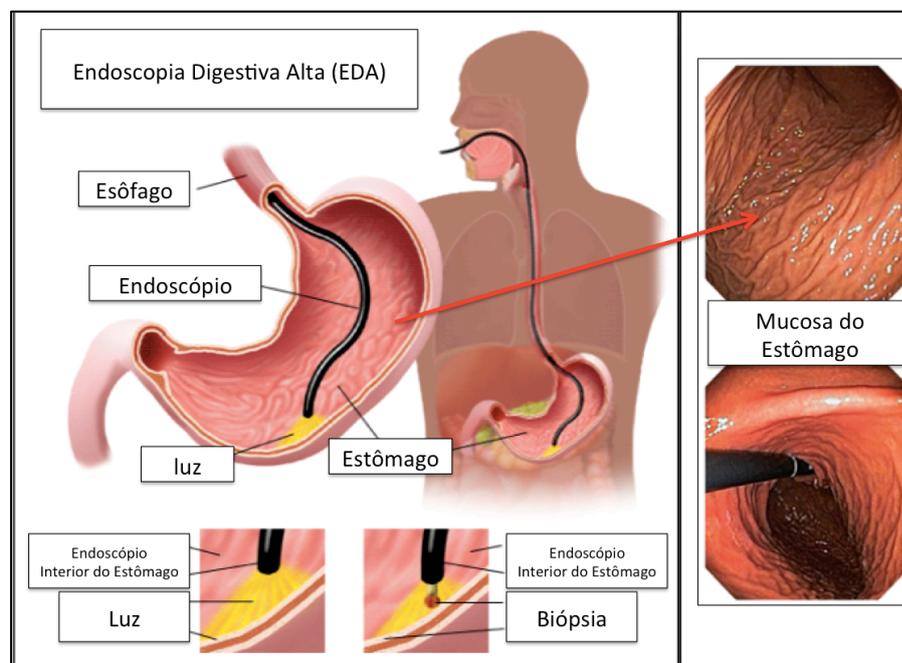


Figura 02: Procedimento de endoscopia - Endoscopia digestiva alta
Fonte: adaptada e modificada <https://www.google.com.br/search/> e <http://www.olympuslatinoamerica.com/> (acesso em 01/03/2017)

Os EGF podem se tornar contaminados com sangue, secreções e micro-organismos durante a utilização. Estes instrumentos são difíceis de limpar e desinfetar, além de possuir um *design*, com lúmens estreitos e múltiplos canais internos (KOVALERA *et al.*, 2013). As consequências do uso de endoscópios contaminados é um tema recorrente na literatura, podendo resultar em IRAS.

3.1.1 TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS POR MEIO DE ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS

Os procedimentos minimamente invasivos ou não invasivos, decorrentes de procedimentos endoscópios, possuem risco de transmissão de patógenos por meio do contato com um dispositivo e mucosas ou tecidos não colonizados do paciente (VERFAILLIE, 2015). É difícil mensurar a relação causal entre endoscopia e transmissão de patógenos por várias razões, tais como, longo período de latência dos micro-organismos, sintomas subclínicos e a associação não reconhecida de infecção por endoscopias anteriores (BARBOSA *et al.*, 2010; HONG; LIM, 2013).

Para Lee *et al.* (2015) a maioria das infecções ocorrida, durante procedimentos de endoscopia, é causada por bactérias, seguida por vírus, fungos, protozoários e príons. Essas infecções são divididas em infecções endógenas e exógenas (LEE *et al.*, 2015). Os fatores endógenos são: idade, uso de imunossupressores, antimicrobianos, estado nutricional, presença de doença crônica, tempo prolongado de internação e os exógenos são: infecções cruzadas, procedimentos invasivos, uso de equipamentos contaminados, baixa adesão à Higienização das Mãos (HM), limpeza e desinfecção inadequadas do ambiente e do equipamento (CARVALHO *et al.*, 2012).

Conforme Lee e Park (2013), as infecções endógenas ocorrem quando os micro-organismos colonizados em TR ou TGI alcançam a Corrente Sanguínea (CS), iniciando um processo infeccioso. Neste caso, os micro-organismos *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* são as espécies mais frequentemente isoladas em surtos de EGF e broncoscópios (KOVALERA *et al.*, 2013).

Nas infecções exógenas, os micro-organismos mais frequentemente associados à transmissão são *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* spp. Estes micro-organismos podem ser transmitidos por pacientes ou equipamento

contaminado, resultante de falhas no processamento devido à danificação dos canais internos dos endoscópios (CDC, 2008; 2011; KOVALERA *et al.*, 2013, AORN, 2017). Entretanto, as infecções exógenas relacionadas ao uso dos endoscópios são pouco relatadas na literatura (KOVALEVA *et al.*, 2009; HOLODNIY *et al.*, 2012; HONG; LIM, 2013; LEE *et al.*, 2015).

Essa transmissão pode originar devido a alguns fatores principais: falhas no processamento (limpeza e desinfecção inadequadas), exposição do endoscópio ao micro-organismo (formação de biofilme), *design* do endoscópio (estreitos e longos lúmens) e vida útil do aparelho de endoscopia (superfície dos canais internos danificada) (RUTALA, WEBER; 2008).

As falhas no processamento, devido à impossibilidade de visualização dos canais após a etapa de limpeza, são um dos grandes fatores que contribuem para as infecções relacionadas aos endoscópios (ALFA, OLSON, MURRAY; 2014), sendo que a maioria das instituições de saúde não realiza o monitoramento destes equipamentos após os procedimentos, no entanto os relatos de transmissão de patógenos resultantes de endoscopia são raros (CDC, 2008; CDC, 2011).

Quando essas transmissões ocorrem, a carga biológica encontrada em EGF varia de 5 log₁₀ unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) para 10 log₁₀ UFC/mL, sendo os maiores níveis encontrados nos canais de sucção/biópsia (RUTALA; WEBER, 2004).

Um outro ponto importante que contribui para infecções relacionadas a procedimentos de endoscopia é o tempo de uso dos endoscópios. Suas superfícies alteram com os subsequentes processamentos no decorrer dos anos. Os EGF deveriam ser utilizados em um tempo pré-determinado, evitando, assim, a danificação interna dos canais que podem sofrer alterações químicas e físicas durante o uso intenso, facilitando o armazenamento de sujeira, formação de biofilme e desenvolvimento de um quadro infeccioso (LEE *et al.*, 2015).

Contudo, a contaminação e deposição de matéria orgânica no interior do endoscópio podem resultar na formação do biofilme, que são colônias de micro-organismos em diversas etapas de crescimento, até mesmo por toda uma vida, comprometendo a qualidade de vida, atribuídas às espécies de bactérias como a *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus epidermidis*, que são onipresentes na água, ar, solo ou pele, sendo estas protegidas pela camada do biofilme (STEWART; COSTERTON; 2001).

Além da formação do biofilme, estes equipamentos podem veicular por micro-organismos presentes na microbiota do paciente, bem como patógenos que provocam doenças tais como Hepatite B (HBV), Hepatite C (HCV) e Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) (RIBEIRO; OLIVEIRA, 2012; HOLODNIY *et al.*, 2012).

Reportar a transmissão de um vírus é geralmente mais difícil do que documentar a transmissão de infecções bacterianas, por causa de períodos de incubação mais longos e quadro assintomático (HOLODNIY *et al.*, 2012). Essas formas de transmissão tanto viral, quanto bacteriana necessitam ser prevenidas. Um dos fatores que contribuem para o aparecimento de novos casos de infecções é devido à inspeção visual insuficiente para confirmar a adequação da limpeza, visto que não é possível a visualização dos estreitos canais internos (ALFA; OLSON; MURRAY, 2014).

Apesar das recomendações para limpeza e desinfecção dos EGF já estarem bem estabelecidas por diversas sociedades especializadas, a transmissão de micro-organismos existe, porém em baixa frequência, e estudos discutem que a causa pode ser devido à formação e permanência de biofilmes; desse modo, eles seriam responsáveis pela transmissão cruzada ou exógena de bactérias e vírus (CDC; 2008; 2011; BALSAMO *et al.*, 2012).

Mesmo com todas as orientações existentes sobre o processamento de endoscópios e pouca correlação de contaminação por procedimentos endoscópios, pesquisas abordam surtos em vários tipos de endoscópios, sendo eles, gastroscópios, duodenoscópios, broncoscópios, cistoscópios e artroscópios (KOVALEVA *et al.*, 2009). No Quadro 01, p. 48, estão relacionados surtos envolvendo endoscópios publicados no período de 2008 a 2016 que ocorreram em diversas partes do mundo. As causas de contaminação são, em grande maioria, decorrentes de falhas no processamento de endoscópios e a dificuldade de realizar uma limpeza com sucesso devido ao *design* complexo, porém os surtos abordam, também, os defeitos nos canais que levam à deposição de matéria orgânica ou desenvolvimento de biofilmes.

Quadro 01: Síntese dos estudos referentes a infecções e surtos por meio de aparelhos de endoscopia (GOIÂNIA, 2016)

Referência	Patógeno	Local do estudo	Causas do surto/contaminação
Endoscópio do tipo Duodenoscópio			
Kovaleva <i>et al.</i> , 2009	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Groninga/ Holanda	Falhas no processamento e defeitos nos canais e acessórios dos duodenoscópios.
Carbonne <i>et al.</i> , 2010 Aumeran <i>et al.</i> , 2012 Gastmeier, Vonverg, 2014	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)	Paris/ França	Falhas no processamento e defeitos nos canais do duodenoscópio. Contaminação ambiental e falha na higiene das mãos dos profissionais.
Arabaa <i>et al.</i> , 2013	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Estados Unidos (EUA)	Falhas no processamento (etapa de limpeza).
Epstein <i>et al.</i> , 2014 Ross <i>et al.</i> , 2015	<i>Escherichia coli</i>	Illinois/ Seattle/ EUA	Falhas nos protocolos de desinfecção indicadas pelos fabricantes.
Kola <i>et al.</i> , 2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)	Berlim/ Alemanha	Falhas no processamento.
Wendorf <i>et al.</i> , 2015	<i>Escherichia coli</i>	Filadélfia/ Pensilvânia	Não identificou causa.
Verfaillie <i>et al.</i> , 2015	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nova Iorque/ EUA	Falhas no processamento induzidas pelo <i>design</i> dos duodenoscópios.
Endoscópio do tipo Gastrosópio			
Bajolet <i>et al.</i> , 2013	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	França	Falhas no processamento (limpeza e tempo de imersão insuficiente e secagem inadequada antes do armazenamento).
Endoscópio do tipo Broncosópio			
DiazGranados <i>et al.</i> , 2009	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Atlanta/ Geórgia	Defeito no broncoscópios.
Machida <i>et al.</i> , 2014	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Osaca/ Japão	Não identificou causa.
Guy <i>et al.</i> , 2016	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Stenotrophomona Maltophilia</i>	Lion/França	Falhas no processamento (contaminação da válvula de sucção).
Endoscópio do tipo Citoscópio			
Wendelboe <i>et al.</i> , 2008	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	México	Falhas no processamento.
Chang <i>et al.</i> , 2013	<i>Enterobacter cloacae</i>	Taiwan/ China	Falhas no processamento (identificada a contaminação de um ureteroscópio).
Endoscópio do tipo Artrosópio			
Tosh <i>et al.</i> , 2011	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Texas/ EUA	Falhas no processamento.

Fonte: próprio autor

3.2 PROCESSAMENTO DOS ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS

Endoscópios e acessórios são considerados Produtos Para Saúde (PPS) semicríticos, por estarem em contato com a mucosa íntegra, porém existe uma diferenciação entre endoscópios rígidos e flexíveis e na forma em que são utilizados, invasivos ou não invasivos (SOBEEG, 2005; CDC, 2008; CDC, 2011; AAMI, 2015, WHO, 2016). O quadro 02 mostra a indicação do processamento, segundo o tipo de endoscópio.

Quadro 02: Tipos de procedimentos endoscópios e nível de descontaminação (WHO, 2016)

Tipo de Endoscópio	Exemplo de endoscópio rígido	Exemplo de Endoscópio flexível	Nível de descontaminação
Invasivo – entra em contato com pele ou mucosas rompidas e parte estéril do corpo.	Artroscópios Laparoscópios Cistoscópios Histeroscópios	Nefroscópios Angioscópios Coledoscópios	Esterilização a vapor à baixa temperatura.
Não invasivo – entra em contato com mucosas, mas não entra em contato com cavidade estéril.	Broncoscópios	Gastroscópios Colonoscópios Broncoscópios Rinolaringoscópios	DAN*, em imersão ao glutaraldeído ou ácido peracético e dióxido de cloro.

*DAN – Desinfecção de Alto Nível

Entretanto, a distinção quanto à classificação de semicríticos e críticos não está completamente delimitada para endoscópios e seus acessórios. Estes equipamentos considerados semicríticos podem, frequentemente, entrar em contato com lesões de mucosa ou causar danos por acidentes, como perfuração durante o procedimento, atingindo sítios estéreis do corpo humano e, nessa situação, passam a ser considerados PPS críticos. Dependendo da hipótese diagnóstica é inevitável a realização de biópsia, momento em que o endoscópio entra em contato com mucosa não íntegra e realiza a exérese de fragmentos para exame anatomopatológico, passando, portanto, do nível semicrítico para crítico (BARBOSA, 2008; WHO, 2016).

O elevado custo dos endoscópios limita sua disponibilidade em quantidade adequada à demanda de uso e de processamento apropriado nos serviços de endoscopia (RIBEIRO *et al.*, 2013), além de serem frágeis e necessitarem de manutenção rigorosa (SOBEEG, 2005).

Mesmo sendo um dispositivo aprovado para reutilização, a complexidade estrutural dos endoscópios e a presença dos canais estreitos e longos tornam-se difíceis as etapas do processamento, as quais favorecem a aderência de matéria orgânica e micro-organismos e, em consequência, formação de biofilme (ALFA *et al.*, 2012a; BALSAMO *et al.*, 2012; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2012).

O processamento de endoscópios compreende três momentos distintos: a pré-desinfecção que envolve as etapas (pré-limpeza, limpeza, enxágue e secagem), antes de ser submetido ao contato e ação do germicida. A desinfecção compreende a imersão na solução germicida e remoção dos resíduos tóxicos do germicida utilizado (enxágue e secagem) e estocagem do endoscópio ou uso imediato (Figura 03) (NELSON; MUSCARELLA, 2006).

