

$$\frac{(\text{Média TBF sem extração}) - (\text{Média TBF com extração})}{(\text{Média TBF sem extração})} \times 100\%$$

CÁLCULO: Nesse cálculo, verificou-se a média em porcentagem (%) da extração do biofilme em *pegs* com *mixer*, ultrassônica e vórtex (Controle para comparação posteriormente quando os *pegs* foram expostos ao tratamento de desinfetantes).

$$\frac{(\text{Média TBF sem extração}) - (\text{Média TBF exposto ao tratamento})}{(\text{Média TBF sem extração})} \times 100\%$$

CÁLCULO: Nesse cálculo, verificou-se a média em porcentagem (%) da extração do biofilme em *pegs* com *mixer*, ultrassônica e vórtex quando expostos separadamente a cada um dos tratamentos com desinfetantes.

4.9 CONTROLES

Selecionaram-se amostras para análise de cada controle tanto para o TBF quanto para o BBF, determinando cinco *pegs* para cada controle negativo e positivo. Definiram-se cinco amostras para alcançar maior acurácia dos resultados.

4.9.1 CONTROLE NEGATIVO

- **Pegs sem biofilme:** Cinco *pegs* expostos simultaneamente à formação do TBF e BBF, porém *pegs* sem adição de AST e bactérias, na ausência de biofilme.
- **Pegs sem biofilme submetidos aos detergentes:** Cinco *pegs* sem TBF e BBF foram expostos somente aos detergentes.
- **Pegs sem biofilme submetidos aos desinfetantes:** Cinco *pegs* sem TBF e BBF foram expostos somente aos desinfetantes.
- **Pegs sem biofilme submetidos ao processamento:** Cinco *pegs* sem TBF e BBF foram expostos a cada detergente e desinfetante isoladamente e para suas associações, simulando o processamento.

4.9.2 CONTROLE POSITIVO

- **Pegs com biofilme:** Cinco *pegs* expostos ao AST e bactérias e com presença de TBF e BBF.
- **Pegs com biofilme submetidos aos detergentes:** Cinco *pegs* com TBF e BBF foram expostos somente aos detergentes.
- **Pegs com presença de biofilme submetidos aos desinfetantes:** Cinco *pegs* com TBF e BBF foram expostos somente aos desinfetantes.

4.9.3 GRUPO TESTE

- **Pegs com presença de biofilme submetidos ao processamento:** Cinco *pegs* com TBF e BBF foram expostos a cada detergente e desinfetante isoladamente e para suas associações, simulando o processamento.

4.10 ANÁLISE DO BIOFILME

4.10.1 CONTAGEM BACTERIANA

No momento da análise do TBF e BBF, foi estabelecido um *benchmark*³ para contagem de bactérias, análise de proteína e carboidrato, correspondente à limpeza adequada para aparelhos de endoscopia, sendo adotadas aquelas propostas por Alfa, Degagne, Olson (1999). Estabeleceram-se valores adequados de limpeza manual para canais de endoscópios flexíveis: < 6,4 µg/cm² para proteína, 1,79 µg/cm² para carboidrato e < 4 log₁₀ UFC/ cm² para *bioburden*.

A contagem de bactérias recuperada após a extração do biofilme, foi realizada em diluições de 1:10 com PBS e posterior inoculação em placa de TSA. O limite de detecção para o ensaio de viabilidade foi de 10 UFC/peg. Após período de 24 horas de incubação das placas, as mesmas foram analisadas com auxílio de uma lupa para contagem exata de colônias presentes e viáveis.

³ *Benchmark* é um processo de comparação do desempenho entre dois ou mais sistemas (Dicionário online: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Benchmarking>)

4.10.2 ANÁLISE DE PROTEÍNA

Para as amostras de análise de proteína, utilizou-se o *kit* de ensaio QuantiPro BCA™ (Sigma, St Louis, Missouri), sendo que as amostras em tubos de *snap cap* foram mantidas em *freezers* em temperatura -16 °C por duas semanas até o momento da análise. No dia anterior à análise de proteínas, as amostras foram retiradas do *freezer* e mantidas em temperatura 4 – 8°C. No dia da análise, as amostras foram diluídas em água de osmose reversa esterilizada (diluição de 1:10) e realizadas triplicatas para melhor acurácia dos valores. Após diluição, as amostras foram adicionadas em poços com 96 espaços, de plástico e acessível para análise em espectrofotômetro. Simultaneamente, foram realizadas as amostras-padrão para comparação com as amostras analisadas. As amostras-padrão se originaram da curva de análise da quantidade de proteína, as quais foram realizadas com uso de albumina de soro bovino, um ensaio quantitativo com base em ácido bicinconínico (Sigma, St. Louis, MO).

Após completado todo o poço de amostras necessário para análise, as amostras-padrão foram adicionadas aos reagentes do *kit* de ensaio QuantiPro BCA™, e o poço com as amostras foi incubado em temperatura média de 56°C por uma hora (Figura 24, p. 93). Finalizado o período de incubação, esse poço com 96 espaços foi acoplado ao espectrofotômetro (*Spectrophotometer molecular devices Emax*) para análise da curva de proteína. O ensaio de proteína foi realizado de acordo com instruções do fabricante, e o limite de detecção foi de 0,5 µl /mL.

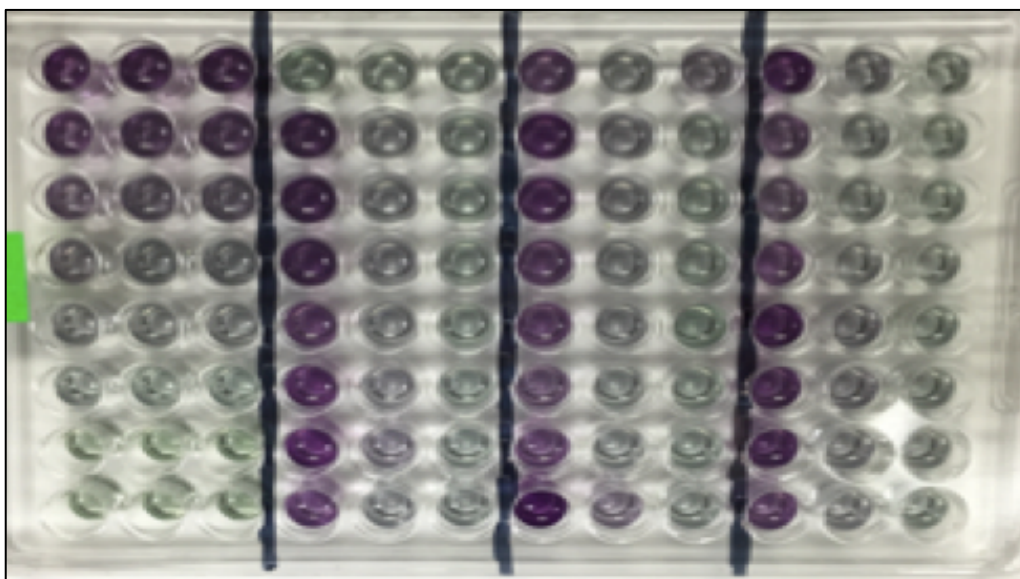


Figura 24: Poço com 96 espaços para análise de proteína, após adição de reagente e incubação. As três primeiras colunas são correspondentes às amostras-padrão para a formação da curva de proteína e para a leitura das demais amostras.

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

4.10.3 ANÁLISE DE CARBOIDRATO

As análises de carboidrato foram realizadas duas semanas após o experimento, seguindo as instruções de armazenamento das amostras de proteína e as recomendações de Liu *et al.*, 1994, “*Simple Technique for Estimation of biofilm accumulation*”.

Após diluição das amostras com água de osmose reversa esterilizada em diluição de 1:10, estas foram colocadas em triplicatas, em tubos de vidro longos, por 30 minutos, em temperatura ambiente, para adição dos reagentes, pois, os reagentes ácidos eram incompatíveis com os tubos de *snap cap* nos quais estavam armazenadas as amostras. O fenol 5% e ácido sulfúrico foram utilizados como reagentes para análise de carboidrato que, posteriormente, foram adicionados às amostras nos 96 espaços do poço. Como os reagentes para essa análise eram ácidos, utilizaram-se poços com 96 espaços de acrílico compatível com os mesmos, para não sofrer interferência.

A leitura da análise de carboidrato foi realizada por meio da curva para limite de detecção, constituída das amostras-padrão com glucose 1mg/mL (miligramas/mililitro), posteriormente comparadas com as amostras da pesquisa. Após adicionadas todas as amostras aos poços com 96 espaços de acrílico (Figura 25, p.

94), as mesmas foram analisadas em espectrofotômetro (*Spectrophotometer molecular devices Emax*). A leitura da quantidade de carboidrato foi realizada conforme instruções do fabricante, e o limite de detecção foi de 10 µl /mL.

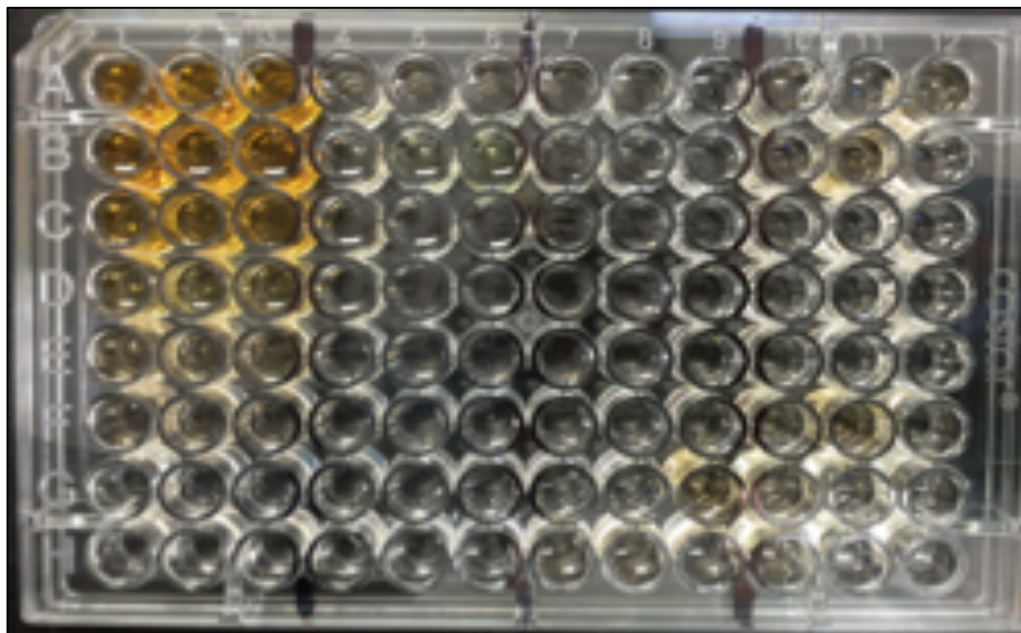


Figura 25: Poços de 96 espaços para análise de carboidrato, após adição de reagente/ácidos. As três primeiras colunas são correspondentes às amostras-padrão para a formação da curva de carboidrato e padrão para a leitura das demais amostras.

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

4.10.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As amostras foram preparadas para MEV, baseadas em Ren *et al.* (2013), sendo imersas em 2mL GLUT 2,6% Metricide™ (Sybron Canada, Oakville) para fixação do biofilme nos *pegs* e mantidas em geladeira com temperatura de 4°C durante duas horas. Em seguida, foram lavadas por três vezes com PBS, aguardaram-se 10 minutos entre uma lavagem outra e nesse período permaneceram com tampão. Em seguida, foram mantidas secas para análise em MEV (Cambridge Instruments STEREOSCAN 120) (EDAX GENESIS 4000 20.0 kv – kilovolt). Os testes foram realizados no laboratório *Biomedical Engineering Laboratory*, campus da Engenharia da *University of Manitoba*.

4.11 TESTE COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO

4.11.1 TESTE DOS DETERGENTES COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO

Realizaram-se os testes com bactérias em suspensão para controle dos detergentes e DAN na ativação com e sem neutralizantes. Ressalta-se que os desinfetantes realizam a eliminação de micro-organismos, exceto dos esporos bacterianos (AORN; 2017), e quando ficam resíduos desses desinfetantes, após a etapa de enxágue, os mesmos podem interferir no resultado da pesquisa. Então, para a análise da destruição e remoção dos biofilmes com associação dos DAN foi adicionado neutralizante, segundo Pineau e Phellippe (2013), para neutralizar os resíduos de desinfetantes que podem restar após o enxágue dos MBEC *pegs*.

Na análise de detergentes, não se utilizaram neutralizantes porque esses saneantes não possuem a capacidade de remover micro-organismos e sim matéria orgânica e carga microbiana (*biuborden*) e se restar resíduos, não interferem nos resultados de destruição e remoção dos biofilmes.

Para realização de testes de bactérias em suspensão, foram utilizados os mesmos micro-organismos para o desenvolvimento do TBF e BBF. Foi realizada a absorvância das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) em $8 \log_{10}$ UFC/mL e em seguida, procedeu-se à diluição para $4 \log_{10}$ UFC/mL com água de osmose reversa esterilizada. A quantidade de bactérias foi verificada por meio da cultura dos inóculos em placas TSA, seguida de diluições de 1:10 com PBS.

Após a verificação do crescimento em TSA das bactérias em suspensão, foram realizados testes para cada detergente (Quadro 05, p. 86) com bactérias em suspensão para comparar os dados da capacidade dos detergentes de eliminar bactérias em suspensão e a habilidade dos detergentes em destruir ou remover o TBF e o BBF. Para o controle positivo, utilizaram-se (1800µL de água de osmose reversa esterilizada + 200µL *mix* de bactérias), para o controle com neutralizante (900µL de cada detergente analisado + 900 µL neutralizante + 200µL *mix* de bactérias) e para o controle com água (900µL de cada detergente analisado + 900 µL água de osmose reversa esterilizada + 200µL *mix* de bactérias). A quantidade de 200µL de bactérias foi adicionada posteriormente aos *snap cap* e foi aguardado o tempo necessário de contato de cada detergente testado em temperatura

determinada pelo fabricante. Todos os testes foram repetidos em triplicata para os detergentes, *Prolystica* enzimático, *Prolystica* neutro, *Neodisher* e *Endozime*.

Após o tempo de ação dos detergentes com os componentes analisados, a quantificação da carga microbiana foi verificada por meio de cultura dos inóculos em placas TSA, seguida de diluições de 1:10 com PBS. As placas foram incubadas em temperatura de 35 a 39°C e submetidas à contagem de colônias após 24 horas.

4.11.2 TESTE DE NEUTRALIZANTE COM BACTÉRIAS EM SUSPENSÃO

O neutralizante usado nesse experimento foi preparado baseado em Pineau e Phellippe (2013). Para testar a eficácia do neutralizante, testou-se o mesmo com os diferentes desinfetantes utilizados nesta pesquisa (Quadro 05, p. 86), sendo que os desinfetantes foram diluídos 1:10. Foram adicionados, em tubos tipo *snap cap*, 900µL de cada desinfetante, separadamente, 900µL de neutralizante e, posteriormente, 200µL do *mix* de bactérias. Para controle positivo utilizou-se água de osmose reversa esterilizada com acréscimo do *mix* de bactérias e os DAN com acréscimo de bactéria. O tempo de exposição foi de 20 minutos em temperatura ambiente para o GLUT, 10 minutos para OPA e cinco minutos para APH conforme recomendação de cada fabricante.

Depois da exposição, as amostras foram plaqueadas da mesma forma que mencionadas no teste de detergente em bactérias em suspensão, e realizada contagem de bactérias de cada um dos experimentos após 24 horas de incubação, realizada em triplicata.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados primeiramente em planilha de *Excel*, calculados média e desvio padrão. Para determinar o valor de p ($p < 0.005$) e intervalo de confiança (IC 95%), foi utilizada análise de variância (ANOVA) em programa PRISM 6 (*Trial Prism 6*). Realizou-se a comparação da média e desvio padrão para contagem de bactérias, análise de proteína e carboidrato com os controles negativos e positivos mencionados nesta pesquisa.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão reportados em formato de artigos científicos, sendo que os mesmos já foram publicados em periódicos científicos mencionados abaixo.