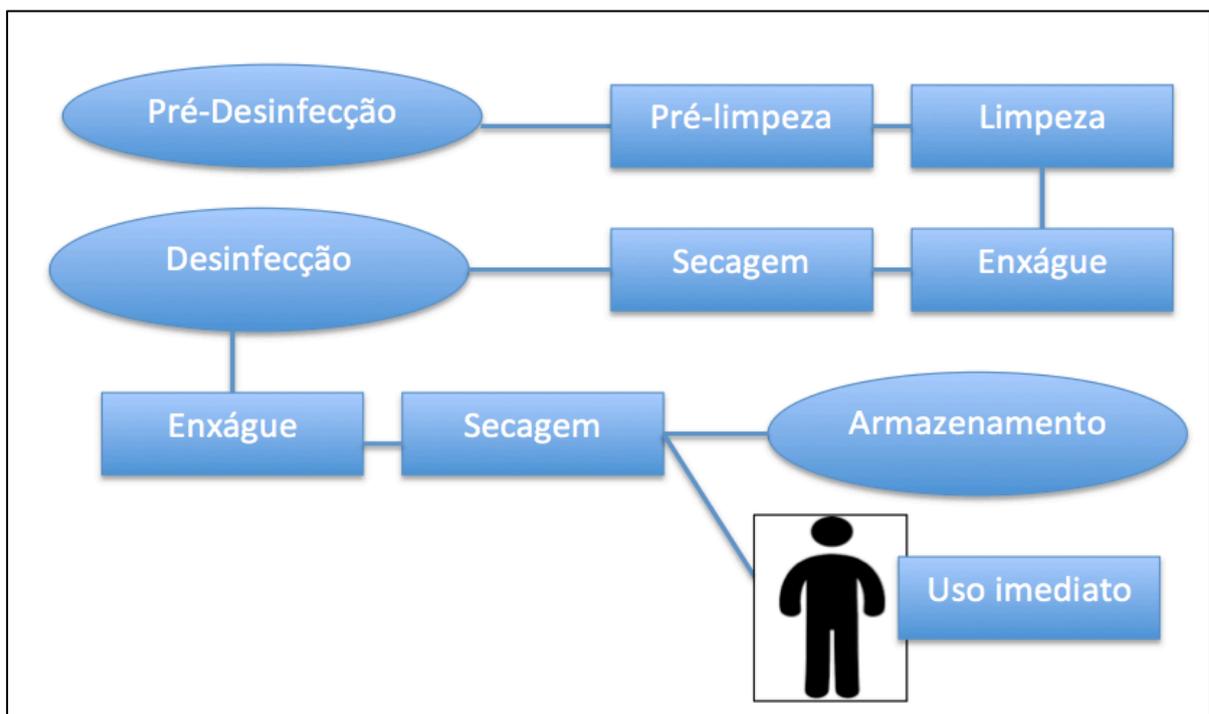


Figura 03: Fluxograma das etapas do processamento de endoscópios (pré-desinfecção, desinfecção e armazenamento)

Fonte: próprio autor

As múltiplas etapas do processamento de endoscópios podem ser propensas ao erro humano. Um estudo realizado em um hospital no Canadá mostrou que o processamento manual foi executado corretamente em apenas 1,4% de 69 endoscópios avaliados na prática clínica (ALFA; OLSON; MURRAY, 2014). Cada etapa do processamento de endoscópios possui uma finalidade e, quando realizada de forma incorreta, leva a falhas subsequentes (Quadro 03, p. 51) (WHO, 2016).

Quadro 03: Etapas do processamento de endoscópios flexíveis e suas finalidades (WHO; 2016)

Etapa	Finalidade
Pré-Limpeza	Remover matéria orgânica proveniente do paciente e reduzir a possibilidade de seu ressecamento e fixação, dificultando a etapa da limpeza manual.
Teste de Vedação	Verificar a integridade dos canais internos dos endoscópios.
Limpeza Manual	Remover matéria orgânica por meio de detergente e com auxílio de artefatos, como escovas.
Enxágue	Eliminar resíduos do detergente utilizado na etapa anterior.
Secagem	Remover a umidade para não comprometer a concentração do desinfetante.
Desinfecção	Eliminar micro-organismos patogênicos, como bactérias, microbactérias e vírus.
Enxágue	Remover resíduos do desinfetante, cuja permanência pode causar eventos adversos ao paciente.
Secagem	Remover a umidade, assegurando a completa secagem para o armazenamento.

As recomendações para o processamento de EGF estão bem estruturadas em diversas diretrizes e orientações em todo o mundo. Cada país aborda uma forma peculiar de seguir o processamento, como por exemplo, o Brasil cumpre as últimas diretrizes publicadas pela SOBEGG, em 2005, RDC nº 6, de 2013 e RDC nº 55, de 2012, o Canadá, as diretrizes do PHAC em 2010, voltadas para o controle e prevenção de infecção dos aparelhos de endoscopia gastrointestinal e os broncoscópios, os Estados Unidos, o *Guideline* da Sociedade Americana de Endoscopia Gastrointestinal (ASGE), em 2011 e a Austrália, o *Gastroenterological Society of Australia* (GESA), em 2011.

Cada uma das diretrizes mencionadas aborda as etapas do processamento de EGF, enfatiza condutas adequadas para a prevenção e controle de infecção, contudo existem algumas diferenças entre as recomendações de um país para o outro, mencionadas no quadro 04, p.52.

Quadro 04: Comparação de diretrizes para o processamento de endoscópios gastrointestinais flexíveis* (GOIÂNIA, 2016)

Etapas do Processamento	Brasil (2005 e 2013)	Canadá (2010)	Estados Unidos (2011)	Austrália (2011)
Pré-Desinfecção	Limpeza com detergente enzimático, uso de escovas para os canais e enxágue abundante.	Limpeza com detergente enzimático e escovas com tamanho/diâmetro adequados aos diferentes canais.	Limpeza com detergente (o ideal para sua realidade) e uso de escovas com tamanho apropriado.	Limpeza com detergente enzimático e escovas com tamanho/diâmetro adequados aos diferentes canais
Desinfecção de Alto Nível (DAN**)	DAN com glutaraldeído 2%, secagem com ar comprimido e rinsagem com álcool a 70%.	DAN (sem especificar a solução).	DAN com glutaraldeído 2%, secagem com ar comprimido e rinsagem com álcool a 70% ou 90%.	DAN com glutaraldeído 2% isolado ou em associação com o ortoftaldeído ou ácido peracético.
Armazenamento	Posição vertical, com válvulas desconectadas e não menciona tempo máximo de armazenamento	Não cita a posição nem o tempo máximo de armazenamento.	Posição vertical, com válvulas desconectadas e utilizá-las entre 10 a 14 dias após a DAN.	Não cita a posição e recomenda o uso até no máximo 72 horas após o processamento.

* Fonte: (SOBEEG, 2005; PHAC, 2010; GESA, 2011; ASGE, 2011; BRASIL, 2013)

**DAN – Desinfecção de Alto Nível

3.2.1 ETAPAS DO PROCESSAMENTO DOS ENDOSCÓPIOS FLEXÍVEIS

O processamento de PPS tem sido cada vez mais difícil, à medida que o *design* se torna mais complexo, e eleva o nível de exigências quanto a competência e conhecimento técnicos para os TAS que atuam no CME, visto o desafio de ter um material com resultado da ausência de biofilme e endotoxinas (SOBECC, 2013). O aparelho de endoscopia é um equipamento diferenciado e possui várias particularidades (Figura 01, p. 42). Estão descritos o passo a passo das etapas do processamento dos EGF (Figura 04, p. 53).

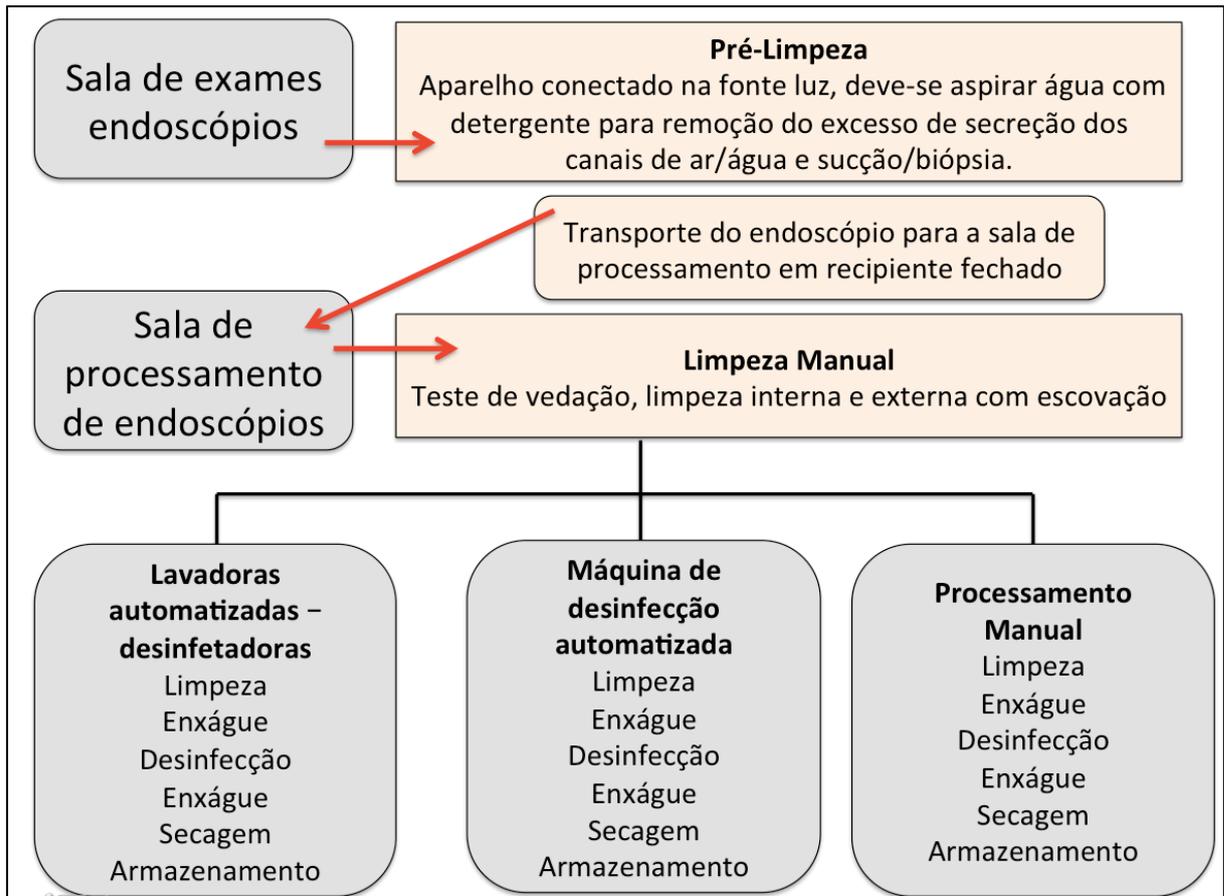


Figura 04: Etapas do processamento dos endoscópios gastrointestinais flexíveis

* Fonte: próprio autor

a) 1ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: PRÉ-LIMPEZA

A pré-limpeza deve ser realizada ainda na sala de exame da endoscopia, após o procedimento, com o aparelho conectado na fonte de luz. Deve-se aspirar água com detergente enzimático para limpar o excesso de secreção interna. Para a retirada de secreção do tubo externo, utilizar compressa (SOBEEG, 2005), alertando que a secagem da secreção aumenta a carga microbiana e dificulta o processamento, sendo necessário acionar o canal de ar/água, alternadamente durante 15 segundos (SOBEEG, 2005; CDC, 2011).

Após a pré-limpeza, transportar o endoscópio para área de processamento para realizar as etapas subsequentes: limpeza e desinfecção de alto nível. Para o transporte, os endoscópios sujos devem ser acondicionados em recipientes, totalmente fechados e rotulados, visando evitar exposição aos TAS, pacientes ou ambientes (SOBEEG, 2005; CDC, 2011).

b) 2ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: LIMPEZA

A etapa da limpeza constitui um sistema de higienização, o qual deve ser feito levando em consideração as variáveis de tempo, temperatura, ações mecânica e química. O círculo de Sinner representa bem as quatro variáveis responsáveis pela eficiência da limpeza (Figura 05). O sistema de higienização deve ser feito levando-se em consideração essas variáveis e a sua relação com as características de sujidades presentes nos materiais (PICCHIAI, FARIAS, 2013).

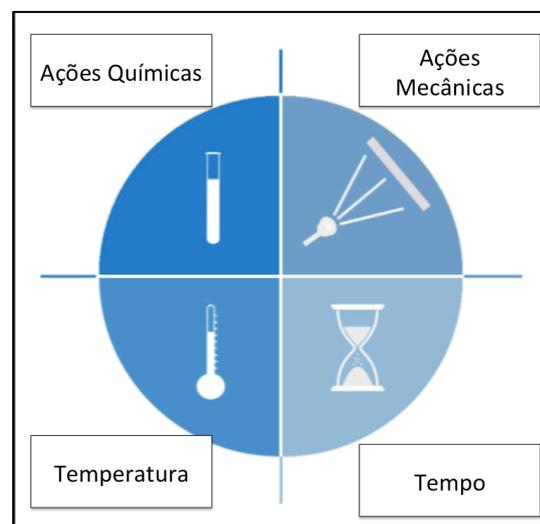


Figura 05: Círculo de Sinner

Fonte: www.googleimagens.com.br

<https://www.linkedin.com/company/emon-srl>

(Modificado e adaptado) acesso em 19/02/2017

Nesta etapa, recomenda-se para os aparelhos de endoscopia, primeiramente o teste de vedação na sala destinada ao processamento com a finalidade de observar algum vazamento ou escape de ar, pois a imersão em água ou solução desinfetante poderá danificar o aparelho. Caso apresente algum vazamento ou escape de ar, o processo de limpeza deve ser interrompido (SOBEGG, 2005).

Após o teste de vedação, o endoscópio é submetido à limpeza, que consiste na remoção de sujidade visível aderida nas superfícies, fendas, serrilhas, articulações e lúmens, dispositivos e equipamentos, podendo ser por meio de um processo manual ou automatizado, utilizando detergente e água. Essa etapa tem como finalidade reduzir o número de micro-organismos e remover resíduos

(químicos, proteínas, sangue, endotoxinas) e outros fragmentos orgânicos que aderem ao lúmen e à superfície externa dos PPS (RIBEIRO *et al.*, 2013).