5.1. ARTIGO 01

- Luciano, C. C; Olson, N; Tipple, A. F. V; Alfa, Michelle. *Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm.* **American Journal of Infection Control.** 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040> (Apêndice A)

5.2. ARTIGO 02

- Luciano, C. C; Olson, N; DeGagne, P; França, R; Tipple, A. F. V; Alfa, Michelle. *A new buildup biofilm model that mimics accumulation of material in flexible endoscope channels.* **Journal of Microbiological Methods.** 127, 224-229. 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.022> (Apêndice B)

5.1 ARTIGO 01 – AVALIAÇÃO DA HABILIDADE DE DIFERENTES DETERGENTES E DESINFETANTES NA DESTRUÇÃO E REMOÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NO BIOFILME TRADICIONAL

RESUMO

INTRODUÇÃO: O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de diferentes combinações de detergentes e desinfetantes para destruir e remover bactérias no biofilme tradicional. **MATERIAIS E MÉTODOS:** *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizadas para formação do biofilme tradicional durante oito dias. O biofilme tradicional foi desenvolvido em *Eradication Biofilm Minimum Concentration* (MBEC™) peg, contendo $8 \log_{10}$ UFC/cm² de ambas as bactérias. Avaliaram-se os detergentes: *Prolystica* enzimático, *Prolystica* Neutro, *Neodisher* e *Endozime*, e os desinfetantes de alto nível foram: GLUT, APH e OPA. A destruição e remoção do biofilme foram avaliada utilizando contagem de bactérias viáveis, quantificação de proteína e carboidratos, bem como MEV. **RESULTADOS:** Apenas *Prolystica* enzimático e *Endozime* removeram ambos *E. faecalis* ($3,90 \log_{10}$ UFC/mL), e *Pseudomonas aeruginosa* ($3,96 \log_{10}$ UFC/mL) em bactérias em suspensão. Nenhum dos detergentes testados removeu $> 1 \log_{10}$ UFC redução/cm² as bactérias no interior do biofilme. Nenhuma combinação de detergente e DAN reduziram a carga microbiana de *E. faecalis* e *P. aeruginosa* no interior de biofilme ($3-5 \log_{10}$ UFC/cm²). A combinação de *Endozime* e GLUT reduziram $6 \log_{10}$, porém não eliminaram as bactérias do biofilme. **CONCLUSÃO:** Os dados indicam que, se o biofilme tradicional acumular nos canais de endoscópio flexível durante ciclos repetidos de processamento, nem os detergentes nem DAN irão fornecer a eficiência esperada de destruição ou remoção bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: Endoscópios, Remoção de Biofilme, Limpeza e Desinfecção de Alto Nível.

INTRODUÇÃO:

Endoscópios flexíveis são amplamente utilizados para procedimentos diagnósticos e terapêuticos (RUTALA; WEBER, 2004; KOVALEVA; BUSS, 2012; FUSHIMI *et al.*, 2013). A endoscopia digestiva alta (EDA) é o padrão ouro mundial para o diagnóstico de câncer gástrico, úlcera gástrica, úlceras duodenais e problemas gastrointestinais. Endoscópios flexíveis são classificados como dispositivos semicríticos que entram em contato com mucosas ou pele não intacta e necessitam ser esterilizados ou receber, no mínimo, desinfecção de alto nível (DAN) (RUTALA; WEBER, 2004; SGNA, 2013).

Embora a esterilização à baixa temperatura com plasma tenha sido validada para alguns endoscópios flexíveis com *design* possuindo canais internos curtos, o

endoscópio flexível com canais longos (por exemplo, aqueles usados para procedimentos gastrointestinais) requer esterilização por óxido de etileno (ETO), que tem requisito de aeração prolongada (de 18 a 24 horas). O método mais utilizado para o processamento de endoscópio flexível é a limpeza (com detergente enzimático), seguida por DAN com um desinfetante químico líquido, enxágue, secagem e armazenagem (ALFA; HOWIE, 2009; SGNA, 2013).

O endoscópio flexível possui um *design* complexo com lúmens estreitos, contendo um *elevator* e fendas extremamente difíceis de limpar (KOVALEVA; BUSS, 2012). As alterações na integridade de superfícies dos endoscópios resultantes do uso frequente podem dificultar a remoção de material orgânico aderido e micro-organismos durante o processamento (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; SGNA; 2013). Os endoscópios flexíveis representam desafios para o controle de infecção, devido à sua complexidade e ao uso frequente e estreita margem de segurança durante o processamento (PHAC, 2010; SGNA; 2013; CSA, 2014). Um único endoscópio contaminado pode ser utilizado centenas de vezes por ano e pode ser potencial para transmitir micro-organismos causadores de infecção.

A superfície interna dos canais de endoscópios sofrem alterações devido à utilização repetida (cada endoscópio é utilizado durante cinco a 10 anos), e o risco de contaminação aumenta com a idade do endoscópio (LEE *et al.*, 2015). Relatórios recentes de micro-organismos multirresistentes (MMR), transmitidos por meio de duodenoscópios contaminados têm demonstrado elevada transmissão, bem como as taxas de infecção (EPSTEIN *et al.*, 2014; WENDORF *et al.*, 2015). Muitos destes estudos sugerem que a sobrevivência persistente de MMR em endoscópios flexíveis processados pode ser devido à formação de biofilme (KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2010; BRIDIER *et al.*, 2012; EPSTEIN *et al.*, 2014).

As bactérias que residem no biofilme são muitas vezes mais resistentes à inativação química do que as bactérias em suspensão (planctônicas), e isso pode afetar a eficiência da DAN (ALFA; HOWIE, 2009; PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004; HOWIE, 2009; KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2010; KOVALEVA; BUSS, 2012). Estima-se que 65% das infecções nosocomiais endógenas envolvem biofilmes (KOVALEVA; BUSS, 2012), entretanto taxas de infecções exógenas por biofilme em endoscópios flexíveis permanecem desconhecidas. A formação de biofilmes nos canais internos de endoscópio pode ser resultante de falha do processamento do endoscópio e é um fator importante no controle da transmissão

cruzada de patógenos em procedimentos de endoscopia (KOVALEVA; DEGENER; VAN DER MEI, 2010; BRIDIER *et al.*, 2012; EPSTEIN *et al.*, 2014). Relatos de surtos (EPSTEIN *et al.*, 2014; WENDORF *et al.*, 2015) levantaram algumas sugestões como, as instruções do fabricante para a limpeza e descontaminação podem ser incapazes de remover completamente ou eliminar biofilme. Existem dados limitados sobre o impacto de vários detergentes e DAN em biofilmes.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de quatro diferentes detergentes e três DAN que são, frequentemente, utilizados para o processamento do endoscópio, para destruir e remover micro-organismos presentes no biofilme tradicional.

MATERIAIS E MÉTODOS

DESAFIO ORGÂNICO: ARTIFICIAL SOLO TESTE E BACTÉRIAS

Neste estudo, utilizaram-se *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). As bactérias foram cultivadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA) com 5% de sangue de carneiro (Oxoid, Toronto, Canadá) a 35 - 39°C durante 24 horas, em condições aeróbias. Cada uma das bactérias foi suspensa e adicionada ao artificial solo teste (AST) (Artificial solo teste: patente US 6447990) para atingir aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL). A concentração AST + bactérias foi determinada utilizando diluições em série 1:10, em tampão fosfato salino esterilizado (PBS) e 0,1 mililitros (mL) de cada diluição inoculada em TSA. As placas inoculadas foram incubadas a 35 - 39°C em condições aeróbias durante 24 horas e, posteriormente, realizada a contagem das colônias.

MODELO DO BIOFILME USADO PARA A SIMULAÇÃO DO TESTE

Formou-se o biofilme revestido por hidroxiapatita por meio de MBEC™ biofilme (HA-MBEC™) *Inoculator* (Innovotech®, Edmonton, Alberta, Canadá) seguindo as instruções do fabricante (INNOVOTECH, 2012). Daqui por diante o HA-MBEC™ biofilme *Inoculator* será referido como HMBEC (Figura 01, p. 102).

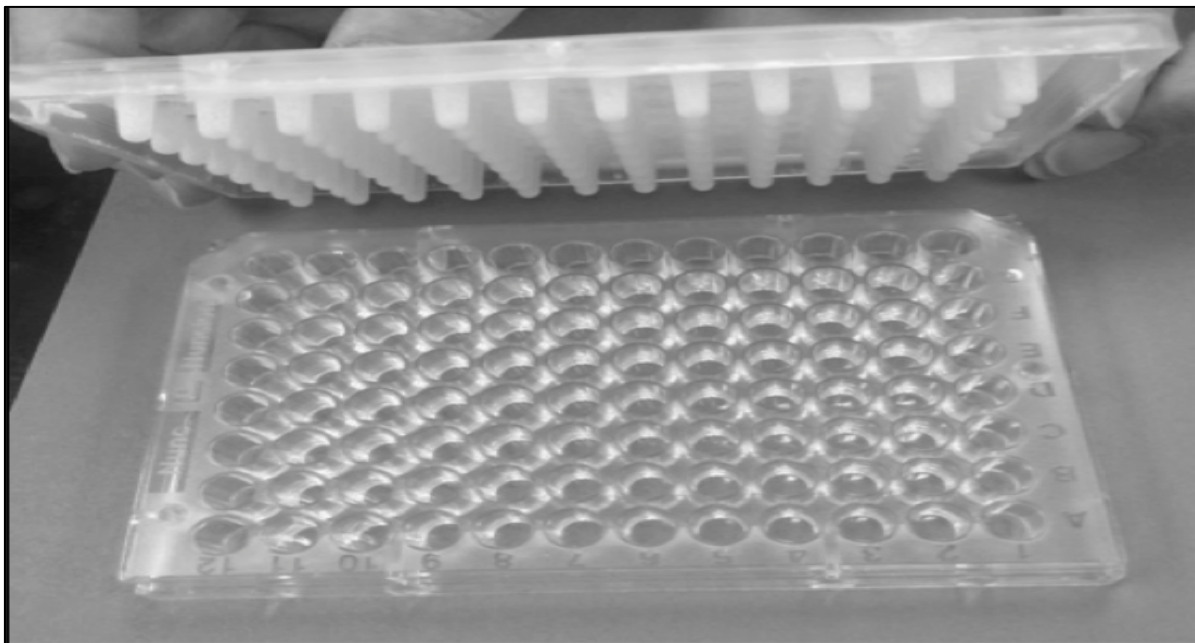


Figura 01: Modelo MBEC biofilme revestido de hidroxiapatita. A tampa tem 96 *pegs* idênticos de poliestireno que se encaixam em uma placa de microtitulação de 96 poços padrão. Cada poço é inoculado com meio de crescimento e micro-organismos, e a tampa é inserida dentro do líquido dentro das cavidades sobre os *pegs*. O biofilme é formado sobre os *pegs* por meio do movimento em uma *rocking table* em temperatura ambiente. O AST + bactérias foram renovados a cada 24-48 horas para garantir a constante replicação microbiana. Cada *peg* deve ser assepticamente removido para análise do biofilme.

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

EXTRAÇÃO DE HMBEC PEGS PARA ANÁLISE

Após execução do protocolo de desenvolvimento do biofilme em oito dias, removeram-se, assepticamente, os *pegs* individuais da tampa usando uma pinça hemostática esterilizada e colocados em tubos tipo *snap cap* esterilizados (*Simport*, Quebec, Canadá), contendo 500µL de neutralizador (Tween 80 (6% w / v), lecitina (0.6% w / v), tiossulfato de sódio (1,0% w / v) e L-histidina (0,2% w / v)), (15) e 500 µL de água estéril de osmose reversa. A suspensão foi misturada usando um *mixer* de balanço *Finemixer* Sh200 (Yangchun, Seul, Coreia), durante dois minutos, sonificada a 50/60 Hertz usando um *Bransonic* 1200 Ultrasonic (Branson Canadá, Pickering ON), durante cinco minutos e agitada em vórtex durante um minuto. Este é o procedimento de extração recomendado nas instruções do fabricante para utilização MBEC™. Em cada experiment, utilizaram-se cinco amostras de *pegs*.

TESTE DE DETERGENTES E DESINFETANTES

O uso de diluição, tempo de exposição e temperatura fornecidos pelos fabricantes de cada detergente e DAN estão listados no Quadro 01. Cada vez que um DAN foi utilizado a concentração de efeito mínimo (*minimal effect concentration* - MEC) foi avaliada por meio do teste recomendado pelo fabricante.

Quadro 01: Descrição dos detergentes e desinfetantes

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

GLUT - Glutaraldeído

AHP – Acelerador de peróxido de hidrogênio

OPA – Ortoftaldeído

DAN – Desinfetante de alto nível

D- Detergente

Fonte: Próprio autor

BENCHMARKS PARA LIMPEZA MANUAL ADEQUADA

Foram utilizados os valores de referência de limpeza manual dos canais de endoscópios flexíveis, estabelecidos por Alfa *et al* (ALFA, 2002). Para a limpeza manual adequada, $<6,4 \text{ mg/cm}^2$ de proteína, $<1,79 \text{ mg / cm}^2$ de carboidratos e $<4 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ de micro-organismos viáveis.

TESTE CONTROLE DE DETERGENTES E DESINFETANTES

TESTE DETERGENTE EM SUSPENSÃO

Utilizou-se o teste detergente em suspensão para comparar a capacidade de (Quadro 01, p. 103) destruir os micro-organismos em suspensão bacteriana com e sem neutralizante. O controle bacteriano para (detergente + água de osmose reversa) consistiu em um tubo tipo *snap cap* esterilizado, contendo 1800 μL de água de osmose reversa, sem adição de neutralizante e detergente. O controle bacteriano para (detergente + neutralizante) consiste em um tubo tipo *snap cap* esterilizado contendo 1800 μL de neutralizante (CERI *et al.*, 1999), sem adição de água de osmose reversa e detergente. Para o teste de detergentes, utilizou-se *snap cap* contendo 900 μL de cada detergente acrescidos de 900 μL de água de osmose reversa. Para o teste do neutralizador juntamente com os detergentes, utilizou-se *snap cap*, contendo 900 μL de cada detergente, acrescidos de 900 μL do neutralizador. Todos os *snap cap* permaneceram em posição estática à temperatura ambiente durante cinco minutos e, em seguida, 200 μL de $4 \log_{10} \text{ UFC/mL}$ das bactérias em suspensão foram adicionadas a cada tubo e incubadas por período e temperatura recomendados pelos fabricantes. Todos os testes foram realizados em triplicata.

TESTE DESINFETANTE EM SUSPENSÃO

Utilizou-se o teste de desinfetantes em suspensão para comparar a capacidade (Quadro 01, p. 103) para destruir os micro-organismos presentes na suspensão bacteriana com e sem neutralizante. A solução de neutralização foi preparada conforme descrito por Pineau e Phillippe (2013). Em cada desinfetante foi

diluído 1:10 e 900µL e adicionadas 900µL de neutralizante, em um tubo tipo *snap cap* esterilizado, seguido de incubação por cinco minutos. Em seguida, 200 µL da suspensão bacteriana foram adicionadas ($4 \log_{10}$ UFC/mL). O controle positivo apresentou água de osmose reversa ao invés do desinfetante e controle desinfetante tinha água de osmose reversa em substituição ao neutralizante. O tempo de exposição foi de 20 minutos a temperatura ambiente para o glutaraldeído, 10 minutos à temperatura ambiente para o OPA e cinco minutos à temperatura ambiente para o APH. Após o tempo de exposição recomendado, foi avaliada a viabilidade microbiana por meio da contagem de colônias nas placas de TSA.

EFICÁCIA DE EXTRAÇÃO DE BIOFILME EM HMBEC *PEGS*

Após o desenvolvimento do biofilme em oito dias nos HMBEC/*pegs*, verificou-se a eficácia da extração do biofilme nos *pegs* por meio de análise do peso dos mesmos. *Pegs* novos (sem biofilme) foram removidos e pesados. Cinco *pegs* com presença de biofilme (controle positivo) e cinco *pegs* sem biofilme (controle negativo) foram pré-pesados. Dos *pegs* sem biofilme, cinco foram expostos a cada DAN listado no Quadro 01, p. 103 e cinco *pegs* não foram expostos à DAN (estes são controles negativos). Em seguida, cinco *pegs* com biofilme foram expostos à DAN. Cada *peg* foi extraído usando o protocolo de extração descrito anteriormente, após o tempo e temperatura de exposição recomendados pelo fabricante. Todos os *pegs* foram removidos das tampas e, posteriormente, acondicionados na cabine para secar durante a noite com o intuito de garantir a completa secagem antes da determinação do peso seco.

Eficácia de extração foi calculada como:

$(X3 - X2) / (X1 - X2) \times 100$

Onde:

X1 = peso dos *pegs* secos com biofilme antes da extração

X2 = peso dos *pegs* secos sem biofilme

X3 = peso dos *pegs* com biofilme secos após extração

ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO DO *BIOBURDEN*

A quantificação do *bioburden* (carga microbiana) de bactérias viáveis na presença do biofilme foi realizada utilizando diluições em série 1:10 em PBS e posteriormente inoculada nas placas de TSA. O limite de detecção para o ensaio de viabilidade foi de 10 UFC/ *peg*.

ANÁLISE DE PROTEÍNA

As amostras coletadas foram armazenadas a -20°C e analisadas utilizando o *kit* de ensaio BCA QuantiPro™ (Sigma, St Louis, Missouri) no prazo de duas semanas após a coleta e armazenamento. Este *kit* incluiu amostras-padrão de proteína, albumina de soro bovino e um ensaio quantitativo com base em ácido bicinconínico (Sigma, St. Louis, MO). Realizou-se a análise de proteína conforme as instruções do fabricante e com limite de quantificação de 0,5 ng/mL.

ANÁLISE DE CARBOIDRATO

As amostras coletadas foram armazenadas a -20°C e analisadas para hidratos de carbono no período de duas semanas após a coleta e armazenamento. O ensaio de hidratos de carbono foi desenvolvido conforme padronizado por Liu *et al.* (1994). Realizou-se a análise de carboidrato conforme as instruções do fabricante e com limite de quantificação de 10 pg/mL.

CONVERSÃO DE RESULTADOS QUANTITATIVOS PARA HMBEC *PEGS*

A área de superfície dos HMBEC *pegs* inoculados foi de 0,46 cm² (fornecido pelo fabricante) (Innovotech, 2012). Todos os dados quantitativos foram convertidos de µg/cm² para Log₁₀ UFC/cm².

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV) os *pegs* com biofilme foram preparados por imersão em 2,6% de GLUT Metricide™ (Sybron Canadá, Oakville,

ON), mantendo fixação dos *pegs* nesta solução a 4°C durante 2 horas. Após a fixação, os *pegs* foram enxaguados com 2 mL PBS, 10 minutos por três vezes. O PBS foi removido, e os *pegs* desidratados por pulverização catódica revestida com ouro e examinada por um microscópio eletrônico de varredura (*Cambridge Instruments Stereoscan 120*) (EDAX GENESIS 4000), usando um detector SEI, com tensão de aceleração para todas as amostras de 20 kv e ampliações entre escala de 500 microns à escala de cinco microns. Na preparação das amostras para MEV, foi utilizado o método de fixação modificado de Ren *et al.* (2013).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inseridos em uma planilha de *Excel*, determinados a média e o desvio padrão e foram analisados por meio de variância (ANOVA), utilizando o programa *Graphpad PRISM 6* para comparar a média e o desvio padrão para contagem bacteriana, análise de proteína e carboidrato, após várias etapas do processamento.

RESULTADOS

O protocolo para analisar a eficácia da capacidade de remoção do biofilme no HMBEC *pegs* foi determinado, utilizando o peso dos *pegs* antes e depois da extração do biofilme. O Quadro 02, p. 108 mostra a eficácia de extração do biofilme que foi > 80% com e sem fixação com os desinfetantes.

Quadro 02: Eficácia da extração na remoção do biofilme tradicional em HMBEC *pegs*

Média – peso <i>pegs</i> /seco (gramas)*				
Tratamento do Biofilme Tradicional no HMBEC <i>pegs</i> antes da extração				
	Sem DAN:	GLUT	AHP	OPA
Controle Positivo (sem extração)	0.278	N/A	N/A	N/A
Controle Negativo (sem extração)	0.118	N/A	N/A	N/A
<i>Pegs</i> extraídos	0.117	0.118	0.147	0.118
% da remoção do biofilme	100	99.81	81.87	100

* Os dados representam a média de 5 amostras /*pegs*. Veja materiais e métodos e o protocolo de cálculos.

DAN – Desinfetante de alto nível, GLUT – Glutaraldeído, AHP – Acelerador de peróxido de hidrogênio e OPA - ortoftaldeído.

Fonte: Próprio autor

O impacto dos detergentes, neutralizantes e DAN sobre as bactérias em suspensão foi demonstrado no Quadro 03, p. 109. Os detergentes enzimáticos (D1 e D4) removeram *E. faecalis* e *P. aeruginosa* da suspensão, enquanto que os detergentes não enzimáticos (D2 e D3) não conseguiram remover as bactérias *E. faecalis* e *P. aeruginosa*. A capacidade do neutralizante de inativar os resíduos de DAN foi confirmada pelos dados no Quadro 03, p. 109. Para os DAN testados sem a adição de neutralizante a uma diluição de 1:10, houve viabilidade de *E. faecalis*, enquanto que *P. aeruginosa* foi mais suscetível aos DAN. O neutralizante foi adicionado a todas as amostras utilizadas para a contagem de bactérias viáveis, garantindo, assim, a não interferência dos resíduos de desinfetantes na sobrevivência bacteriana.

Quadro 03: Impacto dos detergentes, neutralizantes e desinfetantes de alto nível em bactérias em suspensão

Tratamento	<i>E. faecalis</i> * Média log ₁₀ UFC/mL (Desvio Padrão)	<i>P. aeruginosa</i> * Média log ₁₀ UFC/mL (Desvio Padrão)
Impacto dos detergentes, conforme uso/diluição em bactérias em suspensão		
Sem NEUT, Sem DET	3.90 (0.08)	3.96 (0.05)
Somente NEUT	4.13 (0.02)	2.46 (0.08)
D1	0 (0)	0 (0)
D1 & NEUT	4.05 (0.03)	4.83 (0.09)
D2	3.96 (0.01)	4.24 (0.06)
D2 & NEUT	4.04 (0.05)	4.34 (0.06)
D3	4.21 (0.06)	2.43 (0.15)
D3 & NEUT	3.95 (0.03)	3.91 (0.06)
D4	0 (0)	0 (0)
D4 & NEUT	3.83 (0.04)	3.82 (0.07)
Impacto dos neutralizantes e desinfetantes de alto nível em bactérias em suspensão		
Sem NEUT, Sem DAN	3.21 (0.04)	3.08 (0.06)
Somente NEUT	4.02 (0.06)	3.87 (0.11)
GLUT	0 (0)	0 (0)
GLUT & NEUT	4.17 (0.10)	1.98 (1.73)
AHP	2.66 (0.07)	0 (0)
AHP & NEUT	2.65 (0.06)	2.56 (0.08)
OPA	2.83 (0.26)	0 (0)
OPA & NEUT	3.02 (0.02)	2.37 (0.06)

* As bactérias em suspensão foram expostas aos detergentes testados, utilizando tempo, diluição e exposição recomendados pelo fabricante. A capacidade do neutralizante para proteger as bactérias em suspensão foi testada para cada desinfetante de alto nível numa diluição de concentração, recomendada pelo fabricante 1:10. Os valores listados no quadro como "0" representam < limite de detecção para análise da contagem bacteriana.

Nota: DET ou D - detergente, DAN – desinfetante de alto nível, NEUT – neutralizante, D1- Detergente *Prolystica* Enzimático, D2- Detergente *Prolystica* Neutro, D3- Detergente *Neodisher*, D4- Detergente *Endozime*, GLUT – Glutaraldeído, AHP – acelerador de peróxido de hidrogênio e OPA – Ortoftaldeído.

Fonte: Próprio autor

O impacto dos detergentes em exposição estática sobre a matriz orgânica do biofilme foi avaliado por meio de MEV (Figura 02, p. 110). A análise da MEV não apresentou um impacto significativo na carga microbiana quando associada à exposição dos detergentes em *pegs* contendo biofilme. O efeito associado de exposição de detergente seguido de exposição DAN sobre o biofilme são demonstrados no Quadro 04, p. 111.

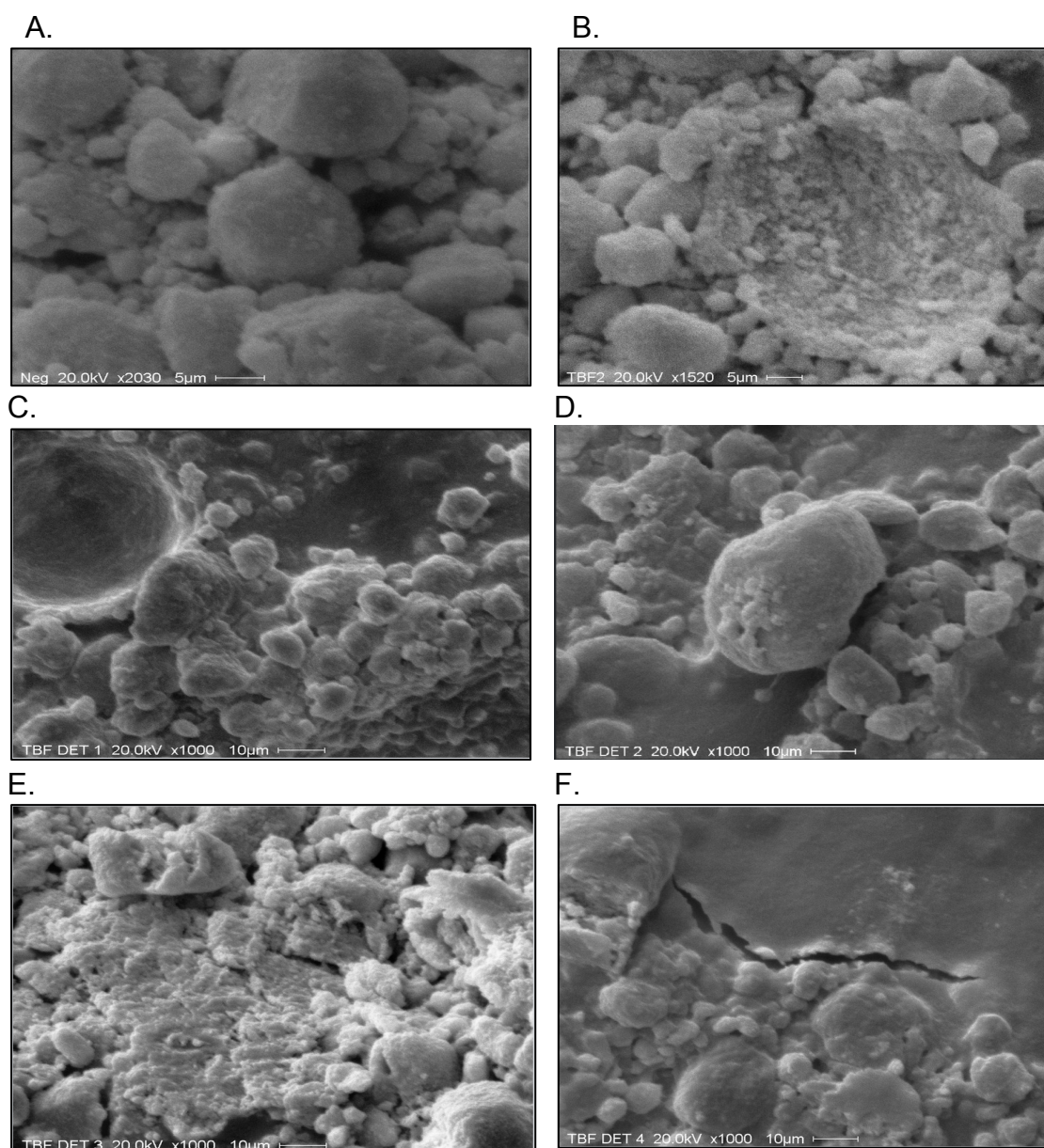


Figura 02: MEV do biofilme tradicional em HMBEC *pegs* revestidos com hidroxiapatita após a exposição estática de vários detergentes. O (A) HMBEC *peg* sem biofilme mostra o revestimento hidroxiapatita e (B) controle positivo mostra biofilme no *peg*. (C) exposição estática de biofilme para *Prolystica* enzimática, (D) *Prolystica* Neutro, (E) *Neodisher*, e (F) *Endozime* mostrou pouco efeito dos detergentes no biofilme tradicional.

FONTE: Registro da Pesquisadora - Laboratório *St. Boniface Research Center*

Quadro 04: Impacto de vários detergentes e tratamentos de desinfetantes de alto nível na viabilidade de bactérias dentro do biofilme tradicional em HMBEC *pegs*

Tratamento	<i>E. faecalis</i> * Média log ₁₀ UFC/cm ² (Desvio Padrão)	<i>P. aeruginosa</i> * Média log ₁₀ UFC/cm ² (Desvio Padrão)
Controle de Biofilme (sem DET e sem DAN)	8.11 (0.56)	8.56 (0.51)
Glutaraldeído utilizado para desinfecção de alto nível		
Somente GLUT	4.21 (0.42)	3.29 (0.47)
D1 & GLUT	3.04 (0.62)	1.03 (0.87)
D2 & GLUT	3.93 (0.89)	1.40 (1.67)
D3 & GLUT	3.73 (0.47)	2.76 (1.99)
D4 & GLUT	1.09 (1.26)	0 (0)
Acelerador Peróxido de Hidrogênio utilizado para desinfecção de alto nível		
Somente APH	4.34 (0.25)	2.79 (1.69)
D1 & APH	4.65 (0.04)	3.98 (0.45)
D2 & APH	4.56 (0.12)	2.88 (1.73)
D3 & APH	5.57 (0.08)	4.82 (0.44)
D4 & APH	5.43 (0.06)	4.66 (0.62)
Ortoftaldeído utilizado para desinfecção de alto nível		
Somente OPA	3.30 (1.32)	3.32 (1.33)
D1 & OPA	2.11 (1.22)	2.11 (1.21)
D2 & OPA	3.12 (0.43)	3.04 (0.38)
D3 & OPA	2.90 (0.56)	2.70 (0.47)
D4 & OPA	3.30 (0.75)	3.54 (0.74)

* Cada HMBEC *peg* contendo biofilme foi exposto a detergente, enxaguado, em seguida, exposto a DAN no tempo, diluição e exposição recomendados pelo fabricante dos detergentes e DAN (ver Materiais e Métodos) e, em seguida, enxaguado. Os controles negativos não apresentaram bactérias detectáveis. Em comparação com o controle de biofilmes houve uma redução significativa em todas as contagens bacterianas (isto é, $p < 0,05$) para todas as combinações de detergentes e desinfetantes de alto nível. Os valores listados no quadro como "0" representam <limite de detecção para o ensaio de contagem viável.

Nota: DET- detergente, DAN – desinfetante de alto nível, D1- Detergente *Prolystica* Enzimático, D2- Detergente *Prolystica* Neutro, D3- Detergente *Neodisher*, D4- Detergente *Endozime*, GLUT – Glutaraldeído, APH – acelerador de peróxido de hidrogênio e OPA – Ortoftaldeído.