A limpeza de forma manual ou automatizada eficiente pode diminuir a carga de micro-organismos em 99,99%, ou seja, redução de quatro logaritmos ($4 \log_{10}$) do *bioburden* presente no PPS (RUTALA; WEBER, 2008; SOBECC, 2013), sendo esta etapa fundamental para garantir a fase posterior da DAN ou esterilização, reduzindo contaminação presente nos aparelhos de endoscopia (GRAZIANO *et al.*, 2006, KOVALEVA *et al.*, 2013).

O *bioburden* é variável em decorrência da conformação e do sítio corporal onde o PPS foi utilizado. Estudos verificaram que a carga microbiana de instrumentos utilizados nas áreas corporais estéreis era relativamente baixa (cerca de $1 \log_{10}$ UFC/instrumentos), enquanto que, nas áreas naturalmente colonizadas, a carga era elevada ($5 \log_{10}$ a $10 \log_{10}$ UFC/instrumentos), ainda, maior carga microbiana nos lúmens do que nas superfícies externas dos PPS (PHAC, 2010; SOBECC, 2013).

Segundo a SOBEEG (2005), a presença de fezes, sangue ou secreções respiratórias pode resultar em falha no processo de DAN. Isso devido ao material orgânico proteger o micro-organismo da exposição ao desinfetante ou por inativar o produto químico. Consequentemente, a limpeza rigorosa é necessária nos EGF, antes das etapas subsequentes.

Antes de iniciar o processo da limpeza dos EGF, é recomendado apertar as válvulas para facilitar o acesso a todas as superfícies, removendo, assim, a sujidade interna dos canais, por meio de *flush* (SOBEEG, 2005; CDC, 2011; HONG; LIM, 2013).

A técnica manual é predominante no Brasil, onde inclui escovar a superfície externa e partes removíveis, realizando a desconexão e desmontagem de todos os componentes do EGF (por exemplo, válvulas de aspiração) e imersão em uma solução de detergente, seguidas por irrigação de canais internos com auxílios de seringa ou por adaptadores (Figura 06, p. 56). Essa última ação é denominada de *flushing* (KOVALEVA *et al.*, 2013; HONG; LIM, 2013). Esses adaptadores auxiliam em várias etapas do processamento e são fornecidos pelo fabricante dos equipamentos (CHIU *et al.*, 2012).



Figura 06: Adaptadores para o *flushing*

Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório St. Boniface Research Center

O *flushing* utilizado por meio de adaptadores validados por empresas dos EGF é indicado para auxiliar na introdução de água, detergente, ar e desinfetante internamente, recomendado no momento da limpeza, enxágue, desinfecção e secagem dos canais. O adaptador encaixa na conexão preta (Figura 06), no local das válvulas dos endoscópios as quais são removíveis e a seringa conectada na parte verde (Figura 06). Aspirada a solução desejada e introduzida por meio da inserção das válvulas nos canais de ar/água e sucção/biópsia dos EGF (SOBEEG, 2005).

Além do *flushing* é necessário que seja realizada a escovação de todos os canais, visando à remoção de material orgânico e outros resíduos, descartando o detergente após o uso (KOVALEVA *et al.*, 2013; HONG; LIM, 2013). Estes artefatos recomendados para a remoção de sujidade apresentam-se com tamanho apropriado para os canais, sendo necessária a introdução com angulação do equipamento de 45°, ressaltando que algumas marcas não apresentam a possibilidade de introdução de escovas em canais de ar/água (ASGE, 2011; WHO, 2016). Vale destacar que os artefatos, utilizados na limpeza dos canais do EGF, também devem ser submetidos ao mesmo processamento que os endoscópios (BRASIL, 2013).

Entretanto, uma investigação com análise microbiológica de EGF em uso clínico mostrou que os canais de ar/água podem se tornar contaminados após o processamento, apresentar maior do que nos canais de sucção/biópsia e constituem um risco de segurança para os pacientes submetidos a exames de endoscopia

gastrointestinal (RIBEIRO; OLIVEIRA, 2012), provavelmente pela impossibilidade da fricção desses canais.

Contudo, inadequada limpeza de endoscópios tem sido um fator predominante na transmissão de micro-organismos por EGF (FORTE; SHUM, 2011). O cumprimento das recomendações, frente ao tipo de detergente utilizado e descarte após o uso, é um fator importante para minimizar as falhas no processamento de EGF (KNUDSON, 2014).

Pode-se observar que vários protocolos mundiais preconizam diversos tipos de saneantes, com concentrações e tempo de imersão dos PPS conforme recomendações do fabricante, nas quais são indicados detergentes enzimáticos, no Brasil, Canadá, Estados Unidos e Austrália (SOBEEG, 2005; PHAC, 2010; ASGE, 2011; GESA, 2011; WEO, 2011; BRASIL, 2012; BRASIL, 2013), alcalinos e neutros, nos Estados Unidos e Brasil (ZUHLSDORF *et al.*, 2002; WEO, 2011, 2002; ASGE, 2011; BRASIL, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 55, de 2012 que determina o uso único dos enzimáticos no Brasil (BRASIL, 2012), porém essa recomendação não é enfatizada pela SOBEEG (2005), cuja última publicação antecede a resolução. Essa aparente contradição pode flexibilizar o descarte e ocorrer o reuso, podendo ser um fator de risco para surtos envolvendo EGF.

Segundo a resolução citada acima, a atividade enzimática de detergentes tem a capacidade, por meio de enzima, de catalisar uma reação e degradar substratos específicos (BRASIL; 2012). Soluções enzimáticas devem ser diluídas com água morna em temperatura, aproximadamente de 35°C, porque, quando utilizadas com água fria ocorre o processo de desnaturação das proteínas e inativação das enzimas, não conseguindo atingir seu potencial de ação necessária na etapa de limpeza (GESA; 2011). Todavia, a formulação do detergente deve ser de enzimas da subclasse das proteases, quando o detergente for constituído somente de uma enzima (BRASIL, 2012).

Alguns dados demonstram que detergentes à base de enzimas são mais eficazes do que os detergentes neutros na remoção de micro-organismos das superfícies dos PPS (RUTALA; WEBER, 2008). Conforme pesquisas de Blog e Kampf (2004), detergente enzimático (*Endozyme*) removeu 69% do biofilme, sendo

que os detergentes não enzimáticos testados não foram eficientes na remoção de matéria orgânica presente no biofilme.

Entretanto, Vickery *et al* (2004, 2009) demonstraram que detergente não enzimático possui uma ação melhor na remoção do biofilme tradicional (TBF), sendo que o detergente testado (*Matrix* - não enzimático) apresentou a capacidade de remover entre 90 a 100% do biofilme nos canais de teflon, que simulam canais de endoscópios.

Detergentes alcalinos, com pH em torno de nove a 14, são utilizados para a limpeza de PPS em decorrência de sua capacidade de dissolver proteínas e gorduras, embora algumas formulações possam ser corrosivas para os produtos a depender do antioxidante agregado. Os detergentes alcalinos promovem o descolamento de resíduos por emulsificação, saponificação e peptização (RUTALA; WEBER, 2008; SOBECC, 2013). Não foram encontrados estudos que testaram detergentes alcalinos em endoscópios.

Independente do tipo de detergente utilizado, se não for utilizado conforme recomendações do fabricante, o mesmo não possui o efeito esperado. As orientações quanto à diluição, à temperatura da água e tempo de contato devem ser seguidas para que a eficiência do produto seja plena. Segundo Rutala e Weber (2008) e SOBECC (2013), nunca deve deixar o instrumento imerso na solução por tempo excessivo, pois pode favorecer a formação do biofilme.

De forma geral, espera-se dos detergentes certificados para uso em PPS sejam compatíveis com materiais processados sem causar danos, como oxidação e manchas e empreguem agentes tensoativos biodegradáveis, sem adição de fragrâncias ou corantes e que não possuam componentes que ofereçam riscos a profissionais e pacientes, como substâncias carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (BRASIL, 2012; SOBECC, 2013).

Na etapa de limpeza, é de suma importância que se utilize, apenas, um tipo de agente (detergente neutro, com ou sem enzimas ou alcalino). A mistura de produtos pode reduzir a eficiência da limpeza e aumentar o risco ocupacional pela formação de produtos tóxicos (SOBECC; 2013). Uma solução de detergente com pH neutro sem adição de enzimas (pH entre 6,5 e 7,5) ou quase neutro, geralmente, oferece o melhor perfil de compatibilidade de materiais e uma boa remoção de sujidade (RUTALA; WEBER, 2008; SOBECC, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (OMG) e a Organização Mundial de Endoscopia (OME), na etapa da limpeza, podem ser utilizados detergentes com ou sem enzimas ou contendo substâncias antimicrobianas. Recomendam utilizar detergentes que não sejam espumantes, pois a espuma pode dificultar o bom contato do líquido com as superfícies do EGF e impedir o campo de visualização, expondo os profissionais a riscos de lesões (WEO; 2011).

Após a limpeza dos EGF, é necessário proceder o enxágue dos canais com água destilada esterilizada, utilizando os adaptadores (Figura 06, p. 56). Após o enxágue, secar externamente o endoscópio com tecido limpo e macio e utilizar ar comprimido medicinal para a secagem dos canais internos, prevenindo, assim, a diluição e alteração da concentração dos desinfetantes (CDC, 2011).

Segundo protocolos da *British Society of Gastroenterology* (BSG), é necessária a coleta periódica de amostras do endoscópio, para avaliação da qualidade da limpeza (BSG, 2008), porém outros protocolos são indicados, apenas, em casos específicos de surtos. Segundo Alfa *et al* (2012b), grandes centros que utilizam endoscópios não têm um programa de garantia de qualidade para certificar a eficácia da rotina de protocolos de processamento.

Para a averiguação do processo de limpeza, existe teste rápido validado comercialmente que avalia os canais de EGF quanto à presença de material orgânico residual como sangue, proteínas e hidratos de carbono. Outra possibilidade é o uso de Adenosina Trifosfato (ATP), molécula presente nos micro-organismos e células humanas (Figura 07) (ALFA; FÁTIMA; OLSON, 2013).



Figura 07: Teste de adenosina trifosfato específico para aparelhos de endoscopia
Fonte: <http://www.planitrade.com.br/caracteristicas-atp.php> (acesso em 01/03/2017)

O teste de ATP para EGF é disponível no mercado por meio de um *swab* com diâmetro compatível com os canais do equipamento, de forma que pode ser realizado o contato em toda a superfície interna do endoscópio. Posteriormente à introdução do *swab*, a parte da esponja é removida para análise da quantidade de Unidades Relativas de Luz (URL), presente após a etapa de limpeza. Resultados acima de 200 URL, para o ATP *Clean Trace*™ 3M indicam presença de sujidade no aparelho (ALFA; FÁTIMA; OLSON, 2013).

c) 3ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: DESINFECÇÃO DE ALTO NÍVEL

A desinfecção é conceituada como um processo que destrói micro-organismos na forma vegetativa, patogênicos ou não, com exceção de alto número de esporos bacterianos, pela aplicação de meios físicos ou químicos (SOBEEG, 2005; SOBECC, 2013; AORN, 2017).

Dentre os métodos físicos estão os equipamentos de pasteurização, termodesinfetadoras e lavadoras de descarga, e os métodos químicos são produtos à base de aldeído, Ácido Peracético (AP), soluções cloradas e álcool (PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013). No método químico é de suma importância a verificação do tempo de exposição e temperatura dos DAN utilizados.

Atualmente, há cinco princípios ativos de germicidas químicos aprovados pelo FDA para realizar o processo de desinfecção dos EGF: Glutaraldeído (GLUT), Ácido Peracético (AP), Peróxido de Hidrogênio (PH), associação de AP com PH e Ortoftaldeído (OPA) (FDA; 2009). Os desinfetantes não autorizados pelo FDA são: iodóforos, soluções de cloro, álcoois, compostos de amônio quaternário e compostos fenólicos (RUTALA; WEBER, 2008).

Abordam Rutala e Weber (2008) que esses DAN autorizados pelo FDA têm excelente atividade antimicrobiana, porém produtos como: peróxido de hidrogênio 7,5% e ácido peracético 0,08% com adição de peróxido de hidrogênio 1,0% podem causar danos estéticos e funcionais nos EGF. Contudo, é importante afirmar que a capacidade das bactérias formarem biofilmes nos canais de EGF é mais frequente quando se encontram danificados, podendo contribuir para o fracasso do processamento (KOVALERA *et al.*, 2013).

A Sociedade Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico, Recuperação Anestésica e Centro de Materiais e Esterilização (SOBECC) elencam as características dos desinfetantes ideais, sendo estes: largo espectro de ação, atividade rápida, sofrer poucas condições ambientais, não ser inativado por matérias orgânica, compatível com detergentes, atóxico para os TAS e o paciente, não interferir com diversas matérias-primas dos produtos, fácil de utilizar, baixo nível de odor, econômico, difusível, estável, monitorável e que favoreça a limpeza (SOBECC, 2013).

Para a escolha do DAN, é importante atentar para a segurança da saúde dos profissionais, verificando as regulamentações necessárias de cada um dos saneantes, utilizado no processamento de endoscópios (PHAC, 2010).

Uma vez escolhido o desinfetante e observadas as recomendações do fabricante quanto ao seu uso, é necessário imergir, totalmente, o aparelho e todos os canais do equipamento na solução, com auxílio de uma seringa conectada ao adaptador e cronometrar o tempo para imersão que varia de acordo com o fabricante (SOBEEG, 2005).

A seguir, estão apresentadas as características dos três desinfetantes de alto nível, aprovados em âmbito nacional e que foram utilizados nesta pesquisa (BRASIL, 2007): Glutaraldeído, Ortoftaldeído e Acelerador Peróxido de Hidrogênio.

- **Glutaraldeído**

É um dialdeído saturado (1,5 pentanedial $C_5H_8O_2$), disponível em concentrações de 2% e 2,2%, possui o modo de ação por meio da alteração da síntese de proteína, Ácido Ribonucleíco (ARN) (*ribonucleic acid - RNA*) e Ácido Desoxirribonucleíco (ADN) (*deoxyribonucleic acid - DNA*) dos micro-organismos, por aquilação dos grupos sulfidril, hidroxil, carboxil e amino (não danifica equipamentos óticos, borracha ou plástico) (FDA, 2009; SOBECC, 2013).