Fonte: Próprio autor

O biofilme presente HMBEC *pegs*, após o tratamento de detergente e DAN, foi analisado para determinar a quantidade residual de proteína e carboidrato (Quadro 05, p. 112).

Quadro 05: Resíduos de proteína e carboidrato em HMBEC *pegs*, depois da exposição aos detergentes e desinfetantes de alto nível¹

Resíduos de proteínas e carboidratos: média µg/cm ² (desvio padrão)				
Análise	Sem DAN	GLUT	AHP	OPA
Controle Positivo - sem detergente				
Proteína	108.64 (37.14)	N/A	N/A	N/A
Carboidrato	87.23 (39.83)	N/A	N/A	N/A
Controle Negativo - sem biofilme e sem detergente				
Proteína	9.90 (1.78)	N/A	N/A	N/A
Carboidrato	39 (23.55)	N/A	N/A	N/A
D1				
Proteína	89.52 (38.50)	39.37 (7.69)	32.00 (37.69)	72.49 (21.75)
Carboidrato	80.49 (31.89)	< LD	< LD	< LD
D2				
Proteína	83.90 (32.76)	66.44 (25.30)	43.27 (38.49)	45.22 (29.98)
Carboidrato	85.17 (47.07)	1.16 (11.98)	0.97 (5.70)	< LD
D3				
Proteína	85.28 (57.39)	41.88 (13.73)	33.36 (10.35)	36.09 (9.53)
Carboidrato	76.92 (31.98)	1.50 (1.89)	9.03 (10.53)	< LD
D4				
Proteína	157.43 (23.46)	104.56 (33.74)	48.61 (36.64)	59.59 (25.02)
Carboidrato	83.53 (58.57)	7.09 (4.44)	1.15 (1.70)	< LD

¹ Dados de proteínas e de carboidratos residuais representam a média de cinco réplicas, nas quais os resultados para os controles negativos foram subtraídos do teste de biofilme e resultados do controle positivo. Todos os testes de carboidrato pós-desinfecção de alto nível foram significativamente reduzidos (exceto para D3 com o AHP e D2, D3 e D4 com GLUT) em comparação com o controle positivo (isto é, $p < 0,05$).

Nota: DAN – desinfetante de alto nível, D1- Detergente *Prolystica* Enzimático, D2- Detergente *Prolystica* Neutro, D3- Detergente *Neodisher*, D4- Detergente *Endozime*, GLUT – Glutaraldeído, AHP – acelerador de peróxido de hidrogênio e OPA – Ortoftaldeído.

Fonte: Próprio autor

DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, objetivou-se verificar a eficácia dos detergentes sobre as bactérias em suspensão, e os resultados demonstraram que alguns dos detergentes enzimáticos foram, significativamente, mais eficazes para destruir as bactérias em suspensão comparados com os detergentes não enzimáticos. Os

dados do presente estudo diferem do estudo de Zühlsdorf *et al.* (2002) os quais relataram nenhuma capacidade de destruir bactérias dos nove detergentes avaliados (seis enzimático e três não enzimáticos). Os dados publicados sobre inativação bacteriana por detergentes enfatizam a importância de aprimorar a formulação do detergente usado para o processamento de produtos para saúde (PPS), independentemente de se tratar de detergente enzimático ou não enzimático.

Há controvérsia quanto ao fato de que os detergentes enzimáticos ou não enzimáticos serem mais eficazes para a limpeza dos PPS quando o biofilme já está formado. Fang *et al.* (2010) e Vickery *et al.* (2004; 2009) demonstraram que os detergentes não enzimáticos foram mais eficazes do que os detergentes enzimáticos para a remoção de *E.coli* e *P. aeruginosa* presentes no biofilme. Os dados desta pesquisa diferem dos resultados dos estudos citados anteriormente. Nenhum dos detergentes enzimáticos e não enzimáticos avaliados apresentaram capacidade de destruir ou remover *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, no modelo HMBEC biofilme. É possível que estes resultados estejam diferentes ou discordem de estudos anteriores por causa da constituição do HMBEC que possui hidroxiapatita sobre os *pegs*, podendo, assim, dificultar a permeabilidade dos detergentes e desinfetantes no biofilme. Outra alternativa para estes resultados pode estar relacionada ao uso do neutralizante para a extração da amostra, enquanto que, no estudo de Fang *et al.* (2010) e Vickery *et al.* (2004; 2009), não utilizaram neutralizadores.

Blog e Kampf (2004), ao contrário de Vickery *et al.* (2004; 2009) relataram que o detergente enzimático (*Endozyme*) removeu 69% do biofilme enquanto que os não enzimáticos testados eram ineficazes. Não ficou evidenciado se *Endozyme* abordado na pesquisa de Blog e Kampf (2004), é o mesmo detergente *Endozime* (D4) que foi utilizado neste estudo. Os dados desta pesquisa para *Endozime* mostraram mais eficazes para remover *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em bactérias em suspensão, mas não eliminou micro-organismos da matriz do biofilme. No entanto, quando D4 foi associado com o DAN glutaraldeído, apresentou uma redução significativa de *E. faecalis* e de *P. aeruginosa*. Isso sugeriu que o detergente utilizado na presença do biofilme permitiu que o GLUT penetrasse melhor e eliminasse as bactérias do interior da matriz do biofilme. Este efeito combinado *Endozime* - DAN não foi observado com os outros desinfetantes testados, somente com o reportado.

Os resultados mostraram que a presença significativa de carga bacteriana no interior do biofilme e a redução de 6 log₁₀ esperada pelos desinfetantes raramente foram alcançadas, e que, frequentemente, havia 1 a 4 log₁₀ bactérias remanescentes após exposição aos detergentes e com associação dos desinfetantes. Esta falha na remoção bacteriana de 6 log₁₀ no biofilme por DAN pode explicar a persistência e acumulação gradual de biofilme em canais de endoscópio flexível que é processado repetidamente (PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004). Os dados indicam ou reforçam a necessidade de validação do processamento da limpeza, na desinfecção dos endoscópios para análises de presença de biofilme nos canais, devido à associação a atuais surtos de infecção.

Independentemente de como o biofilme se desenvolve no interior dos dispositivos médicos utilizados, é necessário utilizar neutralizante para garantir que resíduos de detergentes e desinfetantes sejam neutralizados, caso contrário, as bactérias na matriz do biofilme podem não ser detectáveis por cultura. Os dados obtidos por Parker *et al.* (2014) mostraram que a adição de neutralizante foi necessária para realizar a cultura de biofilme em modelo MBEC. Além disso, demonstraram que neutralizante D-E caldo oxidante e compostos quaternários possuem forma muito eficaz, diferentes dos fenólicos em altas concentrações. Enfatiza-se, assim, a importância da escolha adequada do neutralizante. Li *et al.* (2014) revisaram o conceito de micro-organismos viáveis, mas não cultiváveis (VBNC- *Viable but non-culturable cells*) presentes no biofilme. Tais bactérias viáveis, mas não cultiváveis podem apresentar momentos de viabilidade, porém esse momento e o crescimento destas bactérias ainda não são bem compreendidos (LI *et al.*, 2014). Muitos estudos abordam o processo de desinfecção em biofilme, contudo não abordam esse aspecto (LIU *et al.*, 1994; ZÜHLSDORF *et al.*, 2002; VICKERY *et al.*, 2004; 2009), enquanto que, neste estudo, a extração do biofilme foi realizada com solução neutralizante antes da cultura viável.

Acredita-se que à adição de neutralizante pode explicar a sobrevivência bacteriana após a desinfecção, pois o neutralizante agiu sobre os resíduos dos desinfetantes e sobre as bactérias viáveis, mas não cultiváveis. Tal como proposto por Espigares *et al.* (2003), a escolha de um neutralizante efetivo é complexa e a combinação de produtos químicos é mais eficiente do que um único neutralizante químico. Além disso, a proteção do neutralizante sobre resíduos de desinfetantes varia entre espécies bacterianas. Estudos desenvolvidos por Espigares *et al.* (2003)

demonstram que *E. faecalis* foi menos afetada pelos desinfetantes em comparação com *P. aeruginosa*. Portanto, o efeito do neutralizador foi mais evidente para *P. aeruginosa*.

MEV é uma ferramenta valiosa para avaliar a remoção do biofilme por detergentes e desinfetantes (VICKERY *et al.*, 2009; WALKER *et al.*, 2007; HADI *et al.*, 2010). No entanto, verificou-se que quando foram usadas HMBEC *pegs*, foi difícil analisar por MEV o biofilme formado, porque o revestimento de hidroxiapatita resultou em uma superfície irregular, semelhante a cascalhos, tornando-se difícil diferenciar a presença do biofilme. Métodos de microscopia alternativa denominados *live-dead* foram utilizados por vários outros pesquisadores (SMITH; HUNTER, 2008; SHEN *et al.*, 2010; NANCE *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2015), podendo ser mais adequado para o modelo MBEC-hidroxiapatita.

Observa-se que a análise de carboidratos teve bons resultados para amostras de biofilme que não foram expostas aos desinfetantes, entretanto não apresentou resultados satisfatórios quando as amostras extraídas foram expostas aos desinfetantes (Quadro 01). A análise de proteína não demonstrou ser afetada após a exposição aos desinfetantes. Acredita-se que os desinfetantes interferiram nos produtos de reatividade utilizados para a análise de carboidrato. A partir dos resultados de proteínas é evidente que a exposição estática de detergentes sobre os biofilmes não proporcionou uma limpeza adequada, pois os níveis de proteína pós-exposição ao detergente ultrapassaram o ponto de corte de 6,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ correspondente a uma limpeza adequada. Isso enfatiza a necessidade de atrito (remoção mecânica), durante a limpeza para ajudar na remoção de proteínas.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo enfatizam que as instituições de saúde que atuam com o processamento de endoscópios flexíveis precisam garantir a limpeza meticulosa dos canais de endoscópios e armazenamento seco para evitar o desenvolvimento de biofilme. Após a formação do consórcio microbiano, os detergentes e desinfetantes utilizados na limpeza e desinfecção não foram eficazes na redução bacteriana. Além disso, os dados suportam o uso de neutralizantes em amostras de endoscópio para garantir a proteção de danos aos micro-organismos e reduzir o risco de culturas falso-negativo de endoscópio.

REFERÊNCIAS

Alfa MJ. Artificial Test Soil, US patent # 6,447,990; issue date; Sept 10, 2002.

Alfa MJ, DeGagne P, Olson N. Worse-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. *Am J Infect Control*. 1999; 27:392 - 401.

Alfa MJ, Howie R. Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. *BMC Infect Dis*. 2009; 9: 1 - 14.

Blog R, Kampf G. Test models to determine cleaning efficacy with different types of bioburden and its clinical correlation. *J Hosp Infect*. 2004; 56: 544 - 8.

Bridier A, Sanchez-Vizuite M.D.P, Le Coq D *et al*. Biofilms of *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoS ONE*. 2012; 7: e 44506.

CSA. (Canadian Standards Association). Decontamination of reusable medical devices. Ottawa, ON: Canadian Standards Association; 2014.

Carvalho F.G, Puppim-Rontani R.M, Fucio S.B.P *et al*. Analysis by confocal laser scanning microscopy of the MDPB bactericidal effect on *S. mutans* biofilm CLSM analysis of MDPB bactericidal effect on biofilm. *J Appl Oral Sci*. 2012; 1: 568 - 75.

Ceri H, Olson M.E, Stremick C *et al*. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotics susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1771 - 6.

Epstein L, Hunter J.C, Arwady A *et al*. New Delhi metallo- β -Lactamase-producing carbapenem-resistant *Escherichia coli* associated with exposure to

duodenoscopes. JAMA. 2014; 312: 1447 - 55.

Espigares E, Bueno A, Fernández-Crechuet M *et al.* Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. J Hosp Infect. 2003; 55: 137 - 40.

Fang Y, Shen Z, Li L *et al.* A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. World J Gastroenterol. 2010;16: 1019 - 24.

Fushimi R, Takashima M, Yoshikawa H *et al.* Comparison of adenosine triphosphate, microbiological load, and residual protein as indicators for assessing the cleanliness of flexible gastrointestinal endoscope. Am J Infect Control. 2013; 41: 161 - 4.

Hadi R, Vickery K, Deva A *et al.* Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. Am J Infect Control. 2010; 74: 160 - 7.

Hu H, Johani K, Gosbell I.B *et al.* Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. J Hosp Infect. 2015; 91: 35 - 44.

Innovotech. MBEC Assay. For High – Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. Procedural Manual. Version 1.0. 2012.

Kovaleva J, Buss A. Usefulness of bacteriological monitoring of endoscope reprocessing. Ther Gastrointest Endosc. 2012; 9: 141 - 62.

Lee D.H, Kim D.B, Kim H.Y *et al.* Increasing potential risks of contamination from repetitive use of endoscope. Am J Infect Control. 2015;43:e1-5.

Li L, Mendis N, Trigui H *et al.* The importance of the viable but non-culturable

state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014; 5: 258.

Liu D, Lau Y.L, Chau Y.K *et al.* Simple technique for estimation of biofilm accumulation. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1994; 53: 913 - 8.

Nance W.C, Dowd S.E, Samarian D *et al.* A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 2550 - 60.

Pajkos A, Vickery K, Cossart Y. Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *J Hosp Infect.* 2004; 58: 224 - 9.

Parker A.E, Walker D.K, Goeres D.M *et al.* Ruggedness and reproducibility of the MBEC biofilm disinfectant efficacy test. *J Microbiol Methods.* 2014; 102: 55 - 64.

Pineau L, Phellippe E.D. Evaluation of endoscope cleanliness after reprocessing: a clinical-use study. *Cent Serv.* 2013; 1: 22 - 7.

PHAC (Public Health Agency of Canada). Infection prevention and control guideline for flexible gastrointestinal endoscopy and flexible bronchoscopy. Public Health Agency of Canada; 2010. Disponível em: www.phac.aspc.gc.ca/nois-sinp/guide/endo/index-eng.php

Ren W, Sheng X, Huang X *et al.* Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. *Am J Infect Control.* 2013; 41: e 89 - 92.

Rutala W.A, Weber D.J. Reprocessing endoscopes: United States perspective. *J Hosp Infect.* 2004; 56: 527 - 39.

Shen Y, Stojcic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized

biofilms: comparison of viability staining and direct culture. J Endod. 2010; 26: 1820 - 3.

Smith K, Hunter I.S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drugs resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008; 57: 966 - 73.

SGNA (Society of Gastroenterology Nurses and Associates). Standards of infection control in reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. Gastroenterol Nurs. 2013; 36: 293 - 303.

Vickery K, Pajkos A, Cossart Y. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. Am J Infect Control. 2004; 32: 170 - 6.

Vickery K, Ngo Q.D, Zou J *et al*. The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscopes tubing. Am J Infect Control. 2009; 37: 470 - 5.

Walker S.L, Fourgialakis; M, Cerezo; B. *et al*. Removal of microbial biofilms from dispense equipment: the effect of enzymatic pre-digestion and detergent treatment. J Inst Brew. 2007; 113: 61 - 6.

Wendorf K.A, Kay M, Baliga; C. *et al*. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography-associated AmpC *Escherichia coli* outbreak. Infect Control Hosp Epidemiol. 2015; 36: 634 - 42.

Zühlsdorf B, Emmrich M.H, Floss A. *et al*. Cleaning efficacy of nine different cleaners in a washer-disinfector designed for flexible endoscopes. J Hosp Infect. 2002; 52: 206 - 11.

5.2 ARTIGO 02 – NOVO MODELO DE BIOFILME *BUILDUP* SIMULANDO A ACUMULAÇÃO DE MATERIAL NOS CANAIS DE ENDOSCÓPIO FLEXÍVEL

RESUMO:

OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi desenvolver um novo modelo de acumulação de biofilme (BBF), baseado em exposição repetida de solo teste contendo *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* por meio de ciclos repetidos de fixação para simular a acumulação do material de pacientes em canais de endoscópio durante o processamento. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O novo modelo BBF é uma adaptação da concentração mínima eficaz do biofilme (MBEC) modelo de 96 espaços nas quais o biofilme é formado sobre *pegs* de plástico. O novo modelo MBEC-BBF foi desenvolvido ao longo de oito dias e incluiu quatro etapas de fixação parcial usando GLUT. Atingiram-se $6,14 \log_{10}$ UFC/cm² de *E. faecalis* e $7,71 \log_{10}$ UFC/cm² de *P. aeruginosa* no BBF final. Quatro detergentes (dois enzimáticos e dois não enzimáticos) foram testados isoladamente e em combinação com o GLUT, OPA e APH para determinar se bactérias no interior do BBF poderiam ser inativadas ou removidas. **RESULTADOS:** Nenhum dos detergentes testados conseguiu remover o biofilme ou reduzir o nível de bactérias no BBF, conforme determinado pela contagem viável e MEV. A combinação de detergentes e desinfetantes testada proporcionou uma redução de 3 a 5 $\log_{10}$ em bactérias viáveis, mas nenhuma combinação proporcionou a redução esperada de 6 $\log_{10}$. **CONCLUSÃO:** Os dados indicam que uma vez formado o BBF é extremamente difícil a eliminação. Pesquisas futuras utilizando o modelo BBF podem ajudar a desenvolver novos métodos de limpeza e desinfecção que consigam prevenir ou eliminar o BBF do interior dos canais do endoscópio.

Palavras-chave: Canais de Endoscópios, Biofilme *Buildup*, Limpeza e Desinfecção.

1 INTRODUÇÃO

Endoscópios gastrointestinais flexíveis (EGF) são usados para procedimentos terapêuticos e para fins de diagnóstico, incluindo visualização e coleta de amostras (PHAC, 2010; AAMI, 2015). Endoscopia é a uma técnica clínica que continua a expandir e o número de procedimentos tem aumentado consideravelmente (KOVALEVA; BUSS, 2012). No geral, a prevalência de infecção por transferência de agentes infecciosos em endoscópios contaminados é baixa, mas publicações recentes têm demonstrado que estas taxas podem ser maiores, devido ao negligenciamento ou documentação destes eventos (OFSTEAD *et al.*, 2010). Nos últimos anos, há relatos de surtos documentados, mundialmente, por endoscópios flexíveis contaminados com organismos resistentes a antibióticos (AUMERAN *et al.*, 2012; CARBONNE *et al.*, 2010), além de surtos nos EUA atribuídos à transmissão

de Enterobáctérias carbapenem resistente decorrentes de procedimentos de endoscopia retrograda por colangiopancreatografia (ERCP) (WENDORF *et al.*, 2015, UBHAYAWARDANA *et al.*, 2013; EPSTEIN *et al.*, 2014). Tem sido difícil compreender a sobrevivência de micro-organismos documentada em endoscópios flexíveis, porque, mesmo com ciclos repetidos de processamento usando limpeza e desinfecção validada pelos fabricantes, tem ocorrido o desenvolvimento do biofilme.

Processamento de endoscópios flexíveis engloba a limpeza detalhada, seguida de desinfecção de alto nível (DAN) ou esterilização com posterior secagem antes do armazenamento (PINEAU *et al.*, 2008). A maioria dos endoscópios flexíveis contemporâneos não pode ser esterilizada termicamente, e tem canais internos estreitos que são difíceis de limpar e desinfetar (KOVALEVA *et al.*, 2010; RUTALA; WEBER, 2013, SGNA, 2013; FUSHIMI *et al.*, 2013). Matéria orgânica residual nos canais de endoscópios inativa a ação dos DAN e alguns desinfetantes tais como, glutaraldeído e álcool fixam proteína, criando, assim, uma barreira física da proteína desnaturada que pode proteger os micro-organismos de subsequente DAN (GESA, 2011).

O desenvolvimento do biofilme é um problema importante no meio ambiente, tais como, tubos de água, estações de tratamento, implantes médicos e uma variedade de outros processos infecciosos (MARION *et al.*, 2006, COSTERTON 1999, COSTERTON *et al.*, 1999, DOLAN, COSTERTON 2001, OISON *et al.*, 2002; ZHONG *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2010; KOVALEVA *et al.*, 2010; BRIDIER *et al.*, 2012; ROBERTS, 2013; GÖKÇEN *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2013). A acumulação de matéria orgânica e micro-organismos em endoscópios flexíveis é provavelmente resultado de vários ciclos de limpeza e desinfecção, além da vida útil dos instrumentos (ALFA; HOWIE, 2009, PAJKOS; VICKERY; COSSART, 2004). O material orgânico denominado *buildup* é formado por múltiplos ciclos de processamento, diferente do desenvolvimento do biofilme tradicional que se desenvolve após constante hidratação (ZHONG *et al.*, 2009). No passado PAJKOS; VICKERY; COSSART (2004) advertiram sobre pequenas falhas no protocolo do processamento que poderiam resultar em acúmulo de material no interior do endoscópio e propiciar o desenvolvimento de biofilme. Devido ao reconhecimento da formação do biofilme *buildup* nos canais estreitos dos endoscópios, as investigações têm focado no aprimoramento de métodos para avaliar procedimentos eficazes para eliminar o biofilme nos canais de endoscópios flexíveis.

O modelo de *minimum biofilm eradication concentration* (MBEC) foi desenvolvido por CERI *et al* (1999) para padronizar teste de suscetibilidade das bactérias presentes no biofilme, frente aos antimicrobianos, buscando formas mais representativas na terapêutica de combate frente aos surtos de infecções, causados por organismos no interior do biofilme. O MBEC permite a formação de biofilme em *pegs*, acoplados em 96 poços, admite o teste de diferentes agentes ou antimicrobianos usando uma pequena "amostra" (CERI *et al.*, 1999, ALFA, HOWIE; 2009a, 2009b; LAPLANTE, MERMEL; 2009; KOVALEVA *et al.*, 2010; BRIDIER *et al.*, 2011; CORAÇA-HUBER *et al.*, 2012; TAKEI *et al.*, 2013; ABBANAT *et al.*, 2014; PARKER *et al.*, 2014; LAVERTY *et al.*, 2015). Recentemente, o método MBEC foi validado para testar a suscetibilidade aos antibióticos em micro-organismos presentes no biofilme (PARKER *et al.*, 2014).

Alfa e Howie (2009a, 2009b) desenvolveram uma adaptação do biofilme *buildup* (BBF) em MBEC, por meio de repetidos ciclos de exposição a níveis elevados de matéria orgânica e micro-organismos, seguida por DAN, enxágue e secagem, realizando assim uma simulação do processamento de endoscópio. Este modelo de BBF foi útil, mas seu desenvolvimento ocorreu de forma lenta por meio de repetições de 30 ciclos dias, com desenvolvimento do biofilme de maneira gradual. Entretanto, Costa Luciano *et al.*, (2016) relataram sobre a avaliação do impacto dos detergentes e DAN, utilizando o modelo MBEC hidroxipatita no biofilme tradicional, ou seja, biofilme formado sem ciclos repetidos de DAN. Existe a necessidade de novas pesquisas com modelos de acúmulo de biofilme em repetidos ciclos do processamento de endoscópios, com tempo minimizado no desenvolvimento do material do biofilme.

O principal objetivo deste estudo foi o de modificar a modelo MBEC Alfa e Howie (2009a; 2009b) para criar um novo modelo de biofilme *buildup* (MBEC-BBF), que leva apenas alguns dias para o desenvolvimento, similar ao modelo proposto por Costa Luciano *et al.*, (2016), mas que simule a acumulação de material nos canais de endoscópio flexível depois de ciclos repetidos de processamento. Outro objetivo foi utilizar este modelo MBEC-BBF para investigar a eficiência de vários detergentes e DAN para destruir ou remover os micro-organismos no BBF.

2 MÉTODOS

2.1 MODELO MBEC BIOFILME *BUILDUP* (BBF)

2.1.2 FORMAÇÃO DE BBF

Utilizaram-se para a formação e desenvolvimento do biofilme *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). O biofilme foi inoculado em MBECTM (Innovotech®, Edmonton, Alberta, Canadá). Estas bactérias foram escolhidas por representar micro-organismos importantes envolvidos nas infecções associadas aos biofilmes em seres humanos, bem como na contaminação dos endoscópios.

As bactérias foram armazenadas como culturas de leite desnatado a -20°C. Antes do experimento, as bactérias foram subcultivadas duas vezes em ágar de sangue (AS), que consiste em *Tryptic Soy Agar* (TSA) com 5% de sangue de carneiro (Oxoid, Toronto, Canadá) incubadas a 35°C durante 24 horas, em condições aeróbias. O inóculo usado para criar BBF consistiu em Artificial Solo Teste (AST) (Artificial solo teste: patente US 6447990) contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL de ambos *P. aeruginosa* e *E. faecalis*.

O biofilme *buildup* em MBEC foi desenvolvido durante oito dias em quatro ciclos de exposição à desinfecção. A cada 96 poços do MBEC foi inoculado 150 µL/espaco de AST com micro-organismos, e o biofilme permaneceu à temperatura ambiente durante dois dias sobre uma mesa “*Rocking table*” (com aproximadamente oito movimentos por minuto). Nos dias 3, 4 e 5, os *pegs* foram lavadas (200 µL/espaco com água de torneira esterilizada três vezes durante 30 segundos), desinfetados (1:50 diluição de GLUT - ver Quadro 01, p. 125) com 175 µL/espaco durante dois minutos, e lavadas (200 µL/espaco com água da torneira esterilizada cinco vezes durante 60 segundos). Os MBEC *pegs* foram expostos a AST com micro-organismos durante duas horas em temperatura ambiente e depois lavados (200 µL/espaco com água da torneira esterilizada três vezes durante 30 segundos), em seguida os MBEC *pegs* foram imersos em 150 µL de água da torneira esterilizada durante a noite em temperatura ambiente.

No quinto dia após o tratamento anteriormente descrito, os *pegs* foram expostos a 150µL/espaco de ATS com micro-organismos e permanecendo sobre a mesa “*Rocking table*” em temperatura ambiente durante dois dias (ao longo do fim de semana). No dia 8 (segunda-feira), os MBEC *pegs* foram enxaguados, em

seguida expostos à diluição 1:50 de GLUT e, posteriormente, enxaguados novamente como já descrito. O BBF foi totalmente desenvolvido e usado para testes posteriores.

2.2 DETERGENTES E DESINFETANTES TESTADOS EM MBEC-BBF

O BBF desenvolvido em MBEC *pegs* foi exposto a vários detergentes e desinfetantes utilizados na diluição, tempo de exposição e temperatura recomendados pelos fabricantes, como demonstrado no Quadro 01, p. 125.

Quadro 01: Descrição dos detergentes e desinfetantes avaliados

Nome Detergente	Tipo de detergente	Companhia	Uso/ Diluição	Tempo de Exposição e Temperatura
D1	<i>Prolystica Enzymatic 2x</i> concentração Enzimática	Steris - Mississauga, ON, Canadá	4mL/ 1L	5 minutos 30°C
D2	<i>Prolystica Neutral 2x</i> concentração não Enzimática	Steris - Mississauga, ON, Canadá	4mL/ 1L	5 minutos 30°C
D3	<i>Neodisher® Alkaline</i> não Enzimático	Dr. Weigert-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
Nome Desinfetante	Tipo de Desinfetante	Companhia	Re-Uso/ dias	Tempo de Exposição e Temperatura
DAN 1 - GLUT	<i>Metricide™</i> Glutaraldeído 2.6%	Metrex – Sybron, Oakville, ON	14 dias	20 minutos Temperatura ambiente
DAN 2 – OPA	Ortoftaldeído 0.55%	Cidex® - Gargrave, N. Yorkshire, UK	14 dias	10 minutos 20°C
DAN 3 – AHP	Acelerador Peróxido de Hidrogênio 2%	Revital-Ox Resert® Mississauga, ON	14 dias	5 minutos Temperatura ambiente

Nota: GLUT – Glutaraldeído, OPA- ortoftaldeído, AHP – acelerador peróxido de hidrogênio, D1 – detergente *Prolystica* enzimático, D2 – detergente *Prolystica* neutro, D3 – *Neodisher*, D4 – *Endozime*, DAN – Desinfetante de alto nível e D - detergente.

Fonte: Próprio autor

2.3 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO PARA CULTURA MBEC-BBF

Após o desenvolvimento em oito dias do MBEC/BBF, realizaram-se a exposição do BBF aos detergentes e/ou DAN, em que, posteriormente, cinco *pegs* foram removidos da tampa do MBEC e transferidos para um tubo de ensaio do tipo *snap cap* (*Simport*, Quebec, Canadá), com 500µL de água de osmose reversa com

adição de 500µL de neutralizante, contendo (Tween 80 (6% w / v), lecitina (0.6% w / v), tiosulfato de sódio (1,0% w / v) e L-histidina (0,2% w / v)) conforme Pineau e Phellippe (2013). Os *pegs* foram extraídos seguindo as instruções do fabricante MBEC, depois submetidos ao *mix* Finemixer Sh200 (Yangchun, Seoul, Coreia do Sul) por dois minutos, seguidos de sonicação a 50/60 Hertz usando um *Bransonic* 1200 *Ultrasonic clear* (Branson Canadá, Pickering ON) por cinco minutos e, finalmente, o vórtex durante um minuto. A área da superfície dos MBEC *pegs* inoculadas foi de 0,46 cm² (fornecido pelo fabricante) e todos os dados quantitativos foram convertidos em log₁₀ UFC/cm².

2.4 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO MBEC-BBF PARA ANÁLISE DE PROTEÍNA E CARBOIDRATO

Após o desenvolvimento do protocolo MBEC BBF em oito dias, cinco *pegs* foram removidos a partir da tampa e transferidos para um tubo de ensaio do tipo *snap cap* (Simport, Quebec, Canadá), contendo 1000µL de água de osmose reversa. Os *pegs* foram extraídos seguindo as instruções do fabricante do MBEC (tal como descrito acima para cultura e contagem de bactérias viáveis). As amostras extraídas foram armazenadas a -20°C, e a análise da quantificação de proteína e carboidrato foi realizada no prazo de sete dias após o armazenamento. O nível de proteína em cada amostra extraída foi determinado, utilizando o ensaio do *kit* de BCA QuantiPro™ (Sigma, St Louis, Missouri) que tem um padrão de proteína, albumina (limite de quantificação foi de 0,5 ng/mL). Para a determinação do nível de carboidrato em cada amostra extraída, utilizou-se o método descrito por Liu *et al* (1994) (limite de quantificação foi de 10 ug/mL). A área de superfície dos *pegs* MBEC inoculadas foi de 0,46 cm² (fornecido pelo fabricante MBEC) e todos os dados quantitativos foram convertidos para ng/cm².

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Utilizou-se o método de fixação modificado descrito por Ren *et al* (2013) para microscopia eletrônica de varredura. Resumidamente, os MBEC-BBF *pegs* foram fixados por imersão em 2,6% de GLUT *Metricide*™ (Sybron Canadá, Oakville, ON) durante duas horas a 4°C. Os *pegs* foram enxaguados duas vezes com 2 mL de

tampão fosfato salino esterilizado (PBS), durante 10 minutos cada. O PBS foi removido, e os MBEC-BBF *pegs* foram desidratados, submetidos ao revestimento com ouro e posteriormente analisados em um microscópio eletrônico de varredura com elétrons, usando (FEI Quanta 650 FEG Ambiental / Microscópio Eletrônico de Varredura). Um detector *Everhart-Thornley* foi utilizado para o FEI, com uma tensão de aceleração para os materiais de 10 kv no modo de alto vácuo (7.03×10^{-4} Pa) uma distância de trabalho em torno do feixe de 15 mm, e ampliações estavam na faixa de 2.5k e 50k.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software *Instat GraphPad Prism 6* foi usado para a análise de variância (ANOVA) com comparações múltiplas, e o teste *t* foi utilizado para comparação de testes individuais para seus respectivos controles.