Esse desinfetante é apresentado de várias formas; com concentração ácida (pH 3,0 a 6,3), utilizado em concentrações $\geq 2\%$, aceitável para DAN, entretanto é corrosivo em contato com metal (HOWIE, 2008) e, na forma alcalina, tem um pH 7,5 a 8,5, sendo utilizado em concentrações $\geq 2,4\%$, com atividade microbicida contra esporos, fungos, vírus e bactérias (HOWIE, 2008; SOBECC, 2013).

Para utilização do GLUT como forma de DAN, é necessária a ativação da solução, na qual o tempo de vida é limitado pela polimerização das moléculas de GLUT, que bloqueia os sítios ativos do aldeído, responsáveis pela atividade biocida (SOBECC, 2013). Esse desinfetante apresenta períodos curtos de exposição com apenas dois minutos, eliminando uma gama de micro-organismos, porém não elimina os esporos bacterianos (RUTALA; WEBER, 2008).

A solução ativada do glutaraldeído, utilizada para o processamento, deve ser acondicionada em recipiente preferencialmente de plástico, hermeticamente fechado com tampa e ser aberto o tempo suficiente, apenas para inserir os PPS ou monitorização da solução (SOBEEG, 2005; BRASIL, 2007).

Solução de GLUT a 2% é ativa contra bactérias na forma vegetativa em menos de dois minutos, contra *M. tuberculosis*, fungos e vírus em 10 minutos e contra esporos de *Bacillus sp.* e *Clostridium sp.* em três horas. Os estudos demonstram que o tempo de contato deve ser sensível, conforme aumenta o tempo de exposição para que a ação letal seja efetiva para determinados micro-organismos (SOBECC, 2013). Sua eficiência é maior quando exposto durante 20 minutos a 20°C (CDC, 2011).

Pineau *et al* (2008a) comparam GLUT, OPA e AP quanto à capacidade de fixar matéria orgânica em tubos de PTFE e concluíram que AP reduz 41% da quantidade de proteína, OPA, 14% e o GLUT, 55%. Em repetidos processos de desinfecção, observaram que os aldeídos possuem maior capacidade de fixação de proteínas do que o AP e o GLUT é mais eficaz que o AP contra Agentes Transmissíveis Não Convencionais (ATNC).

Para averiguação da qualidade da solução de GLUT e, em caso de reuso da solução, recomenda-se o uso de testes para monitorar os parâmetros indicadores de efetividade, como por exemplo, a concentração e pH (BRASIL, 2007; SOBECC, 2013). Essa monitorização deve ser feita, no mínimo, uma vez ao dia, antes do início das atividades, pois a hiperdiluição da solução e a polimerização do produto (no caso do GLUT) são pontos críticos no processo (SOBECC, 2013).

O controle da efetividade da solução em relação à concentração é realizado por fita de indicação de medida da concentração eficaz mínima (CEM) (*minimum effective concentration* – MEC). No mercado brasileiro, há duas opções de monitores que verificam a CEM de 1,5% e outro de 1,8% para o glutaraldeído na concentração a 2% (BRASIL, 2007).

Segundo Brasil (2007) e SOBECC (2013), é necessário realizar o teste de verificação do pH do GLUT para monitorar a qualidade do processo, com teste de tira química para pH. As soluções neutras ou alcalinas possuem ações microbicida e anticorrosiva superiores quando comparadas às ácidas, sendo necessária a mensuração diária antes do uso.

Uma das desvantagens do GLUT é a propriedade de fixar matéria orgânica nos materiais, causando incrustações e até obstrução de lúmens. Isso ocorre quando os procedimentos de limpeza dos PPS não são realizados adequadamente, antes da imersão no desinfetante (SOBECC; 2013; PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013). Na pesquisa sobre fixação de sangue em superfícies, Kampf *et al.* (2004) demonstraram que o GLUT tem maior capacidade de fixar sangue do que o desinfetante AP.

A toxicidade do GLUT para os TAS, paciente e meio ambiente tem sido discutida (TIPPLE *et al.*, 2004) e segundo o Informe Técnico nº 04 de 2007, a exposição aos TAS a elevados níveis de vapor do produto pode ocorrer durante o processamento dos PPS em salas mal ventiladas, respingo ou derramamento de solução quando há não aderência ao uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI).

Além dos TAS, a toxicidade pode apresentar no paciente, devido a resíduos de DAN nos PPS. Há relatos de colites causadas por resíduos de aldeído em canais de colonoscópios e casos de lesão ocular causada por instrumentos oftalmológicos desinfetados em GLUT com enxágue insuficiente (BRASIL, 2007; SOBECC, 2013; PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013).

No Brasil, o GLUT é recomendado pela SOBEEG para realizar a DAN em aparelhos de endoscopia, entretanto é contraindicada para desinfecção de acessórios de assistência ventilatória, pois apresenta como alternativas a termodesinfecção, solução clorada, ácido peracético e peróxido de hidrogênio (SOBEEG, 2005; BRASIL, 2012).

- **Ortoftaldeído**

O OPA foi certificado pelo FDA e liberado para comercialização em outubro de 1999. É solução líquida com pH de 7,5, contendo 0,55% de OPA (RUTALA; WEBER, 2001; PINEAU *et al.*, 2008a), 1,2 – benzenedicarboxaldeído, tem aspecto

límpido e cor azul clara (SOBECC, 2013; PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013). Esse desinfetante tem mostrado excelente atividade microbiana em estudos *in vitro* (RUTALA; WEBER, 2001), age pela interação com aminoácidos, proteínas e micro-organismos (PINEAU *et al.*, 2008a; SOBECC, 2013).

Estudos demonstram excelente ação micobactericida, inclusive superior ao GLUT, com o tempo médio para redução de 10^6 *M. bovis*, usando 0,21% de OPA, seis minutos, quando comparados com 32 minutos em 1,5% de GLUT. O OPA começou a substituir o GLUT em centros de saúde, por apresentar vantagens potenciais: não provocava irritação ocular e cavidades nasais e não necessitava de ativação (RUTALA; WEBER, 2008; PINEAU *et al.*, 2008a).

Outra vantagem do OPA é em relação à grande margem de pH (3 a 9) e menor nível de odor, apresenta excelente compatibilidade com matérias-primas de produtos e equipamentos. As desvantagens do OPA são: reduzida ação contra os esporos, formação de manchas acinzentadas nos PPS por reação com proteínas e nas mãos dos profissionais, decorrentes de sujidade residual e enxágue insuficiente (SOBECC, 2013; PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013).

O tempo para a desinfecção pode variar em decorrência da metodologia adotada para os testes de validação em diferentes países. Em processadores automatizados de endoscópios, nos quais a temperatura do OPA permanece estável em 25°C, o tempo de desinfecção é de cinco minutos (PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013). As diretrizes brasileiras não abordam o uso de OPA para a DAN em aparelhos de endoscopia, sendo ressaltado pela SOBEEG o uso do desinfetante glutaraldeído.

- **Acelerador Peróxido de Hidrogênio**

O APH é um oxidante rápido com concentração entre 3 e 6%, o qual produz radicais livres que atacam lipídios celulares essenciais, proteínas e DNA, bem como a capacidade de remover matéria orgânica, tanto em apresentação como em desinfetante de superfícies e instrumentos. Possui a capacidade bactericida, virucida, fungicida e esporicida; bactericida em três minutos de contato, virucida e fungicida em cinco minutos, esporicida em seis horas e micobactericida em 20 minutos (PINEAU *et al.*, 2008a; HOWIE, 2008; SOBECC, 2013; PSALTIKIDIS; QUELHAS, 2013).

Geralmente, APH é mais eficaz contra bactérias gram-positivas do que as bactérias gram-negativas, pois realiza um mecanismo de ação por alterações da permeabilidade da membrana celular, inibição da atividade enzimática, desnaturação das proteínas celulares, formação de um radical hidroxila que ataca as membranas lipídicas e DNA que prejudica a estrutura e função das células (HOWIE, 2008).

Ainda não há dados suficientes para afirmar se a utilização de APH não causaria danos aos diferentes produtos e equipamentos. Fabricantes de endoscópios contraindicam, formalmente, o uso de soluções de PH em seus equipamentos, pois causariam alterações estéticas sobre a coloração de partes metálicas e danos funcionais (PINEAU *et al.*, 2008a; RUTALA; WEBER, 2008; SOBECC, 2013).

d) 4ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: ENXÁGUE

Após a DAN, é necessário que ocorra o enxágue com a finalidade de remover os resíduos tóxicos dos produtos químicos, para não causarem toxicidade aos pacientes submetidos a procedimentos de endoscopia subsequentes (SOBEEG, 2005; BALSAMO, 2009).

Nessa etapa, independente do desinfetante utilizado, após DAN, o equipamento deverá ser enxaguado abundantemente (COWEN, 2001), sendo indicado água filtrada ou esterilizada (CDC, 2011),

O enxágue dos canais internos deve ser realizado com uso de adaptadores (Figura 06, p. 60), para proceder à irrigação utilizando baixa pressão, por meio de seringa, na frequência mínima de cinco vezes (SOBEEG, 2005). Essa etapa necessita ser realizada de forma minuciosa para garantir que o EGF seja utilizado no exame do paciente sem presença de resíduos tóxicos.

e) 5ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: SECAGEM

A etapa final de secagem reduz a probabilidade do EGF permanecer úmido evitando o crescimento bacteriano, bem como a possibilidade de recontaminação do equipamento por micro-organismos hidrófilos (CDC, 2011). Para a secagem dos

canais internos, recomenda-se utilizar ar comprimido medicinal, sob baixa pressão, percorrendo todos os aparelhos (SOBEEG, 2005).

Para a secagem interna dos canais do EGF, recomenda-se a aplicação de 30 mL de álcool a 70% e 90% internamente e, posteriormente, ar comprimido por 10 minutos, antes do armazenamento, visando à remoção completa da umidade favorável ao crescimento bacteriano (ALFA; OLSON; DEGAGNE, 2006; SOBEEG, 2005; CDC, 2008; 2011).

f) 6ª ETAPA DO PROCESSAMENTO: ARMAZENAMENTO

O armazenamento tem a finalidade de evitar a recontaminação dos EGF, recomendados que sejam armazenados secos, na posição vertical, para facilitar a secagem tanto dos endoscópios quanto dos componentes removidos, como tampas e válvulas (NOMURA *et al.*, 2004; SOBEEG, 2005; CDC, 2011). Os locais de armazenamento devem ser limpos de modo que estejam protegidos de contaminação (SOBEEG, 2005; CDC, 2011), em armários ventilados que permitam a limpeza e temperatura de 10 e 40°C, evitando umidade e calor excessivos (NOMURA *et al.*, 2004; SOBEEG, 2005).

Pineau *et al* (2008b) abordam que armários com sistema de secagem dos canais internos do endoscópio e as superfícies externas têm a possibilidade de controlar as condições de armazenamento, reduzindo, assim, os riscos de proliferação durante essa etapa. Mas, é importante ressaltar que esses armários de secagem não realizam desinfecção, somente mantêm o nível de qualidade microbiológica, alcançado após a aplicação do processamento.

Em pesquisa de vigilância microbiológica realizada na prática clínica no Canadá, com aparelhos endoscópios do tipo gastroscópios, colonoscópios e duodenoscópios, verificou-se que, quando estes equipamentos são processados corretamente e armazenados em armário em posição vertical não há crescimento bacteriano, quando os mesmos permanecem durante o final de semana, podem ser reutilizados de forma segura (ALFA *et al.*, 2012b)

O ideal é que o endoscópio tenha uso imediato, após a DAN, pois não há período de guarda seguro, para um PPS submetido e processado por meio químico. No caso da desinfecção, deve-se considerar como resultado final a carga

microbiana, pois, uma vez armazenado, haverá multiplicação microbiana, como é o caso dos EGF (SGNA, 2007; BARBOSA, 2008).

3.3 BIOFILME EM PRODUTOS PARA A SAÚDE

Na história da microbiologia, os micro-organismos foram descritos com base em suas características de crescimento em meios de cultura rica em nutrientes e na forma de vida. Em geral, a maioria dos micro-organismos se apresentava livremente, em forma planctônica (DOLAN; COSTERTON, 2002; PADOVEZE, 2013).

Observações posteriores mostraram micro-organismos originados de outra forma de vida, associadas a biofilmes, que foram descritos em muitos sistemas, desde Anton Van Leeuwenhoek (cientista holandês), que começou a examinar placas de biofilmes em seus próprios dentes no século XVII. Porém, a teoria geral da predominância do biofilme não foi promulgada até 1978 (DOLAN; COSTERTON, 2002). O biofilme é denominado como uma organização bacteriana, originalmente, observada em 1.936 a partir de incrustações e corrosão das instalações e tubulações, tendo grande impacto sobre o controle de infecção (VICKERY *et al.*, 2004).

Dolan e Costerton (2002) apresentam uma teoria de que as bactérias desenvolvem, formando os biofilmes, que é uma comunidade sésil caracterizada por células que são aderidas irreversivelmente a um substrato ou interface ou entre si, embebidas em matriz de substâncias extracelulares poliméricas por elas produzidas e que exibem alterações fenotípicas com respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes. Os autores supracitados demonstram que 99% das bactérias extracelulares são responsáveis pelo desenvolvimento do biofilme, quando em temperatura e ambiente propícios, taxa de fluxo, presença de cisalhamento, sistema aberto e rugosidade (DOLAN; COSTERTON, 2002).

Dolan (2002) afirma que a água é o principal constituinte do biofilme, chega a representar 97% do conteúdo total. Além disso, estão presentes outras macromoléculas, como: proteínas, DNA, diversos produtos derivados de *lise* de bactérias e materiais não celulares, tais como cristais minerais, partículas corroídas, sedimentos ou componentes do sangue. Essa composição depende do ambiente no qual o biofilme se desenvolve. O detalhamento do desenvolvimento do biofilme

indica a presença de carboidratos em sua matriz, polissacarídeos, glicoproteínas e proteínas (DOLAN; COSTERTON, 2002; PADOVEZE, 2013).

Algumas teorias procuram explicar o desenvolvimento do biofilme como um processo que envolve dois tipos de estágio de interação da bactéria com a superfície: a reversível e a irreversível. O mecanismo de adesão bacteriana inclui algumas condições, como: temperatura, pH, hidrofobicidade da superfície (capacidade de repulsão à água), disponibilidade de nutrientes e a presença de compostos orgânicos e inorgânicos (DOLAN; COSTERTON, 2002; DOLAN, 2002).