3 RESULTADOS

Testou-se a diluição de glutaraldeído 1:50 com dois minutos de exposição, isto é, as condições abaixo do nível padrão para o desenvolvimento de BBF, em que os resultados mostraram uma redução de 2 a 4 $\log_{10}$ dos organismos em análise de bactérias em suspensão, desinfecção parcial.

O modelo MBEC-BBF que foi desenvolvido simula o acúmulo de material e viabilidade de bactérias no interior dos canais de endoscópios flexíveis, após repetidos ciclos de processamento em condições abaixo do nível padrão, ou seja, baixo nível de desinfecção e curto tempo de exposição e resultou em uma média de 5,804 $\log_{10}$ UFC/*peg* de *Enterococcus faecalis* e 7,371 $\log_{10}$ UFC/*peg* de *Pseudomonas aeruginosa*. O MBEC-BBF foi exposto ao tratamento com quatro diferentes detergente (D1, D2, D3 e D4) e comparado com o controle MBEC-BBF que não teve tratamento com detergente (Figura 01, p. 128).

A exposição ao detergente foi realizada em condições de fluido estático para determinar o impacto do detergente sem qualquer ação física, isto é, sem fluxo de fluido, pois o MBEC estava em condições estáticas sem movimento na *Rocking table*. MEV foi realizada para determinar qualquer impacto observável dos detergentes sobre a morfologia da célula bacteriana ou a arquitetura BBF (Figura 02,

p. 129). No geral, houve pouco impacto dos detergentes sobre a morfologia bacteriana ou arquitetura BBF, sem interrupção da camada BBF, apenas a exposição aos detergentes D1 e D4 mostrou alguma modificação da camada MBEC/BBF *peg*.

Para determinar o impacto da combinação da exposição de detergente em posição estática, seguida por exposição de desinfetante nos MBEC-BBF *pegs*, estes foram extraídos para análise dos níveis quantitativos de proteínas, carboidratos e contagem bacteriana viável (Quadro 02, p. 130). Apenas a combinação de D3 e glutaraldeído resultou em um aumento significativo de proteína para os MBEC-BBF *pegs*. Considera-se que todos os MBEC BBF *pegs* tratados com OPA reduziram de forma significativa os níveis de proteína, independentemente da exposição ao detergente. Os dados do Quadro 02, p. 130, indicam que a análise de carboidrato não funcionou adequadamente em MBEC-BBF *pegs*, devido aos controles positivos não apresentarem qualquer resíduo de carboidrato.

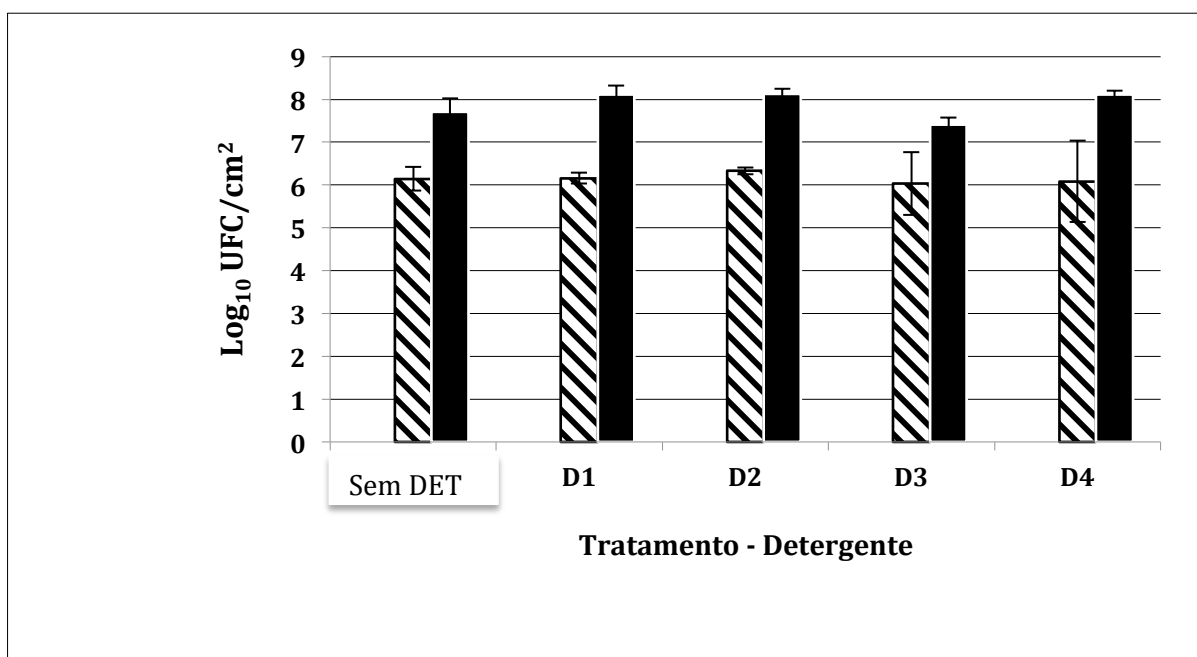


Figura 01: Impacto do detergente na remoção de bactérias MBEC-BBF *pegs*. BBF foi constituído em MBEC *pegs* utilizando *E. faecalis* (barra listrada) e *P. aeruginosa* (barra preta), como descrito nos Materiais e Métodos. O inóculo de AST foi de 7,876 log₁₀ UFC/mL *Enterococcus faecalis* no início do desenvolvimento, 8,005 log₁₀ UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa*. O inóculo de AST também continha 7,681 log₁₀ UFC/mL *Pseudomonas aeruginosa* no início, e 6,891 log₁₀ UFC/mL *Pseudomonas aeruginosa* no final do protocolo BBF. A BBF formado foi exposto a vários detergentes em condições estáticas, como descrito em Materiais e Métodos Quadro 01, p. 125.

Fonte: Próprio autor

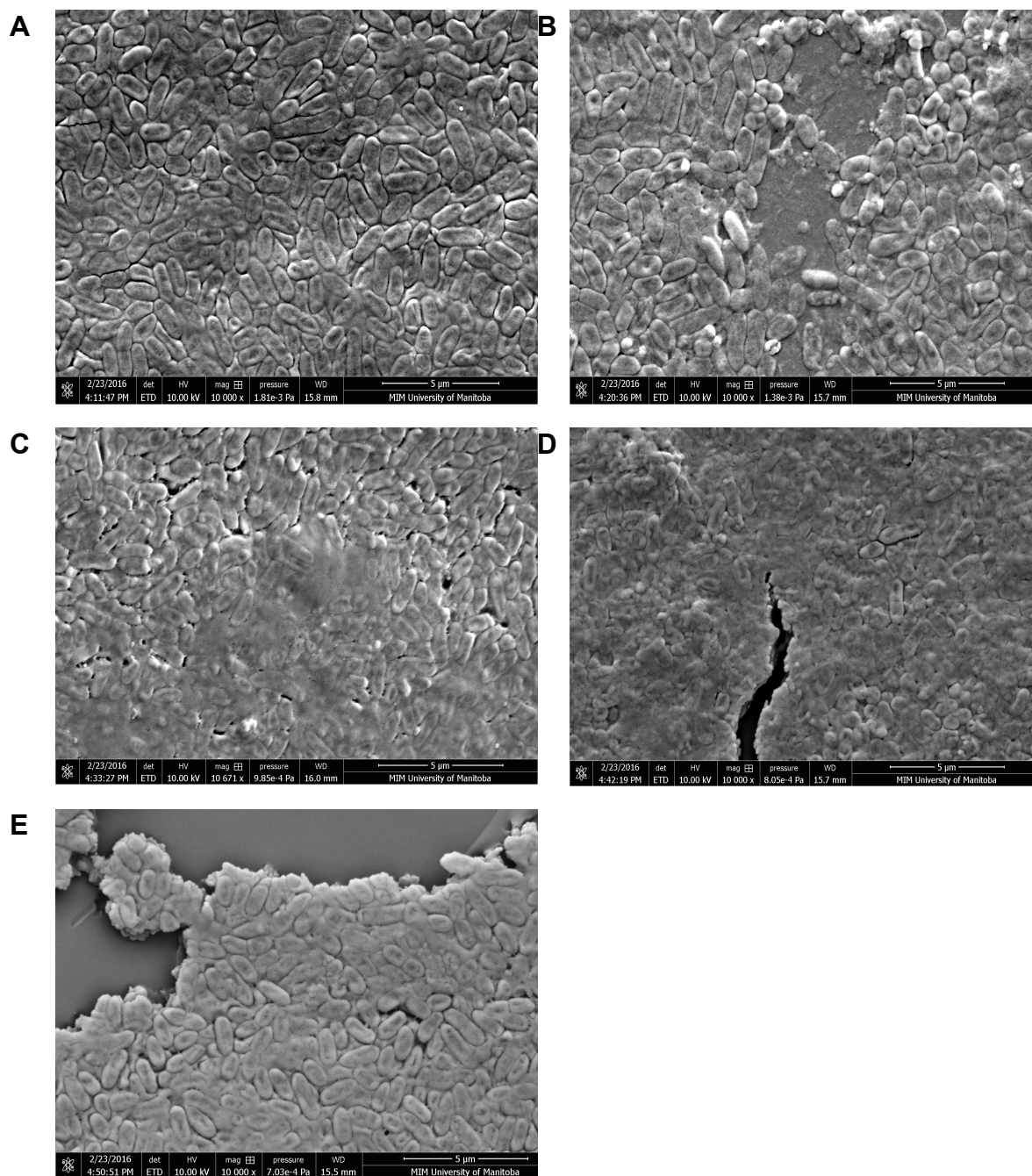


Figura 02: Impacto da exposição a vários detergentes em BBF na posição estática (A) BBF controle positivo, sem exposição aos detergentes, (B) BBF expostos ao detergente 1 – (D1), (C) BBF expostos ao detergente 2 – (D2), (D) BBF expostos ao detergente 3 – (D3) e (E) BBF exposto ao detergente 4 – (D4).

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

Quadro 02: Efeitos de vários detergentes e desinfetantes sobre a redução de proteínas, carboidratos e bactérias no MBEC-BBF pegs

Tratamento ^a	Análise de Proteína ^b µg/cm ²	Contagem de Bactérias log ₁₀ UFC/cm ²	
		<i>E. faecalis</i> Média log ₁₀ UFC/cm ² (Desvio Padrão) ^b	<i>P. aeruginosa</i> Média log ₁₀ UFC /cm ² (Desvio Padrão) ^b
Controle Negativo (Sem DET, sem DAN)	0.51 (0.533)	0 (0) ^b	0 (0)
Controle Positivo BBF (sem DET, sem DAN)	32.74 (6.168)	6.14 (0.278)	7.71 (0.320)
BBF/GLUT	43.49(11.90)	0.14 (0.19)	3.39 (0.57)
BBF/D1/ GLUT	31.49(25.18)	0 (0)	2.25 (0.57)
BBF/D2/ GLUT	40.93(3.33)	0 (0)	2.25 (0.93)
BBF/D3/ GLUT	78.16(36.80) ^c	0 (0)	2.22 (0.63)
BBF/D4/ GLUT	23.99(15.30)	0 (0)	2.69 (0.20)
BBF/AHP	26.92 (8.70)	3.72 (0.42)	4.38 (0.89)
BBF/D1/ AHP	38.20 (10.91)	4.12 (0.18)	2.36 (1.38)
BBF/D2/ AHP	71.48 (55.76)	3.96 (0.04)	5.91 (0.14)
BBF/D3/ AHP	16.90 (10.77)	2.36 (1.38)	3.40 (2.22)
BBF/D4/ AHP	23.00 (12.76)	1.32 (1.01)	3.09 (2.64)
BBF/OPA	12.70 (9.12) ^d	1.62 (1.07)	3.51 (1.68)
BBF/D1/ OPA	11.70 (7.76) ^d	0.73 (1.54)	2.66 (1.15)
BBF/D2/ OPA	25.53(21.30) ^d	1.74 (1.56)	4.68 (1.77)
BBF/D3/ OPA	9.06 (6.84) ^d	0.24 (0.77)	1.46 (1.36)
BBF/D4/ OPA	8.64(11.50) ^d	0 (0)	2.61 (0.81)

Redução bacteriana: para todos DAN em combinação com os detergentes *P. aeruginosa* e *E. faecalis* foram significativamente reduzidos com $p < 0,05$ (exceto para *P. aeruginosa* testada com D2 / AHP).

^a Os detergentes testados incluem: D1: *Prolystica* enzimática, D2: *Prolystica* neutro, D3: *Neodisher*, D4: *Endozime*. Os desinfetantes testados incluem: GLUT: glutaraldeído, AHP: Acelerador de Peróxido de Hidrogênio e OPA: orto-ftaldeído. Veja materiais e métodos para detalhes de detergentes e desinfetantes.

^b <LD: representa menos do que o limite de detecção.

^c comparado com o controle positivo, a proteína aumentou, significativamente, com o valor de $p = 0,0065$ (IC: -79,61 a -11,24),

^d comparado com o controle positivo, a proteína reduziu, significativamente, com o valor de $p < 0,05$.

DAN – Desinfetante de alto nível

DET – Detergente

Fonte: Próprio autor

4 DISCUSSÃO

Atualmente, tem-se um modelo de biofilme seco desenvolvido para superfícies ambientais (Almatroudi *et al.*, 2015) e também o modelo de biofilme tradicional formado em canais de endoscópios (ISO 15883- 5, anexo F). O modelo de biofilme em PTFE, descrito por Vickery *et al.*, (2009) consistiu em 20 ciclos de crescimento do biofilme, nos quais posteriormente testaram-se o tratamento com detergente e exposição ao glutaraldeído, resultando na ausência de bactérias viáveis detectáveis desse protocolo cíclico. O modelo estende-se desses resultados usando piores condições em exposição ao glutaraldeído, abaixo do padrão recomendado. Nestas condições, houve a sobrevivência das bactérias no interior do BBF. O modelo MBEC-BBF descrito, neste estudo, é uma extensão dos estudos MBEC originais feita por ALFA e HOWIE (2009a, 2009b) e COSTA LUCIANO *et al.*, (2016). O modelo BBF foi formado por múltiplos ciclos de exposição a níveis elevados de bactérias aderidas em uma matriz orgânica que foi combinada com enxágue e DAN abaixo dos padrões recomendados.

Uma vez formado o BBF, não foi possível remover o mesmo por exposição a qualquer um dos detergentes testados (sem atrito), nem eliminar as bactérias dentro do BBF com a exposição de GLUT, OPA ou AHP, usando condições de exposição recomendadas pelo fabricante. Isto tem implicações significativas para o processamento de endoscópios, pois documenta que os detergentes testados, sem a utilização de fricção (por exemplo, escovas de lúmen), não reduzem de forma eficaz a quantidade de BBF. Além disso, uma vez formado o BBF, os desinfetantes não conseguiram reduzir 6 log₁₀ de bactérias residuais. Os resultados deste modelo MBEC-BBF corroboram e estendem os resultados do modelo de biofilme tradicional HA-MBEC, realizado por COSTA LUCIANO *et al.*, (2016). Entretanto, a utilização de MBEC *pegs* sem o revestimento de hidroxiapatita (tal como utilizado no estudo Costa Luciano *et al.*, 2016) permitiu a utilização de MEV e avaliação do BBF *pegs*.

A acumulação de material nos canais de endoscópios utilizado pelo paciente, tem sido documentada. Ren-Pei *et al.*, (2014) documentaram que 54,6% dos canais de sucção/biópsia e 76,9% dos canais de ar/água de endoscópios utilizados em paciente tinham acumulado material sendo detectado em MEV. Observaram a importância da escovação (atrito mecânico) dos canais e reportaram que os canais de sucção/biópsia tinham a presença reduzida de materiais orgânicos

provavelmente devido à possibilidade desses canais receberem a fricção por escovas (REN-PEI *et al.*, 2014). Estes resultados sustentam os dados obtidos por Pajkos, Vickery, Cossart (2004) que relatam que a acumulação de material no interior dos canais de endoscópios utilizados na rotina, é relatada em maior quantidade nos canais de ar/água os quais não podem ser escovados.

Vickery *et al.*, (2009) também desenvolveram biofilme em canais de PTFE, utilizando 20 ciclos de exposição ao tratamento glutaraldeído e posteriormente a etapa de secagem durante toda a noite. No entanto, nesse modelo não houve bactérias sobreviventes no final dos vinte ciclos, embora pudessem ser detectados bactérias viáveis, utilizando microscopia com o método *live/dead*.

A falta de detecção de bactérias viáveis pode ser relacionada com o método de escolha da análise da amostra. Aumeran *et al.*, (2012) relataram que a coleta de amostras abaixo dos padrões recomendados pode resultar em falsos negativos. Além disso, Almatroudi *et al.*, (2015) desenvolveram um modelo de biofilme em superfície isenta de umidade por meio de ciclos de secagem, mas não incluíram exposição à DAN. Nesse modelo de biofilme em superfície seca, foi detectada a presença de bactérias viáveis utilizando a microscopia com o método *live/dead*.

Os dados colaboram com os reportados por Vickery *et al.*, (2009) e Almatroudi *et al.*, (2015), testando condições desfavoráveis, utilizando amostra abaixo dos padrões recomendados de DAN que resultaram no desenvolvimento de BBF com bactérias viáveis que podem ser detectadas por cultura. Os achados deste estudo mostraram que uma vez formado o BBF, os desinfetantes utilizados em condições recomendadas não possuem a eficácia para remover o biofilme.

Estes resultados explicaram o motivo de as bactérias serem detectáveis em endoscópios flexíveis após o uso no paciente, apesar de serem submetidos a ciclos repetidos de limpeza e desinfecção (CARBONNE *et al.*, 2010;. EPSTEIN *et al.*, 2014;. KOVALEVA *et al.*, 2010). Evidenciaram questões quanto à importância da validação de instruções pelo fabricante para o uso de detergentes e DAN, na limpeza e desinfecção dos endoscópios com presença de biofilme e das maneiras para prevenir ou eliminar a formação do mesmo no interior dos canais de endoscópios (MARION *et al.*, 2006; COSTA LUCIANO *et al.*, 2016).

Uma limitação deste estudo foi o fato de o modelo BBF ser desenvolvido em MBEC *pegs*, impossibilitando, assim, o efeito da fricção (por exemplo, a utilização de escovas no interior dos canais durante a etapa de limpeza), porque os MBEC *pegs*

são formados na superfície externa dos *pegs*, não no interior de um canal o qual possibilita o uso de escovas. É necessário mais estudos clínicos de simulação que abordem o impacto de escovas no interior dos canais dos endoscópios com a capacidade de avaliar a eficácia dos detergentes e DAN no processo de remoção do BBF. Outra limitação do estudo foi que a análise de carboidratos não foi capaz de detectar com segurança os níveis de carboidratos após o BBF formado, pois isso ocorreu provavelmente devido à reação causada pelo tratamento com glutaraldeído e os produtos químicos necessários para a análise de carboidrato (Liu *et al.*, 1994).

Recentemente, o FDA exigiu que os fabricantes de reprocessadoras automáticas de endoscópios fornecessem dados para respaldar a eficácia do seu produto (FDA, 2015a, 2015b). McDonnell *et al.*, (2016) relataram que a STERIS Sistema 1E (SS1E) oferece efetivamente uma redução $> 6 \log_{10}$ em esporos *Geobacillus stearothermophilus* no interior dos canais (incluindo os canais do *elevator*), que são superfícies do duodenoscópios, o que reforça a eficácia do processo SS1E para eliminar altos níveis de esporos, mesmo quando utilizados nas condições desfavoráveis de tempo de exposição e em condições de fluxo de fluido. No entanto, novos testes com duodenoscópios são necessários para avaliar, minuciosamente, o processo da limpeza manual.

Seria útil avaliar a eficácia dos métodos de DAN e esterilização posteriormente à formação e desenvolvimento do BBF dentro dos canais de endoscópios. Os dados deste estudo sugerem que, quando ocorre o desenvolvimento do BBF no interior de um canal de endoscópios flexíveis, em seguida, o detergente e DAN não serão capazes de proporcionar o nível esperado de limpeza ou desinfecção na ausência de atrito, isto é, os canais não podem ser escovados. Entretanto, os protocolos de processamento devem ser desenvolvidos com intuito de prevenir e eliminar a formação de BBF ao longo dos ciclos de processamento dos endoscópios.

Em conclusão, os dados apresentados, neste estudo, mostraram que a redução microbiana e orgânica esperada após a exposição de detergente e DAN não foi alcançada quando BBF já tinha desenvolvido. Além disso, o modelo descrito, no presente estudo, proporciona um método conveniente para avaliar a capacidade dos detergentes e DAN para destruir ou remover bactérias dentro do BBF. O formato de 96 espaços no *bottom* do MBEC permite uma ampla variedade de condições as quais podem ser avaliadas simultaneamente.

REFERÊNCIAS

- AAMI (Advancing Safety in Healthcare Technology). American National Standard. Flexible and semi-rigid endoscopes processing in health care facilities (26), 1–70. 2015.
- Abbanat D., Shang W., Amsler K., *et al.* Evaluation of the in vitro activities of ceftobiprole and comparators in staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014. 43, 32 - 39.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.013>. 2014
- Alfa M.J., Howie R. Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. *BMC Infect. Dis.* 2009a. 9, 56.
- Alfa M.J., Howie R. Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. *BMC Infect. Dis.* 2009b. 9, 1 - 14.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/56>
- Almatroudi A., Hu H., Deva A. *et al.* A new dry-surface biofilm model: an essential tool for efficacy testing of hospital surface decontamination procedures. *J. Microbiol. Methods* 2015. 117, 171 - 176. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.003>
- Aumeran C., Thibert E., Chapelle F.A., *et al.* Assessment on experimental bacterial biofilms and in clinical practice of the efficacy of sampling solutions for microbiological testing of endoscopes. *J. Clin. Microbiol.* 2012. 50 (3), 938 - 942.
- Bridier A., Briandet R., Thomas V., *et al.* Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 2011. 27 (9), 1017 - 1032.
<http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Bridier A., Sanchez-Vizuet M.D.P., Coq D.L., *et al.* Biofilms of *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoS ONE*. 2012. 7, e 44506.

Carbonne A., Thiolet M., Fournier S., *et al.* Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009: surveillance and outbreak reports. *Euro Surveill.* 2010. 15 (48), 1 - 6.

Ceri H., Olson M.E., Stremick C., *et al.* The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *American Journal of Hospital Infection.* 1999. 37, 1771 - 1776.

Coraça-Hubér D.D., Fille M., Hausdorfer J., *et al.* Evaluation of MBECTM – HTP biofilm model for studies of implant associated Infections. *J. Orthop. Res.* 2012. 1176 - 1180 <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22065>

Costa Luciano C., Olson N., Tipple A.F.V., *et al.* Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. *Am. J. Infect. Control.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040>

Costerton J.W. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1999. 11, 217 - 221.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999. 284, 1318 - 1322.

Dolan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001. 15 (2), 167 - 193.

Epstein L., Hunter J.C., Arwady A., *et al.* New Delhi metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant *Escherichia coli* associated with exposure to duodenoscopes. *J. Am. Med. Assoc.* 2014. 312, 1447 - 1455.

Fang Y., Shen Z., Li L., *et al.* A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. *World J. Gastroenterol.* 2010. 16, 1019 - 1024.

FDA (*Food and Drugs Administration*) News Release: FDA orders duodenoscope

manufacturers to conduct postmarket surveillance studies in health care facilities.

Oct 5, 2015b.

<http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/UCM465639>

FDA (*Food and Drugs Administration*). Reprocessing medical devices in health care settings: validation methods and labeling guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff, March 17, 2015a. Disponível em:

<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-meddev-gen/documents/document>

Fushimi R., Takashima M., Yoshikawa H., *et al.* Comparison of adenosine triphosphate, microbiological load, and residual protein as indicators for assessing the cleanliness of flexible gastrointestinal endoscope. *Am. J. Infect. Control.* 2013. 41, 161 - 164.

GESA (Gastronterological Society of Australia). Clinical Update Infection Control in Endoscopy. 2011. 1 - 68.

Gökçen A., Vilcinskas A., Wiesner J. Biofilm-degrading enzymes from *Lysobacter gummosus*. *Virulence.* 2014. 5 (3), 378 - 387.

ISO 15883-2005. Washer-disinfectors-part 5. Test soils and methods for demonstrating cleaning efficacy. Annex F. 2005.

Kovaleva J., Buss A. Usefulness of bacteriological monitoring of endoscope reprocessing. *Therapeutic Gastrointestinal Endoscopy.* 2012. 9, 141 - 162.

Kovaleva J., Degener J.E., Van der Mei H.C. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *J. Hosp. Infect.* 2010. 76, 345 - 350.

LaPlante K.L., Mermel L.A. In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. 53 (7), 3166 - 3169.

<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01642-08>

Lavery G., Gorman S.P., Gilmore B.F. Biofilm eradication kinetics of the ultrashort lipopeptide C12-OOWW-HH2 utilizing a modified MBEC assayTM. *Chem. Biol. Drug.* 2015. 85, 645 - 652. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12441>.

Liu D., Lau Y.I., Chau Y.K., *et al.* Simple technique for estimation of biofilm accumulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1994. 53, 913 - 918.

Marion K., Freney J., James G., *et al.* Using an efficient biofilm detaching agent: an essential step for the improvement of endoscope reprocessing protocols. *J. Hosp. Infect.* 2006. 64, 136 - 142.

McDonnell G., Ehrman M., Kiess S. Effectiveness of the SYSTEM 1E Liquid Chemical Sterilant Processing System for reprocessing duodenoscopes. 2016. *AJIC* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.008>

Ofstead C.L., Wetzeler H.P., Snyder A.K., *et al.* Endoscope reprocessing methods. A prospective study on the impact of human factors and automation. *Gastroenterol. Nurs.* 2010. 33 (4), 304 - 311.

Olson M.E., Ceri H., Mork D.W., *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 2002. 66, 86 - 92.

Pajkos A., Vickery K., Cossart Y. Is biofilm accumulation on endoscopes tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *J. Hosp. Infect.* 2004. 58, 224 – 229

Parker A.E., Walker D.K., Doeres D.M., *et al.* Ruggedness and reproducibility of the MBEC biofilm disinfectant efficacy test. *J. Microbiol. Methods.* 2014. 102, 55 - 64.

PHAC (Public Health Agency of Canada). Infection Prevention and Control Guideline for Flexible Gastrointestinal Endoscopy and Flexible Bronchoscopy. 2010. 1 - 107. ([http:// www.phac-aspc.gc.ca/PHAC](http://www.phac-aspc.gc.ca/PHAC), publisher).

Pineau L., Phellippe E.D. Evaluation of endoscope cleanliness after reprocessing: a clinical-use study. Central Service. 2013. 1, 22 - 27.

Pineau L., Villard E., Duc D.L., *et al* . Endoscope drying/storage cabinet: interest and efficacy. J. Hosp. Infect. 2008. 68, 59 - 65.

Ren W., Xiaoyan S.M.D., Huang X., *et al*. Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. American Journal of Hospital Infection. 2013. 41, e89 - e92.

Ren-Pei W., Hui-Jun X., Ke Q., *et al*. Correlation between the growth of bacterial biofilm in flexible endoscopes and endoscope reprocessing methods. Am. J. Infect. Control. 2014. 42, 1203 - 1206.

Roberts, C.G. The role of biofilms in reprocessing medical devices. Am. J. Infect. Control. 2013. 41, S77 - S80.

Rutala W.A., Weber D.J. Disinfection and sterilization: an overview. Am. J. Infect. Control. 2013. 41, S2 - S5.

SGNA (Society of Gastroenterology Nurses and Associates). Standards of infection control in reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. Gastroenterol. Nurs. 2013. 36, 293 - 303.

Takei S., Hotomi M., Yamanaka N. Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable *Haemophilus influenza* isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. J. Infect. Chemother. 2013. 19, 504 - 509. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-013-0592-y>.

Ubhayawardana D.L.N.L., Kottahachchi J., Weerasekera M.M., *et al*. Residual bioburden in reprocessing side-view endoscopes used for endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). Endoscopy International 1. 2013. (E12-

E16.ucm253010.pdf).

Vickery K., Ngo Q.-D., Zou J., *et al.* The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. *Am. J. Infect. Control.* 2009. 37, 470 - 475

Wendorf K.A., Kay M., Baliga C., *et al.* Endoscopic retrograde cholangiopancreatography – associated AmpC *Escherichia coli* outbreak. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2015. 36 (6), 634 - 642.

Zhong W., Alfa M., Zelenitsky S., *et al.* Simulation of cyclic reprocessing buildup on reused medical devices. *Comput. Biol. Med.* 2009. 39, 568 - 577.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2009.04.003>

6. CONCLUSÃO

Os achados deste estudo mostraram que quando o biofilme foi formado em modelos que simularam canais de endoscópios, os detergentes (*Prolystica* enzimático, *Prolystica* Neutro, *Neodisher* e *Endozime*) e desinfetantes testados (Glutaraldeído, Ortoftaldéido e Acelerador Peróxido de Hidrogênio) foram ineficazes para a sua destruição e remoção em posição estática. Achados que reforçam a necessidade da criteriosa execução da etapa da limpeza, no processamento de endoscópios.

O processamento de endoscópio gastrointestinal flexível (EGF) compreende várias etapas as quais estão sujeitas ao erro humano que pode resultar no desenvolvimento de biofilmes. Assim, o processamento de EGF constitui um grande desafio para a prática clínica. Especialmente, por ser um equipamento que pode desenvolver os dois tipos de biofilmes analisados nesse estudo e mundialmente conhecidos; o biofilme tradicional (TBF) e o *buildup* (BBF). Ambos os biofilmes podem-se desenvolver no interior dos canais do endoscópio, devido à presença constante de fluido, que proporciona ambiente para a fixação do biofilme TBF e BBF, por meio de ciclos repetidos de desinfecção que necessariamente inclui fases secas e úmidas.

Cabe aos responsáveis técnicos pelo processamento, função usualmente assumida por enfermeiros, a elaboração de protocolos de com atenção à escolha dos detergentes e desinfetantes, além de atenção às recomendações dos fabricantes, seguindo diluição, tempo e temperatura para cada saneante utilizado. Entretanto, outro fator importante na prevenção e controle da formação do biofilme é a utilização de artefatos que promova atrito nos canais internos dos EGF, com escovas com diâmetros adequados.

Essas condutas são preventivas na etapa da limpeza, evitando a fixação de matéria orgânica no momento da desinfecção, tendo em vista que um dos achados deste estudo é que muitos desinfetantes, incluindo Glutaraldeído, agente germicida amplamente utilizado no Brasil, possuem capacidade de fixar matéria orgânica na superfície e, dessa forma, contribuem para o desenvolvimento do biofilme nos canais internos dos endoscópios.

Contagem de bactérias viáveis são grandes preditores de presença do biofilme, porém não consegue analisar a presença de bactérias viáveis não cultiváveis, dificultando, assim, a possibilidade de conhecer a real condição dos

canais internos dos endoscópios. A análise de proteína e carboidrato é importante para verificar a presença de biofilmes, estes achados mostraram que quando o biofilme foi submetido ao processo de limpeza ou desinfecção com agentes saneantes, ocorreu uma alteração dos resultados por meio de reações químicas que impediram esta pesquisa de confirmar a destruição e remoção destes componentes no biofilme.

A microscopia eletrônica de varredura é uma alternativa muito eficaz para a confirmação da presença do biofilme nos canais de endoscópios, mas essa técnica requer um trabalho árduo além de necessitar de muitos recursos financeiros para a execução da mesma, sendo inviável a sua prática, rotineiramente, dentro das clínicas de endoscopia.