No estágio inicial, denominado reversível, ocorre o ataque das bactérias planctônicas, desenvolvendo um filme que favorece a adesão de novas bactérias. No estágio final, denominado irreversível, as células se mantêm imóveis, e o biofilme apresenta-se de forma madura, formando camadas cada vez mais espessas (LIMA; OLIVEIRA; CARVALHO, 2017). O desenvolvimento do biofilme dá-se em diversos estágios consecutivos, como a adesão, crescimento, produção do polissacarídeo, maturação e dispersão do biofilme (Figura 08) (LINDSAY; HOLY, 2006).

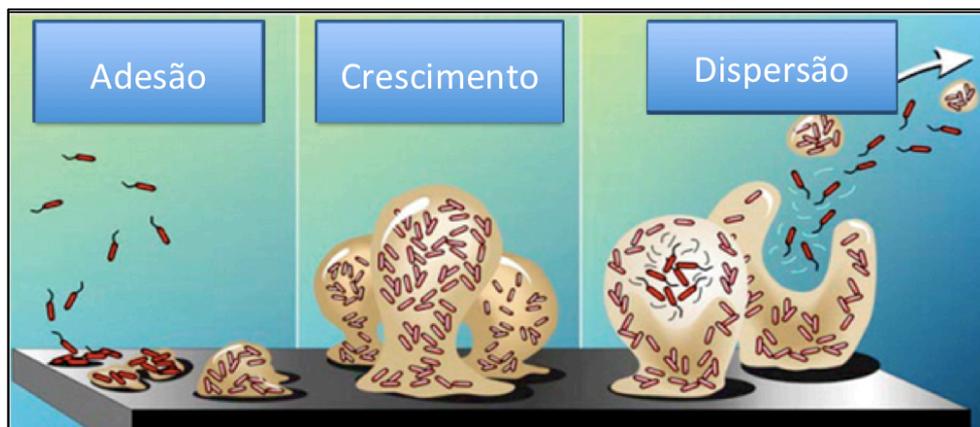


Figura 08: Etapas do desenvolvimento do biofilme

Fonte: (Center for biofilm engineering) <http://www.erc.montana.edu/index.html>
(adaptado e modificado) (acesso em 04/03/2017)

Quando já formados, os biofilmes são comunidades complexas de micro-organismos aderidos a uma superfície ou interface, que podem se apresentar em formato irreversível, resultando em uma matriz diferenciada quando madura, em uma estrutura tridimensional, (COSTERTON, 1999; ALFA *et al.*, 2002; NELSON, 2005; PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004). Um biofilme típico irá conter cerca de 85% de substâncias poliméricas e só 15% de massa bacteriana, e as células estão localizadas em uma matriz rígida, denominada de "torres" e "cogumelos". Os

biofilmes podem se formar em superfícies diferentes, incluindo tecidos vivos ou mortos, sistemas de abastecimento de água, dispositivos médicos, como os canais do endoscópio (KOVALEVA *et al.*, 2013).

Uma vez que as bactérias aderem à superfície, começam a se dividir, e as células se estendem ao redor do sítio de fixação, formando uma microcolônia. Posteriormente, a bactéria secreta o Exopolissacarídeos (EPS), que constitui uma matriz do biofilme. A composição do EPS é diferente em cada bactéria e varia desde alginato de *P. aeruginosa*, celulose no *S. typhimurium*, galactose no *V. cholerae* e poli-N-acetilglucosamina no *S. aureus*, dentre outros (DOLAN; COSTERTON, 2002; DOLAN, 2002; PADOVEZE, 2013).

As superfícies úmidas apresentam características com maior facilidade de adesão e formação de colônias com presença de micro-organismos, proporcionando o desenvolvimento do biofilme (VICKERY *et al.*, 2004). Entretanto, os patógenos podem se apresentar de forma livre, no estado planctônico ou aderidos a uma superfície (STEWART; COSTERTON, 2001). A diferenciação entre as formas do biofilme é por meio da aderência (células sésseis, consideradas imóveis) à superfície da matriz, diferente das células planctônicas (células flageladas, consideradas móveis) que são bactérias em suspensão (VICKERY *et al.*, 2004).

Essa matriz é composta fundamentalmente de carboidratos e proteínas, mas tem sido observada, também, a presença de DNA extracelular e detritos de células mortas, formando uma camada viscosa, que possui a capacidade de aderir em superfícies como de instrumentais ou dispositivos médicos que são implantados em pacientes no momento das cirurgias e pode ser grande causadora de infecções resistentes (STEWART; COSTERTON, 2001).

Outro constituinte da matriz são os polissacarídeos, os quais promovem proteção às células sésseis residentes no biofilme e se tornam mais resistentes do que em suspensão, forma planctônica (Figura 09, p. 70) (REN-PEI *et al.*, 2014).

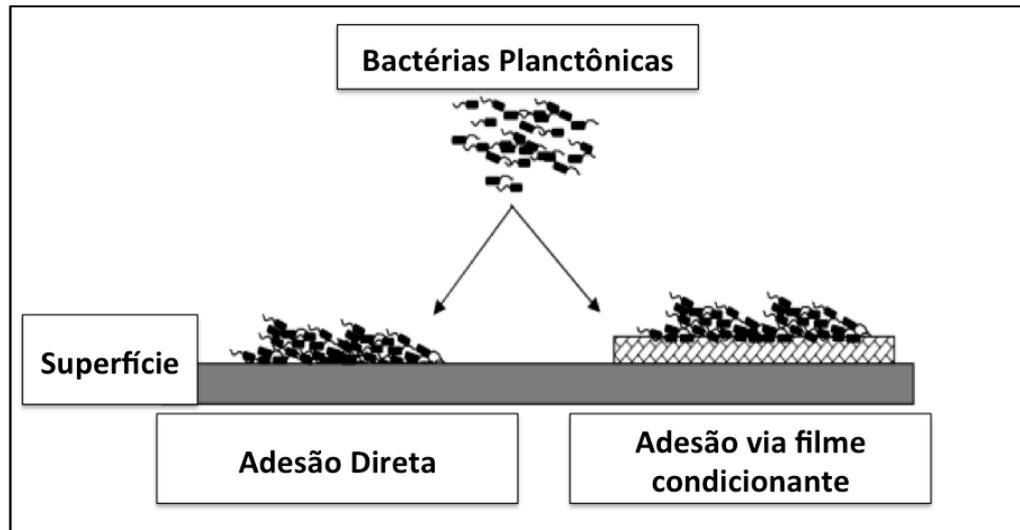


Figura 09: Tipos de adesão bacteriana
Fonte: (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013)

A formação de biofilme por micro-organismos em superfícies inertes tem sido extensivamente estudada, havendo uma relação direta entre a capacidade do organismo para formar um biofilme e a sua patogenicidade (KOVALERA *et al.*, 2013).

Segundo Dolan (2002), a formação do biofilme pode ser influenciada pelos seguintes fatores: características da superfície, do líquido, condições hidrodinâmicas e propriedades das células. Muitos processos físicos, biológicos e químicos determinam o desenvolvimento inicial do biofilme. Primeiramente, moléculas e pequenas partículas são transportadas à superfície por difusão, formando um filme condicionante. Essa camada tem influência na absorção, atração e transporte dos micro-organismos e nutrientes para a superfície (STEWART; COSTERTON, 2001).

Alguns micro-organismos possuem maior facilidade em constituir biofilme, dependendo da hidrofobicidade da célula, da presença de flagelos ou fimbrias e da capacidade de produção de exopolissacarídeos. No caso de PPS, os micro-organismos mais relevantes na produção de biofilme são *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, micobactérias e diversos fungos. Esses micro-organismos podem ser provenientes da pele do paciente, dos profissionais da saúde, da água e de fontes ambientais (DOLAN, 2001; RUTALA; WEBER, 2008).

Estudos sobre biofilme contendo *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas putida* por microscopia eletrônica apontam que essas bactérias formam,

inicialmente, pequenas microcolônias. Com o tempo, ocorre a migração de células de uma microcolônia para outra. A estrutura da microcolônia muda de compacta para mais frouxa ao longo do tempo e, quando isso ocorre dentro das células, as microcolônias se movem (DOLAN, 2002; PADOVEZE, 2013).

A matriz que compõe os biofilmes pode afetar a cinética da ação de um desinfetante (STEWART; COSTERTON, 2001; BALSAMO, 2009). As bactérias no interior do biofilme são até mil vezes mais resistentes aos antimicrobianos ou desinfetante do que a mesma bactéria em suspensão (VICKERY *et al.*, 2004; ZHONG *et al.*, 2009; REN-PEI *et al.*, 2014). Assim, os biofilmes, sabidamente, dificultam o processamento eficiente e representam desafio para o reuso de PPS (VICKERY *et al.*, 2009).

A forte adesão dos biofilmes à superfície dos materiais dificulta sua remoção, tornando o processo de limpeza mais complexo (VICKERY *et al.*, 2004). Logo, é fundamental a realização de ação mecânica direta, por meio de fricção com escovas, quando na limpeza manual, ultrassom ou jatos de água sob pressão, pois, apenas, imersão em detergentes é ineficaz para sua remoção (RUTALA; WEBER, 2008, BALSAMO, 2009; SOBECC, 2013).

A presença de sujidade também pode promover uma coleção adicional e que, após ser alcançada uma densidade crítica, os fragmentos de biofilme se soltam devido a um processo de despolimerização e podem ser transferidos aos pacientes por meio de PPS, durante exames ou procedimentos cirúrgicos (VICKERY *et al.*, 2004; PADOVEZE; 2013).

Existe certa dificuldade em verificar se o biofilme foi removido, até mesmo após a limpeza ter sido realizada com lavadora ultrassônica. Autores afirmam que detergente enzimático não consegue reduzir a carga microbiana dos endoscópios ou camadas de polissacarídeos formadas pelas bactérias. Esses estratos são verdadeiras proteções para os micro-organismos que podem ser responsáveis pela transmissão de micro-organismos infecciosos, pois são difíceis de remover e abrigam bactérias. Contudo, existe a grande necessidade de atenção à eficácia dos detergentes utilizados no processo da limpeza (VICKERY *et al.*, 2004).

A detecção do biofilme em PPS pode ser realizada, utilizando técnica de visualização por meio de microscopia eletrônica ou por método quantitativo, no qual se utiliza a ação mecânica (agitação/ vibração) para remover micro-organismos

associados ao biofilme, os quais são quantificados por meio de contagem em placa ou técnica de coloração em fluorescência (DOLAN, 2001, PADOVEZE, 2013).

No entanto, o controle do processamento do EGF não garante a inibição da formação do biofilme durante a endoscopia (KOVALEVA *et al.*, 2013). A formação de biofilmes, no interior dos canais de endoscópios antigos, tem resultado em níveis elevados e persistentes de UFC, depois da desinfecção e rinsagem com álcool (ALFA, OLSON, MURRAY, 2014).

O acúmulo cíclico de micro-organismos e matéria orgânica em PPS reusáveis não tem sido bem estudado. Biofilmes presentes em PPS são diferentes do modelo desenvolvido em constante hidratação, pois, durante o uso, os PPS são hidratados e ao final submetidos ao processamento, no qual são secos. Como as falhas na adesão às apropriadas técnicas de limpeza têm sido relatadas, é provável que os micro-organismos se protejam nesse acúmulo cíclico (VICKERY *et al.*, 2009; PADOVEZE, 2013).

Diante essa diferenciação, o desenvolvimento do biofilme se origina de dois tipos, com diferentes conformações, estruturas e modelo: o Tradicional (TBF) e o *Buildup* (BBF). O TBF dependente da disponibilidade de nutrientes e a cinética de fluxo do fluido (Figura 10), em nichos ambientais, como tubulações de água, podendo apresentar com grande facilidade de agregação e adesão em implantes e dispositivos médicos (ZHONG *et al.*, 2009).

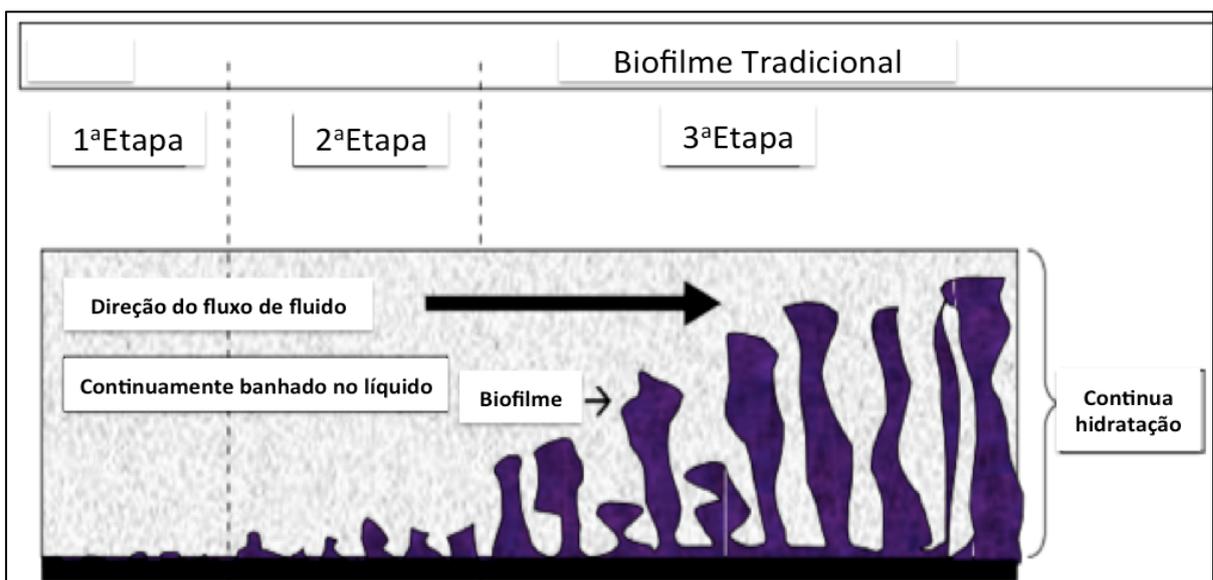


Figura 10: Desenvolvimento do biofilme tradicional

Fonte: (ZHONG *et al.*, 2009) (adaptado e modificado, acesso em 01/03/2017)

O modelo TBF tem capacidade de se desenvolver em contato com uma superfície continuamente imersa em fluidos e exposto ao contato com microorganismos. Esse tipo de biofilme tem capacidade de se formar em diversos tipos de dispositivos, como: cateteres intravenosos, implantes médicos e endoscópios, os quais apresentam uma umidade residual. Os endoscópios apresentam condições propícias para o desenvolvimento do TBF devido à presença de canais internos com lúmens estreitos, que dificultam a limpeza adequada, os quais podem ser contaminados a partir de fontes de água (ALFA; HOWIE, 2009a,b).

Já o BBF é desenvolvido por meio de falhas na etapa da limpeza que podem acumular matéria orgânica durante os ciclos de esterilização e/ou desinfecção e uso repetido desses PPS, formando uma matriz EPS rígida e difícil de remover (ZHONG *et al.*, 2009) (Figura 11).

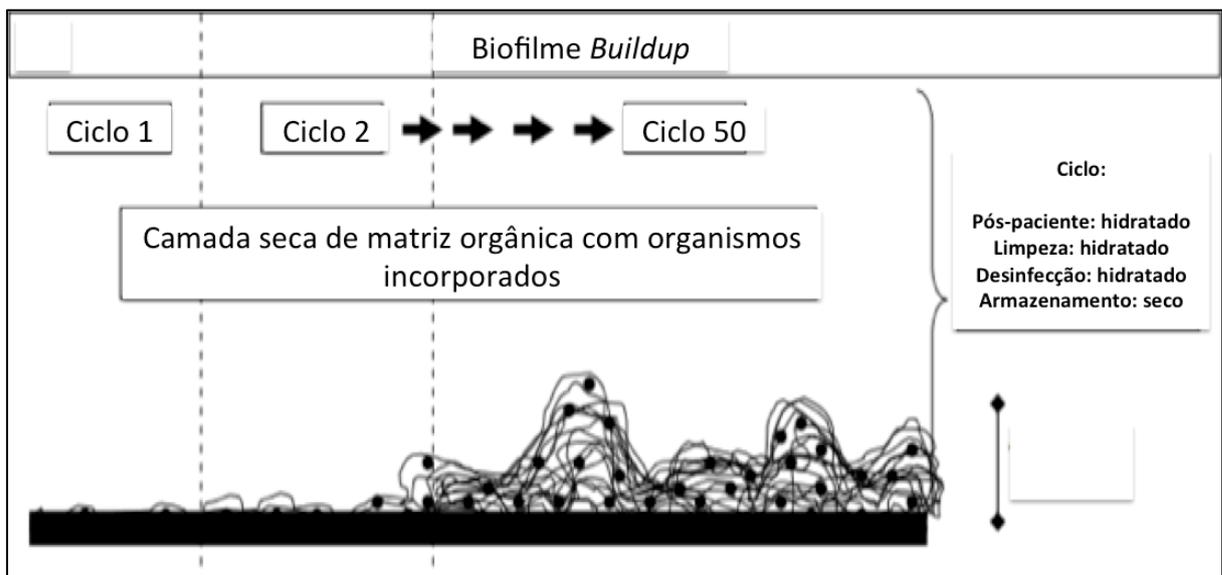


Figura 11: Desenvolvimento do biofilme *buildup*
Fonte: (ZHONG *et al.*, 2009)
(adaptado e modificado, acesso em 01/03/2017)

Os estágios iniciais de formação do BBF (condicionamento de superfície a partir de secreções de paciente, adesão microbiana, crescimento e colonização) são semelhantes ao modelo TBF. No entanto, os dispositivos médicos tais como EGF são usados várias vezes por dia, com exposição cíclica em níveis elevados de carga microbiana devido ao contato com a superfície da mucosa do intestino. Além disso, cada ciclo de utilização e processamento envolvem a exposição de fases de hidratação (pós-paciente, limpeza e desinfecção), bem como uma fase seca

(durante o armazenamento). O uso contínuo pode facilitar a formação do BBF que consiste em camadas de material orgânico seco, agregadas com micro-organismos (ALFA; HOWIE, 2009a,b).

Estudo realizado por Pajkos, Vickery, Cossart (2004) demonstrou que endoscópios novos não apresentavam solo ou presença de biofilme em seus canais internos, porém os canais novos apresentavam defeitos como rachaduras, que possibilitavam o desenvolvimento do biofilme. Outro achado importante foi em endoscópios em uso na prática clínica de diferentes hospitais que apresentaram acumulações de materiais que se assemelhavam aos biofilmes, detectados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Quando detectado presença de biofilme, os métodos físicos, tais como ultrassom, limpeza mecânica ou a fricção, são efetivos, se realizados de forma adequada, e os métodos químicos, frequentemente, não são efetivos, devido à resistência dos biofilmes aos biocidas (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; VICKERY *et al.*, 2004).

Diversas são as implicações para a saúde, no que tange ao desenvolvimento do biofilme, devido à grande dificuldade de remoção e sua consequente interferência nos processos de desinfecção e esterilização. A presença de biofilme pode contribuir para a falência dos procedimentos de limpeza, independente da rigorosa adesão aos protocolos (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; VICKERY *et al.*, 2004). Vale ressaltar que a realização da limpeza e pré-limpeza em EGF, por meio de imersão em líquido ou detergente, são fundamentais para evitar o ressecamento de matéria orgânica e formação de biofilme (PADOVEZE, 2013).

A persistência do biofilme, além de diminuir a eficácia da limpeza, também protege a bactéria, presente nessa estrutura, da ação do desinfetante e do agente esterilizante (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; VICKERY *et al.*, 2004).

4.1 TIPO DE PESQUISA

Trata-se de uma pesquisa experimental e laboratorial, que consiste, especialmente, em submeter os objetivos de estudo à influência de determinadas variáveis, em condições controladas e conhecidas pelo investigador, para observar os resultados que as mesmas produzem no objeto (PRODANOV; FREITAS, 2013).

Nesta pesquisa, diferentes detergentes e desinfetantes de alto nível foram avaliados quanto à capacidade de destruir e remover micro-organismos presentes no Biofilme Tradicional (TBF) e *Buildup* (BBF), durante a simulação do processamento de endoscópios, somente com detergente e em associação com detergente e desinfetante, sem fricção.

4.2 LOCAL E PERÍODO

O estudo foi realizado no período de 18 de março a 20 de dezembro de 2015, no Laboratório *Albrechtsen Research Center of Saint Boniface General Hospital*, interligado à *University of Manitoba*, na cidade de Winnipeg, Manitoba, Canadá, sob a supervisão da coordenadora Dr^a Michelle J. Alfa. O laboratório apresentava infraestrutura adequada e medidas de segurança contra riscos biológicos, físicos, químicos e radioativos, aprovadas pelos órgãos competentes canadenses.

4.3 MATERIAL

Foram utilizados MBECTM (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) *Biofilm Inoculator* (*Innovotech*®, Edmonton, Alberta, Canadá) com e sem a presença de hidroxiapatita para a formação dos biofilmes analisados. MBECTM consistem em 96 *pegs* (aparentam pinos de plástico) aderidos a uma tampa de plástico estéril com uma base contendo 96 espaços individuais, denominados poços (Figura 12, p. 77). Os biofilmes são estabelecidos e formados nesses *pegs* com fluxos de nutrientes no interior desses poços, os quais são desenvolvidos em constante movimento do MBEC. A tampa com *pegs* do biofilme formado é removida dos *bottom* e submersa a um novo com os agentes desejados para avaliação. MBEC é muito utilizado pela versatilidade de poder testar 96 diferentes agentes em um mesmo *kit*.

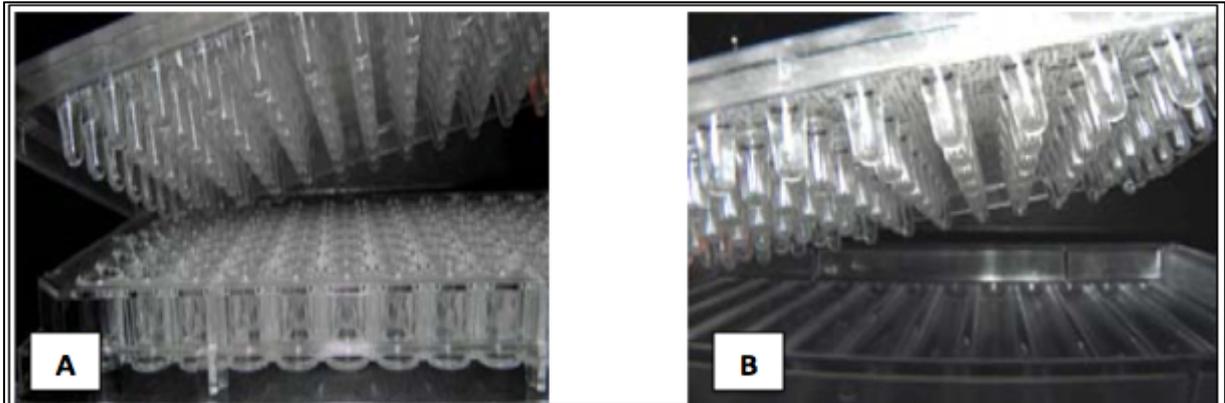


Figura 12: MBEC (A) MBEC com *pegs* aderidos à tampa e sua base constituída por 96 poços utilizados para armazenar o solo formador do biofilme, (B) visão dos *pegs* quando suspensos da base.

Fonte: http://www.innovotech.ca/products_use.php (acesso em 01/03/2017)

MBEC foi utilizado inicialmente para a formação de biofilme por Ceri *et al* (1999), denominado como modelo de Calgary, que formou biofilme com três diferentes bactérias a 35°C com 95% de Umidade Relativa (UR), em uma mesa com movimento rotativo contínuo, simulando o *mixer* para o desenvolvimento do biofilme.

As instruções do fabricante MBEC (INNOVOTECH, 2012) demonstram ensaios realizados com biofilmes para validar o MBEC e colocá-lo no mercado apto para o desenvolvimento e formação de biofilmes em *pegs* de plásticos. Primeiramente, o desenvolvimento se deu quando as bactérias planctônicas começaram a aderir à superfície dos *pegs* de plástico. Esse biofilme é, comumente, visível, como uma sujidade aderida à superfície dos *pegs*. Algumas células podem estar dispersas e ser eliminadas da superfície, servindo como um inóculo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*). A área média da superfície de cada *peg* no dispositivo MBEC é 108,9 mm² (Figura 13, p. 78).

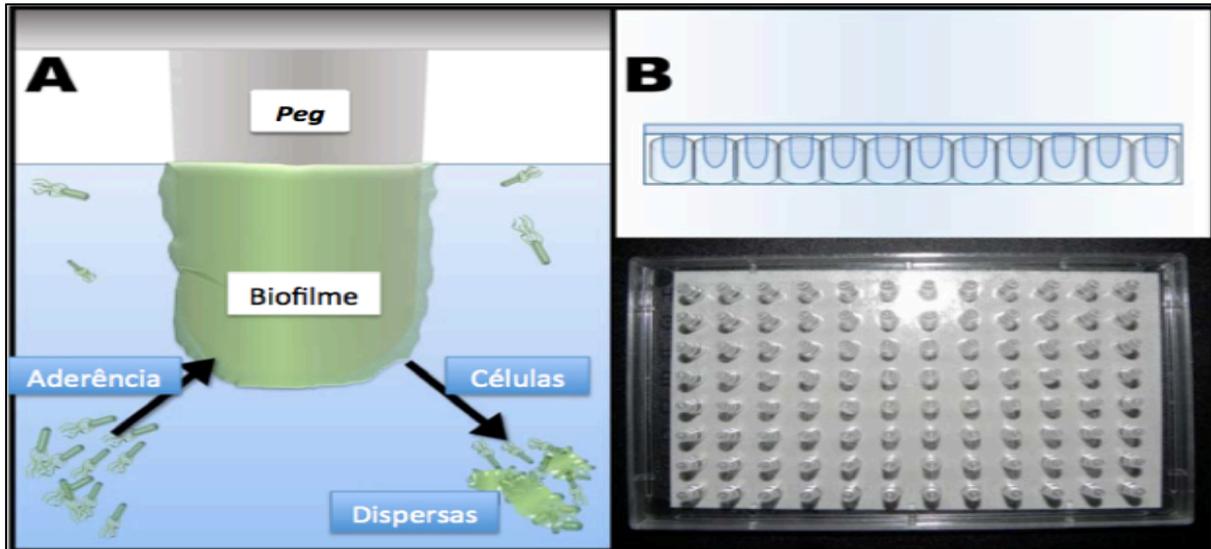


Figura 13: MBEC (A) demonstra os *pegs* com a capacidade de aderência do biofilme na superfície de plástico, (B) *pegs* submersos à base do MBEC, mostrando o contato com a substância utilizada para a formação do biofilme.

Fonte: http://www.innovotech.ca/products_use.php (acesso em 01/03/2017)

4.4 MICRO-ORGANISMO E CULTURA

4.4.1 DESAFIO ORGÂNICO: BACTÉRIAS E ARTIFICIAL SOLO TESTE

Foram eleitos para o estudo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) que são micro-organismos frequentemente associados a contaminações e infecções em procedimentos de endoscopia (DOLAN; COSTERTON, 2002; CDC, 2008; KOVALEVA *et al.*, 2013). Os micro-organismos estavam armazenados na bacterioteca do próprio laboratório (armazenados em *freezers* menos 80°C) e repicados a primeira vez após descongelar, sendo utilizados ambos para o TBF e BBF.

Posteriormente, os micro-organismos foram subcultivados duas vezes em *Tryptic Soy Agar* (TSA) com 5% de sangue de carneiro (*Oxoid*, Toronto, Canadá) e incubados às temperaturas de 35 a 39°C por 24 horas. Somente após os subcultivos é que as bactérias estavam adequadamente prontas para serem utilizadas nesta pesquisa.

Para o início do experimento, foi preparada uma suspensão bacteriana com aproximadamente 8 log₁₀ UFC/mL em reservatório com água de osmose reversa esterilizada, cuja concentração foi determinada por espectrofotômetro (SPECTRONIC 601 – MILTON ROY), baseada na escala de densidade de

suspensão por McFarland (*McFarland Latex Stand 0.5 – Hardy Dignostics*). Após a suspensão das bactérias, foram transferidas para tubos de *ependorfs* e centrifugadas (8R *centrifuge, International Equipment Company (IEC)*). Em seguida, foi retirado o supernadante dos tubos e desprezado em recipiente com hipoclorito de sódio. Procedimento realizado em cabine de segurança biológica com fluxo laminar e filtro HEPA (*High efficiency particulate arrestance*) (Figura 14), classe tipo I e II (*Airclean Systems, Ontario, Canadá*), com intuito de proteger o ambiente e os profissionais das partículas e agentes infecciosos.



Figura 14: Cabine de segurança biológica com fluxo laminar
Fonte: www.googleimagens.com.br (acesso em 01/03/2017)

Após o preparo das bactérias, as mesmas foram misturadas com solo, Artificial Solo Teste (AST) (*US patent 6,447,990*) (ALFA *et al.*, 2002), utilizado para a formação do biofilme no MBEC/*pegs*. Esse solo contendo AST e bactérias foi conferido por meio de inoculação em placas de TSA com diluições 1:10 seriada em (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) utilizando tampão fosfato salino esterilizado (*phosphate buffered saline* - PBS) para diluição. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 horas à temperatura de 35 a 39°C. Após esse período, foram submetidas à contagem de células viáveis.

4.5 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME

4.5.1 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME TRADICIONAL

O TBF foi desenvolvido durante oito dias em MBEC *pegs* (com a presença de hidroxiapatita), em condições assépticas na cabine de segurança, segundo modelo proposto por (CERI *et al.*, 1999). Realizou-se a mimitização do processamento de EGF, somente, com a etapa da limpeza em posição estática (MBEC não permite a fricção, situação semelhante ao que ocorre com o canal de ar/água), utilizando a água de torneira esterilizada para esse procedimento. Esse desenvolvimento se deu em virtude da conceitualização do TBF ser formado em constante hidratação (Figura 15).

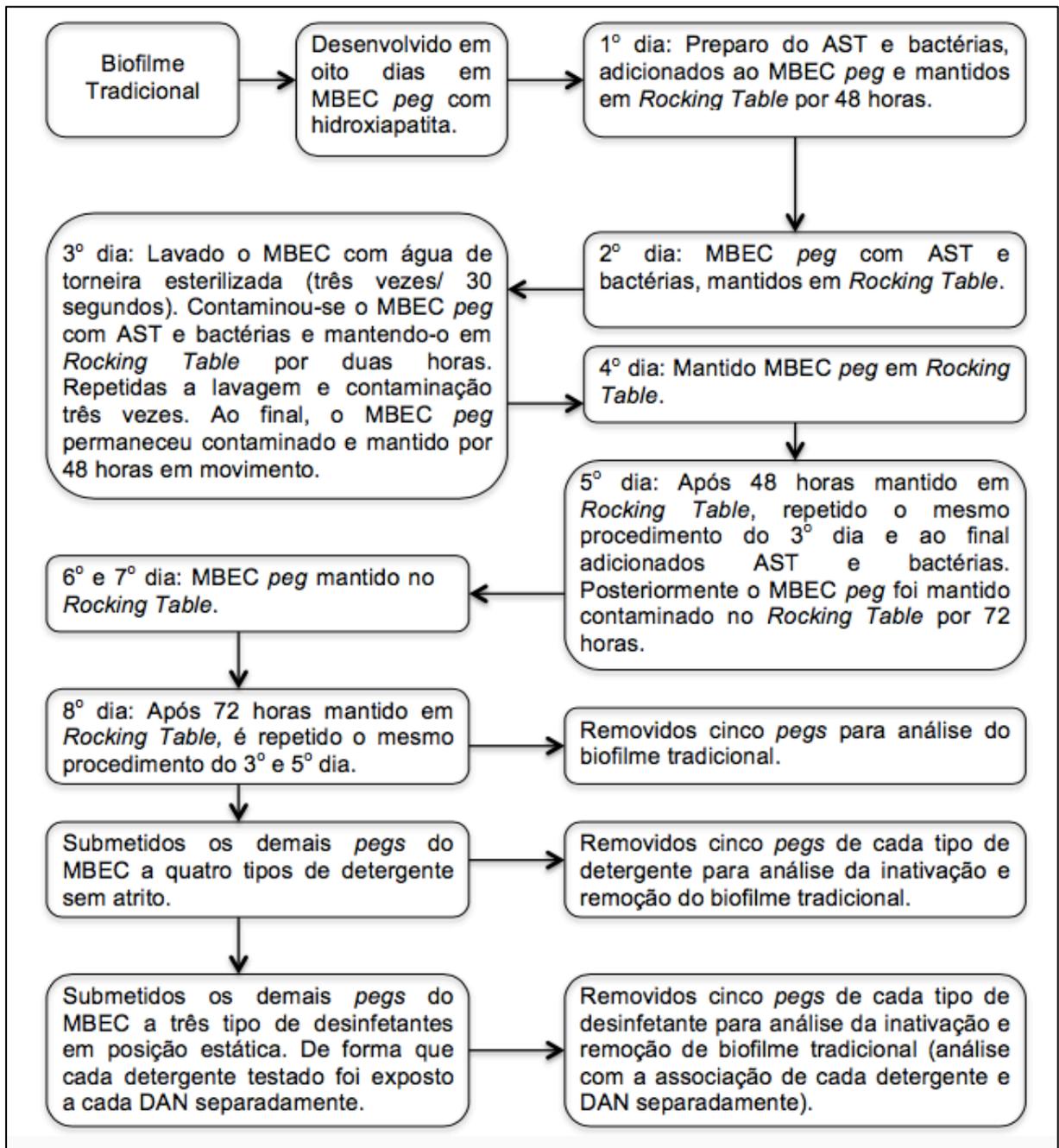


Figura 15: Fluxograma de desenvolvimento do biofilme tradicional em oito dias/etapas.

No momento da contaminação para o desenvolvimento do TBF, adicionaram-se, em cada poço do MBEC, 150 μ L (microlitro) de AST e bactérias (Figura 15, p. 80). Para a etapa de lavagem, foram utilizados 200 μ L de água de torneira esterilizada. No momento em que o MBEC era mantido no *Rocking Table*, foram padronizados oito movimentos por minuto (MPM) (Figura 16, p. 81). Todo o procedimento foi realizado na cabine em temperatura ambiente de 20 a 21° C.

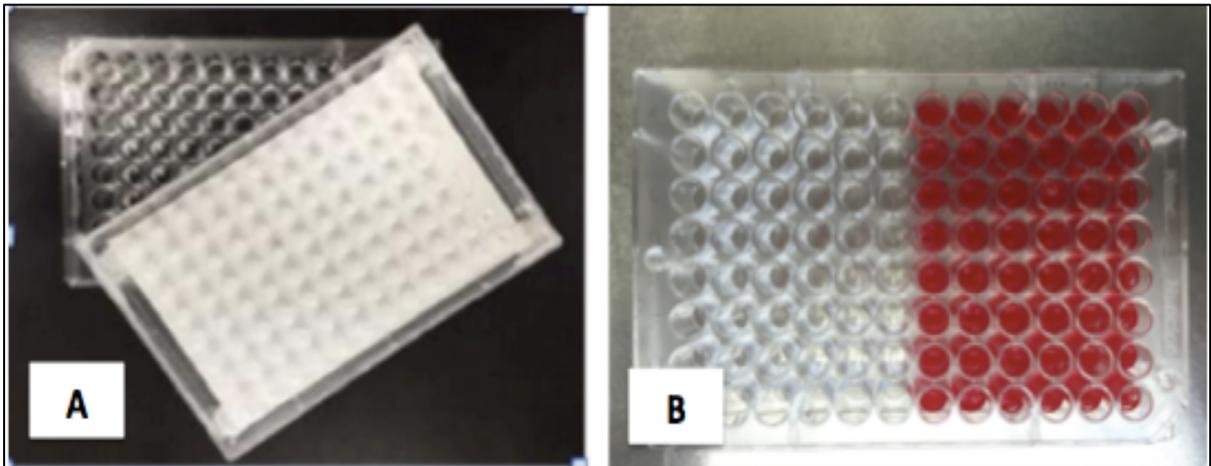


Figura 16: (A) MBEC com a visão dos *pegs* sem presença de formação de biofilme, (B) poço com presença de solo (AST e bactérias) para o desenvolvimento do biofilme tradicional.

Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center*



Figura 17: *Rocking table* utilizado para movimentar o MBEC durante a formação do biofilme.

Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center*

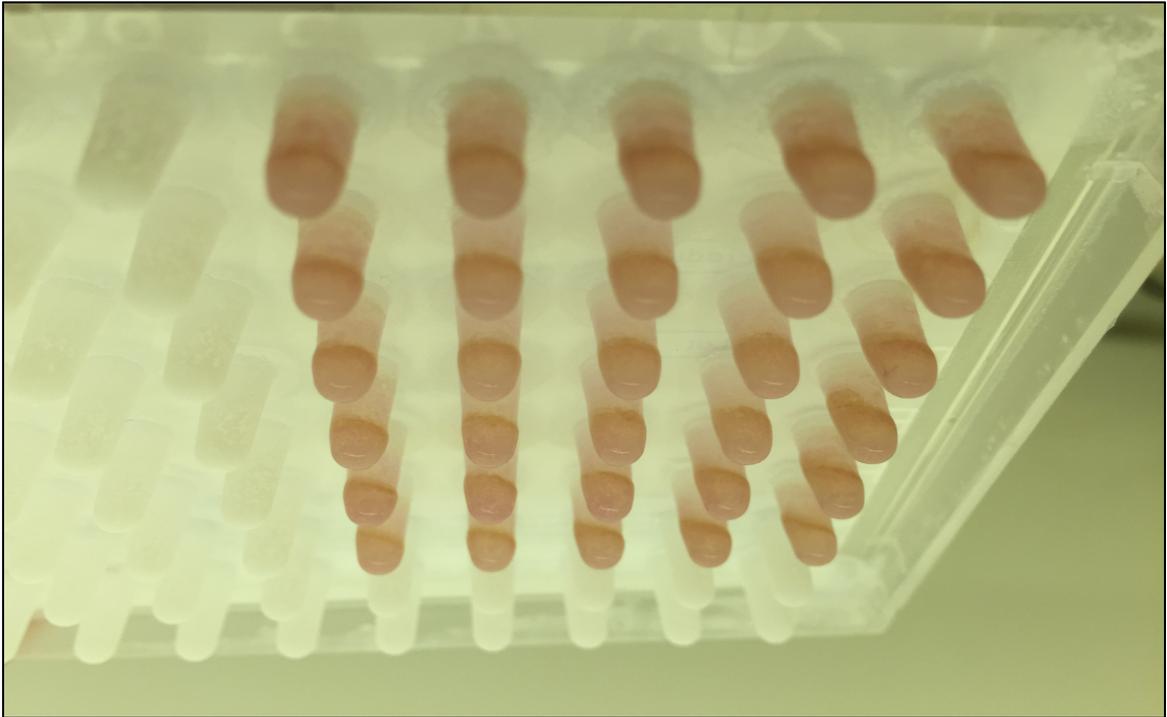


Figura 18: MBEC com biofilme tradicional aderido aos *pegs*.
Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center*

4.5.2 DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME *BUILDUP*

O BBF foi desenvolvido durante oito dias em MBEC *pegs* estéreis (sem hidroxiapatita), na cabine com máxima barreira asséptica. Além do modelo de Ceri *et al.* (1999), modificado para a formação do BBF, associou-se a pesquisa de Zhong *et al.* (2009). Para esse desenvolvimento, mimitizou-se o processamento de EGF, com a etapa da limpeza em posição estática, utilizando somente a água de torneira esterilizada e a DAN com a utilização do GLUT 2.6% Metricide™, diluído 1:50. Esse desenvolvimento foi decorrente da diferenciação desse biofilme que se origina devido a cíclicos processos de secagem e hidratação, da mesma forma que é realizado na desinfecção (Figura 19, p. 83).

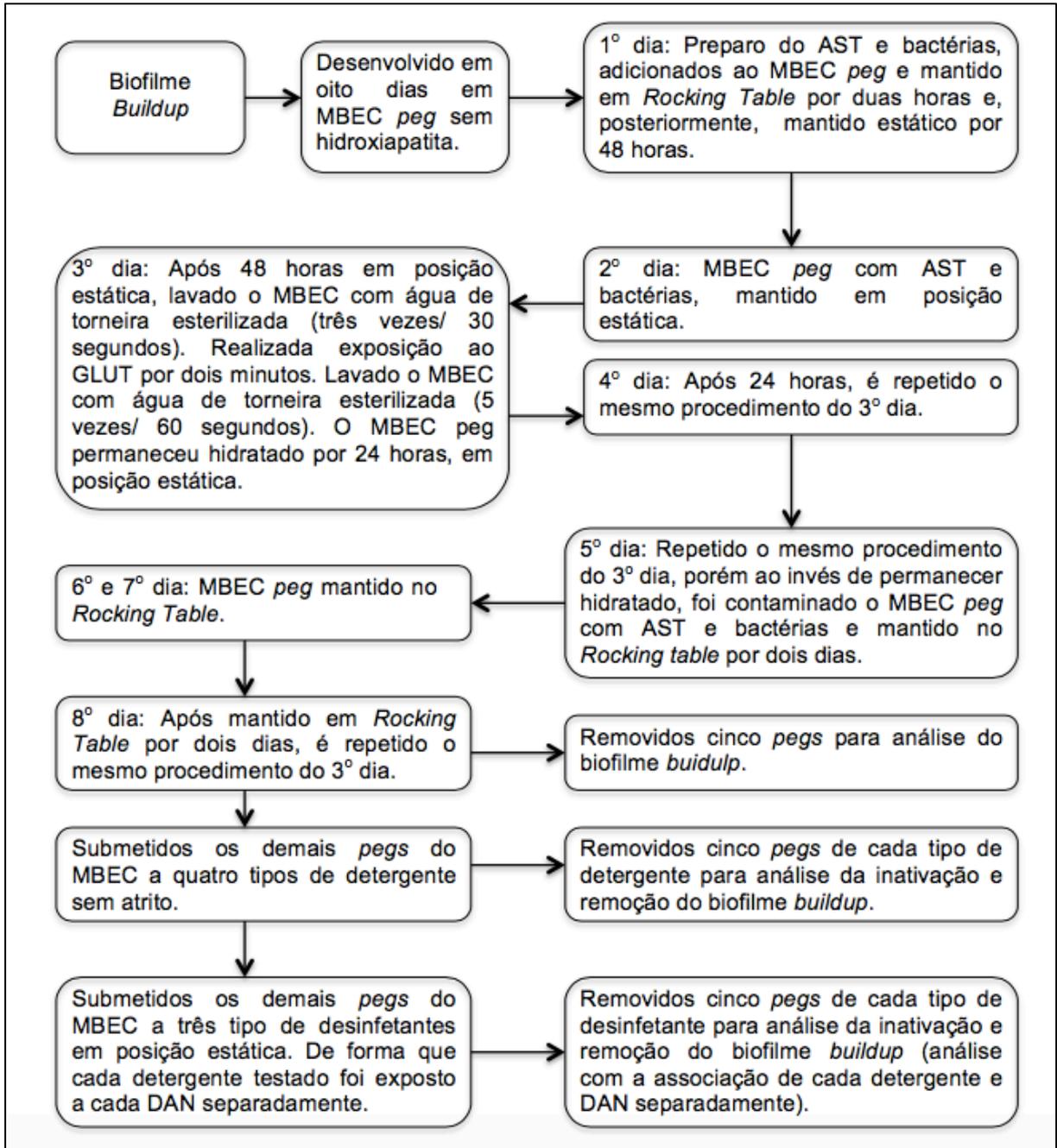


Figura 19: Fluxograma de desenvolvimento do biofilme *buildup* em oito dias/etapas.

No momento da contaminação para o desenvolvimento do BBF, adicionaram-se em cada poço do MBEC 200 μ L de AST e bactérias (Figura 16, p. 81). Para a etapa de lavagem, foram utilizadas 200 μ L de água de torneira esterilizada. Na etapa de exposição ao GLUT 2.6%, utilizaram-se 200 μ L de Metricide™. Quando o MBEC *peg* foi acondicionado hidratado, adicionaram-se, 150 μ L de água de torneira esterilizada em cada poço. No momento em que o MBEC era mantido no *Rocking Table* foram padronizados oito movimentos por minuto (MPM) (Figura 17, p. 81).

Todo o procedimento foi realizado na cabine em temperatura ambiente de 20 a 21° C.

4.6 TESTES

4.6.1 TESTES COM DETERGENTES E DESINFETANTES DE ALTO NÍVEL

Foi avaliada a ação de quatro detergentes e três desinfetantes na destruição ou remoção do TBF e BBF (Quadro 05, p. 86). Após a formação do TBF nos *pegs*, os mesmos foram submetidos ao procedimento de limpeza, com os detergentes, seguindo o tempo de exposição, temperatura e diluição de cada fabricante. Após a etapa de limpeza em posição estática, os *pegs* foram extraídos para análises subsequentes. De forma semelhante, procedeu-se com os *pegs* submetidos, apenas, aos desinfetantes, e os submetidos ao processamento completo simularam o processamento de EGF. Foram realizados testes químicos para avaliar a MEC dos desinfetantes no momento do uso.

Pelo fato de o MBEC possuir a capacidade de 96 *pegs*, utilizaram-se um mesmo MBEC para todas avaliações de TBF e outro para todas de BBF, quais sejam: os quatro detergentes (isolados), dos três desinfetantes (isolados) e dos quatro detergentes e três desinfetantes (associados separadamente), conforme recomendações do fabricante (Figura 20, p. 85).

Quadro 05: Detergentes e desinfetantes avaliados quanto à destruição e remoção dos biofilmes tradicional e *buildup* (GOIÂNIA, 2016)

Detergente	Tipo do detergente	Marca/ Companhia	Uso- Diluição	Tempo de exposição e temperatura
D1	<i>Prolystica Enzymatic</i> 2x concentração enzimática	STERIS Mississauga, ON, Canadá	4mL/ 1L	5 minutos 30°C
D2	<i>Prolystica Neutral</i> 2x concentração não enzimática	STERIS Mississauga, ON, Canadá	4mL/ 1L	5 minutos 30°C
D3	<i>Neodisher® Alkaline</i> não enzimático	Dr. Weigert (Systematic Hygiene)- Hamburg, Germany	30mL/ 1L	10 minutos 30°C
D4	<i>Endozime® Bio-Clean –</i> detergente enzimático	Ruhof - Mineola, New York, USA	8mL/ 1L	2 minutos 30°C
Desinfetante	Tipo do Desinfetante	Marca/ Companhia	Reuso/ Dias	Tempo de exposição e temperatura
DAN 1- GLUT	<i>Metricide™</i> Glutaraldeído 2.6%	Metrex - Sybron Canadá, Oakville	14 dias	20 minutos Temperatura Ambiente
DAN 2- OPA	<i>Cidex®</i> Ortoftaldeído 0.55%	Johnson & Johnson, Markham, ON, Canadá	14 dias	10 minutos 20°C
DAN 3 – AHP	<i>Revital-Ox Resert®</i> Acelerador Peróxido de Hidrogênio 2%	STERIS Mississauga, ON, Canadá	14 dias	5 minutos Temperatura Ambiente

* Temperatura ambiente Winnipeg, Manitoba, Canadá (20 a 21 °C).

DAN – Desinfetante de Alto Nível

D – Detergente

Fonte: Próprio autor

4.7 EXTRAÇÃO DOS PEGS PARA ANÁLISES

Após formação do TBF e BBF, os *pegs* foram removidos individualmente, quebrados da tampa estéril do MBEC™ com auxílio de pinças hemostáticas estéreis e colocados em tubos tipo *snap cap* (Simport, Quebec, Canadá), e a eles

adicionados 500µL de água de osmose reversa esterilizada mais 500µL de neutralizante para análise microbiana. Foi utilizado o neutralizante proposto por Pineau e Phellippe (2013) contendo, *Tween 80*, *lecithin*, *sodium thiosulfate* e *L-histidine*.

Após a remoção, os *pegs* foram acondicionados em tubos adequados para cada tipo de análise (análise microbiana com presença de neutralizante e análise de proteína e carboidrato sem neutralizante), realizou-se a extração do biofilme, para que o mesmo ficasse suspenso dentro do tubo e facilitasse a análise. Nos tubos destinados à análise de proteína e carboidrato, foram adicionados somente 1000µL de água de osmose reversa esterilizada. Essa extração foi realizada com dois minutos de *mixer* (Finemixer SH 2000), cinco minutos de sonicação em ultrassônica com 50/60 Hertz (*Branson 1200 Ultrasonic*, Canadá, Pickering ON) e posteriormente em *vortex* (*Fisher Scientific, Touch mixer, Model 232*) por um minuto (Figura 21).

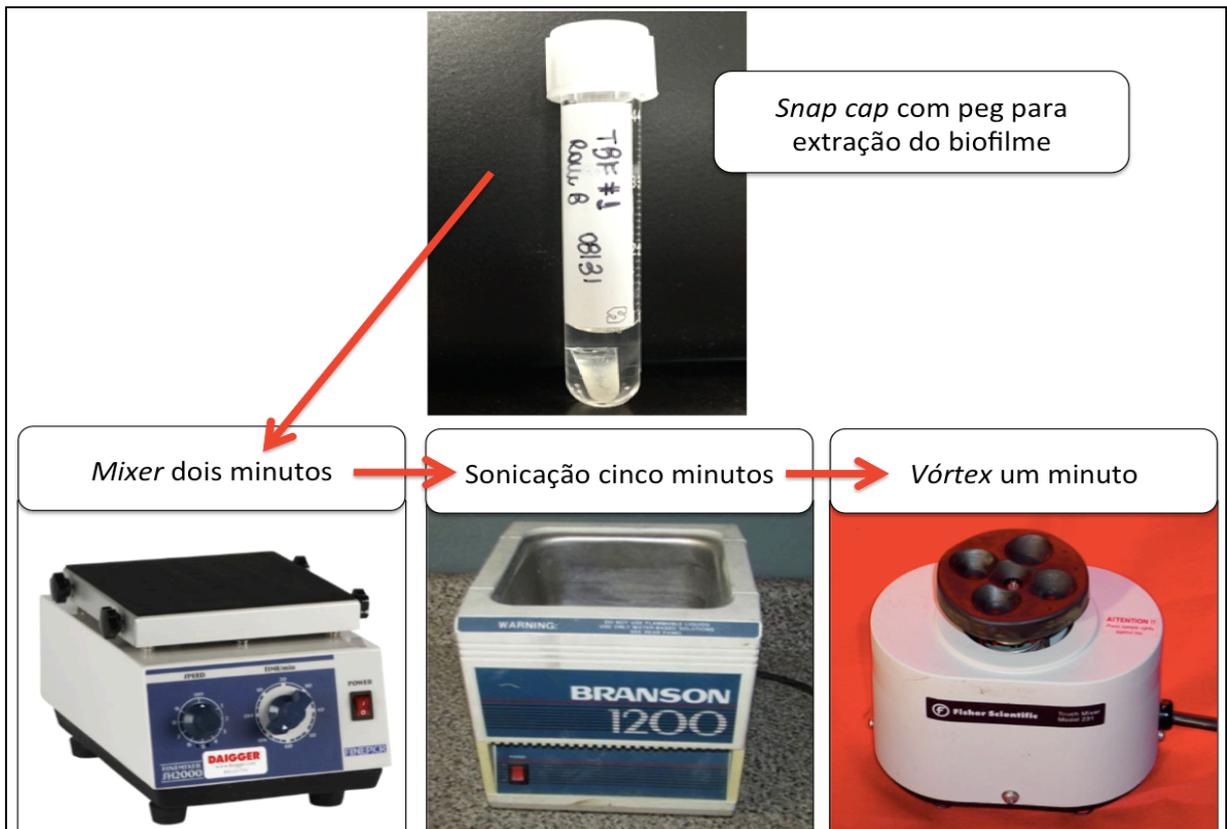


Figura 21: Processo de extração do biofilme para análise
Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center* e www.googleimagens.com.br (acesso em 04/03/2017)

4.8 EFICÁCIA DE EXTRAÇÃO DO BIOFILME EM MEBEC/PEGS

Após o desenvolvimento do biofilme nos *pegs*, foi testada a eficácia de cada um dos desinfetantes em remover o biofilme dos mesmos, procedimento necessário para checar se, realmente, os desinfetantes utilizados nesta pesquisa conseguiriam remover o biofilme do *pegs* com as extrações, utilizando *mixer*, ultrassônica e vórtex. Procedimento necessário, tendo em vista que os desinfetantes à base de aldeídos possuem a capacidade de fixar matéria orgânica nos PPS (PINEAU *et al.*, 2008a).

Para essa análise, utilizaram-se somente *pegs* com formação do TBF. A eficiência da extração do biofilme foi realizada por inspeção visual dos *pegs*, após tratamentos/extração e por peso (comparando o peso do *peg* sem presença de biofilme e com biofilme e, ainda, com biofilme submetido ao processamento na etapa de desinfecção).

Após a formação do biofilme descrita no tópico 4.5.1 (p.79) da metodologia, difere, apenas, em relação ao número de dias que foram cinco, pois, nesse momento, apresentou-se o TBF desenvolvido para análise de extração. Os *pegs* foram expostos, separadamente, aos três desinfetantes (de acordo com instruções do fabricante) em cinco amostras de *pegs* por produto. Posteriormente, os *pegs* foram removidos do MBEC com auxílio de pinça hemostáticas e colocados em tubos tipo *snap cap* com 1mL de água de osmose reversa esterilizada e submetidos ao processo de extração do biofilme dos *pegs*, *mixer* um minuto, ultrassônica por cinco minutos e vórtex por um minuto.

Como controle desse procedimento, utilizaram-se cinco amostras de *pegs* com TBF sem exposição aos desinfetantes e sem extração do biofilme (controle positivo sem extração) e cinco amostras de *pegs* com TBF sem exposição aos desinfetantes e com extração do biofilme (controle positivo com extração).

Finalizada a extração dos *pegs*, estes foram mantidos em cabine (Figura 22, p. 89) durante 12 horas em placas vazias forradas com papel alumínio para que os mesmos permanecessem secos para o procedimento de análise do peso e inspeção visual.



Figura 22: Demonstração, na cabine, de modo a impedir que a umidade interferisse na análise de peso.

Fonte: Registro da pesquisadora – Laboratório *St. Boniface Research Center*

No dia seguinte, realizou-se a análise visual dos *pegs* com auxílio de lupa (Figura 23), seguida da aferição do peso. Primeiramente, foram pesados em balança de gramas (Balança analítica de precisão digital, Denver Instrumentos S1-114, Colorado, U.S.A) os *pegs* extraídos do MBEC sem presença de biofilme, ou seja, o *peg* novo. Posteriormente, foram pesados os *pegs* expostos ao tratamento e aos controles.

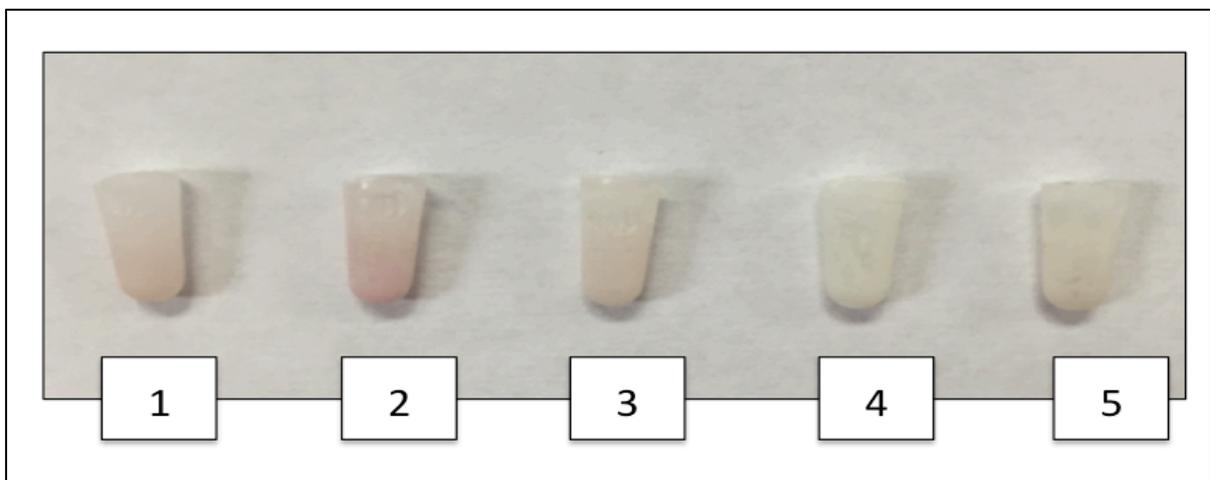


Figura 23: Inspeção visual dos *pegs*, após exposição e extração

Fonte: Registro da pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center*

Legenda: (1 – controle positivo sem extração, 2 – controle positivo com extração, 3 - biofilme exposto a DAN com GLUT, 4 – biofilme exposto a DAN com APH e 5 – biofilme exposto a DAN com OPA.

Para cálculo da porcentagem de extração do biofilme de cada desinfetante, foram analisados média e desvio padrão dos valores referentes às cinco amostras, depois foram realizados os cálculos demonstrados a seguir.