Destaca-se que o modelo de desenvolvimento de biofilme, descrito no presente estudo, proporciona um método apropriado para avaliar a capacidade dos detergentes e desinfetantes de alto nível para destruir ou remover bactérias do interior do BBF e favorece futuras investigações. Além disso, o material utilizado para o desenvolvimento do biofilme, o MBEC que possui o formato de 96 poços, que permite a avaliação simultânea de uma ampla variedade de condições.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os endoscópios flexíveis são equipamentos que contribuem de forma ímpar na saúde tanto para procedimentos de diagnóstico como terapêutico. Sabe-se do alto custo de seu inventário e das dificuldades dos serviços de saúde em possuírem grande número desse equipamento para a alta demanda, e, dessa forma, um mesmo endoscópio precisa ser utilizado várias vezes ao dia. À medida que aumenta a demanda de uso, aumenta a demanda pelo processamento dos endoscópios, os quais necessitam de tempo hábil para execução de todas as minuciosas etapas. Essa demanda pode contribuir para falhas no processamento, favorecendo, assim, ambiente propício para o desenvolvimento do biofilme nos canais internos desses equipamentos.

Alguns *design* de endoscópios não permitem a inserção de escovas ou outros artefatos em canais de ar/água, impossibilitando a fricção e remoção de sujidade e a prevenção do desenvolvimento do biofilme por atrito direto das superfícies. Portanto, uma grande dificuldade para o processamento é o complexo *design* dos endoscópios que não permite a completa visualização do equipamento, dificultando a execução de suas várias etapas. Espera-se atenção dos fabricantes de endoscópios para a projeção de novos equipamentos, com *design* mais simples, que facilite o seu processamento (limpeza e desinfecção).

Uma das limitações desta pesquisa foi a impossibilidade de realizar a fricção para avaliar a destruição e remoção de ambos os biofilmes desenvolvidos, devido ao material utilizado, o MBEC não permite uma simulação idêntica da limpeza com o uso de artefatos. Em contrapartida, essa condição, em certa medida, pode acontecer durante o processamento dos canais de ar/ água que não permitem a introdução de artefatos, sendo realizada a limpeza somente com *flush*.

Um outro aspecto importante e que pode contribuir para a formação de biofilme é o tempo de uso dos endoscópios, que carecem de indicadores que limitem a vida útil desses equipamentos. Pois, com os sucessivos processamentos, a superfície interna dos canais dos endoscópios pode ficar alterada ou danificada, proporcionando um meio para o desenvolvimento do biofilme, o que leva às suas consequências infecciosas. Não sendo, portanto, aceitável que o tempo de uso desses equipamentos seja condicionado, unicamente, à sua funcionalidade.

Esforços devem ser encorajados nos serviços de saúde para mudanças no processamento de endoscópios, visando prevenção do desenvolvimento de biofilme nos canais internos dos mesmos, e, por conseguinte, infecções associadas aos

procedimentos de endoscopia. Nesse sentido, vale destacar a importância do trabalho do enfermeiro que, rotineiramente, atua como responsável técnico dessa unidade e deve garantir a qualidade do processamento.

AAMI. (Advancing Safety in Healthcare Technology). American National Standard. Flexible and semi-rigid endoscopes processing in health care facilities. 2015. (26), 1 - 70.

Abbanat D., Shang W., Amsler K., *et al.* Evaluation of the in vitro activities of ceftobiprole and comparators in Staphylococcal colony or microtitre plate biofilm assays. Int. J. Antimicrob. Agents 2014. 43, 32 - 39.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.09.013>

Alfa M.J. Artificial Test Soil, US patent # 6,447,990; issue date; Sept 10, 2002.

Alfa M. J; Fatima. I; Olson, N. Validation of adenosina triphosphate to audit manual cleaning of flexible endoscope channels. American Journal of Infection Control. 2013

Alfa M. J; Olson N, DeGagne P. Automated washing with the Reliance Endoscope Processing System and its equivalence to optimal manual cleaning. American Journal Infection Control. 2006. v. 34, n. 9.

Alfa M.J ; Olson N; DeGagne P. *et al.* A survey of reprocessing Methods, residual viable bioburden, and soil levels in patient-ready endoscopic retrograde cholangiopancreatography duodenoscopes used in Canadian Centers. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2002. v. 23, n. 4.

Alfa M. J; Olson N; Murray B. L. Comparison of clinically relevant benchmarks and channel sampling Methods used to assess manual cleaning compliance for flexible gastrointestinal endoscopes. American Journal of Infection Control. 2014. 42: e1 - e5.

Alfa M.J., Howie R., Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. BMC Infect. Dis. 2009a. 9, 56.

Alfa M.J., Howie R., Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex

medical devices. BMC Infect. Dis. 2009b. 9, 1 – 14.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/56>

Alfa M. J; Olson N; DeGagne R.T. P. *et al.* Development and validation of rapid use scope test strips to determine the efficacy of manual cleaning for flexible endoscope channels. American Journal of Infection Control. 2012a.

Alfa M. J; Sepehri S; Olson N. *et al.* Establishing a clinically relevant bioburden benchmark: A quality indicator for adequate reprocessing and storage of flexible gastrointestinal endoscope. American Journal of Infection Control. 2012b.

Alfa M.J, DeGagne P, Olson N. Worse-case soiling levels for patient-used flexible endoscopes before and after cleaning. Am J Infect Control. 1999. 27: 392 - 401.

Almatroudi A., Hu H., Deva A., Gosbell I.B., *et al.* A new dry-surface biofilm model: an essential tool for efficacy testing of hospital surface decontamination procedures. J. Microbiol. Methods 2015. 117, 171 - 176
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.08.003>.

Arabaa S. F; Nguyen P; Sanderson M. A *et al.* Early identification and control of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, originating from contaminated endoscopic equipment. American Journal of Infection Control. 2013. 41: 562 – 4.

AORN. Perioperative Standards and Recommended Practices for inpatient and ambulatory Settings. Association of perioperative registered nurses. 2017.

ASGE (American Society for Gastrointestinal Endoscopy). Multisociety: Guideline on reprocessing flexible gastrointestinal endoscopes: 2011. Gastrointestinal Endoscopy. 2011. v. 73, n. 6.

Aumeran C., Thibert E., Chapelle F. A. *et al.* Assessment on Experimental Bacterial Biofilms and in Clinical Practice of the Efficacy of Sampling Solutions for Microbiological Testing of Endoscopes. Journal of Clinical Microbiology. 2012. (50),

3, 938 - 942.

Balsamo A. N. Avaliação da eficácia da limpeza e desinfecção de alto nível na remoção do biofilme em canais de endoscópios. Universidade Federal de São Paulo, 2009. Tese (doutorado) 2009, 145p.

Balsamo A. N; Graziano K. U; Schneider, R. P. *et al.* Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados. Rev Esc Enferm USP. 2012.

Bajolet O; Ciocan D; Vallet C *et al.* Gastrocopy-associated transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Hospital Infection. 2013. 341 - 343.

Barbosa J. M. As interfaces do reprocessamento de endoscópios pelo uso de glutaraldeído em serviços de endoscopia de Goiânia. Universidade Federal de Goiás. 2008. Dissertação (mestrado), 2008, 127p.

Barbosa J. M; Souza A. C; Tipple A. F. O *et al.* Endoscope reprocessing using glutaraldehyde in endoscopy services of Goiânia, Brazil. Arq Gastroenterol. 2010. v. 47, n.3.

Beilenhoff U; Neumann, C. S; Rey, J. F *et al.* ESGE-ESGENA guideline: Cleaning and disinfection in gastrointestinal endoscopy. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº260 de 11 de agosto de 2006. Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implementação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Informe Técnico nº04/07, de 2007. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência a saúde fundamentais para a utilização. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº6, de 10 de Março de 2013. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de endoscopia com via de acesso ao organismo por orifícios exclusivamente naturais. Diário Oficial da União. Brasília. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº55, de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência a saúde com indicações para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília. 2012.

Bridier A., Briandet R., Thomas, V., *et al.* Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 2011. 27 (9), 1017 - 1032.
<http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>

Bridier A, Sanchez-Vizuet MDP, Coq DL *et al.* Biofilms of *Bacillus subtilis* Hospital Isolate Protect *Staphylococcus aureus* from Biodice Action. *PLOS ONE* 2012;7:e44506.

BSG. (British Society of Gastroenterology). Guidelines for decontamination of equipment for gastrointestinal endoscopy. The report of a working party of the British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. 2008. Disponível em:
[http://www.aspgj.com/us/sites/default/files/pdf/BSG-Guidelines-decontamination-of-equipment-for-gastrointestinal-endoscopy\(UK\).pdf](http://www.aspgj.com/us/sites/default/files/pdf/BSG-Guidelines-decontamination-of-equipment-for-gastrointestinal-endoscopy(UK).pdf)

Blog R, Kampf G. Test models to determine cleaning efficacy with different types of bioburden and its clinical correlation. *Journal of Hospital Infection* 2004; 56: 544-548.

CSA. (Canadian Standards Association). Decontamination of reusable medical devices. Ottawa, ON: Canadian Standards Association; 2014.

Carbonne A., Thiolet M., Fournier S., *et al.* Control of a multi-hospital outbreak of

KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009: surveillance and outbreak reports. *Euro Surveill.* 2010. 15 (48), 1–6.

Carvalho FG, Puppim-Rontani RM, Fucio SBP. *et al.* Analysis by confocal laser scanning microscopy of the MDPB bactericidal effect on *S. mutans* biofilm CLSM analysis of MDPB bactericidal effect on biofilm. *J Appl Oral Sci.* 2012. 1: 568 - 75.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Guideline for disinfection and sterilization in health-care facilities. Atlanta, 2008. Disponível em: http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multisociety guideline on reprocessing flexible gastrointestinal endoscopes: 2011. American Society for Gastrointestinal Endoscopy. 2011.

Ceri H, Olson ME, Stremick C. *et al.* The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotics susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999. 37: 1771 - 6.

Chang C. L; Su L. H; Lu C. M *et al.* Outbreak of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* urinary tract infections due to a contaminated ureteroscope. *Hospital Infection.* 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2013.06.010>

Chiu K. W; Tsai M. C; Wu K.L. *et al.* Surveillance cultures of samples obtained from biopsy channels and automated endoscope reprocessors after high-level disinfection of gastrointestinal endoscopes. *BMC Gastroenterology.* 2012. <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/12/120>

Costa E. A. Reprocessamento de endoscópios em Hospitais de Salvador – BA. *GED gastroenterol. Endosc.* 2015. 34 (3): 115 – 122.

Costa E. A. M; Costa E. A; Graziano. *et al.* Reprocessamento de produtos médicos: uma proposta de modelo regulatório para hospitais brasileiros. *Rev. Esc Enferm*

USP. 2011.

Costa Luciano C., Olson N., Tipple A.F.V., *et al.* Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. Am. J. Infect. Control 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040>.

Cowen A. E. The clinical risks of infection associated with endoscopy. Can. J. Gastroenterol. Oakville, v.15, n. 5, p.321-331, May. 2001.

Costerton J.W. Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents. 1999. (11), 217-221.

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg, E.P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999. 284, 1318–1322.

Coraça-Hubér D.D., Fille, M., Hausdorfer J., *et al.* Evaluation of MBECTM – HTP biofilm model for studies of implant associated Infections. J. Orthop. Res. 2012. 1176 - 1180 <http://dx.doi.org/10.1002/jor.22065>.

DiazGranados C. A; Jones M. Y, Kongphet-Tran T *et al.* Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of flexible bronchoscope. Infection Control Hospital Epidemiology. 2009.

Dolan R. M. Biofilms: Microbial life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases. 2002. v. 8; n. 9.

Dolan R. M; Costerton W. Biofilms: Survival Mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 167-193. 2002.

Dolan R. M., Costerton J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Revelant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 2001. (15), 2, 167 – 193.

Epstein L, Hunter JC, Arwady A. *et al.* Nwe Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing

Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Associated with Exposure to Duodenoscopes. The Journal of American Medical Association. 2014. 312: 1447 - 1455.

Espigares E, Bueno A, Fernández-Crechuet M, *et al.* Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. J Hosp Infect. 2003. 55:137 - 40.

Fang Y., Shen Z., Li L. *et al.* A study of the efficacy of bacterial biofilm cleanout for gastrointestinal endoscopes. World Journal of Gastroenterology. 2010. 16: 1019 - 1024.

FDA (Food and Drugs Administration). News Release: FDA orders duodenoscope manufacturers to conduct postmarket surveillance studies in health care facilities. Oct 5, 2015b. Disponível em: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/UCM465639>

FDA (Food and Drugs Administration). Reprocessing medical devices in health care settings: validation methods and labeling guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff, March 17, 2015a. Disponível em: <http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-meddev-gen/documents/document>

FDA (Food and Drugs Administration). Staff. Cleared sterilants and high-level disinfectants with general claims for processing reusable medical and dental devices. March 2009. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM189448.pdf>

Fortes L; Shum C. Comparative cost-efficiency of the EVOTECHendoscope cleaner and reprocessor versus manual cleaning plus automated endoscope reprocessing in a real-world Canadian hospital endoscopy setting. BMC Gastroenterology. 2011. 11:105 <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/11/105>

Fushimi R, Takashima, M, Yoshikawa H. *et al.* Comparison of adenosine

triphosphate, microbiological load, and residual protein as indicators for assessing the cleanliness of flexible gastrointestinal endoscope. American Journal of Infection Control 2013;41:161-4.

Gastmeier P; Vonberg, R.P. *Klebsiella* spp. In endoscopy-associated infections: we may only be seeing the tip of the iceberg. Infection. 2014; 42, 15-21.

GESA. (Gastronterological Society of Austrlia). Cinical update Infection control in Endoscopy. 2011. 1 - 68.

Graziano K.U; Balsamo A.C; Lopes C.L.B.C. *et al.* Critérios para avaliação das dificuldades na limpeza de artigos de uso único. Rev. Latino Am. Enferm., Ribeirão Preto. 2006. v.14, n.1, 70-76.

Gökçen A., Vilcinskas A., Wiesner J. Biofilm-degrading enzymes from *Lysobacter gummosus*. Virulence 2014. 5 (3), 378 - 387.

Guy M; Vanhems P; Dananché C *et al.* Outbreak of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections related to contaminated bronchoscope suction valves, Lyon, France, 2014. Euro Surveill. 2016;21(28):pii=30286. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560>

ISO 15883-2005. Washer-disinfectors-part 5. Test soils and methods for demonstrating cleaning efficacy. Annex F. 2005.

Innovotech. MBEC Assay. For High – Throughput Antimicrobial Susceptibility Testing of Biofilms. Procedural Manual. Version 1.0. 2012.

Hadi R, Vickery K, Deva A. *et al.* Biofilm removal by medical device cleaners: comparison of two bioreactor detection assays. Am J Infect Control 2010;74:160- 7.

Hong; K. H; Lim, Y. J. Recent Update of Gastrointestinal Endoscope Reprocessing. Clin Endosc. 2013. 46: 267 – 273.

Holodniy M; Oda G; Schirmer P. L. *et al.* Results from a Large-Scale Epidemiologic look-Back investigation of Improperly Reprocessed Endoscopy Equipment. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2012.

Howie Rosimarie. Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. University of Manitoba. 2008.

Hevie R; Keevil C. W. Current limitations about the cleaning of luminal endoscopes. *Journal of Hospital Infection*. 2013. 83: 22 - 29.

Hu H, Johani K, Gosbell IB. *et al.* Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *J Hosp Infect*. 2015. 91: 35 - 44.

Kola A; Piening B; Pape U. F *et al.* An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumonia* associated to duodenoscopy. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2015.

Kampf G; BloB R; Martiny, H. Surface Fixation of dried blood by Glutaraldehyde and Peracetic acid. *Journal of Hospital Infection*. 2004. 57: 139 - 143.

Knudson L. Reprocessing complex surgical instruments requires adherence to manufacturers instructions. *AORN connections*. 2014.

[http://dx.doi.org/10.1016/S001-2029\(13\)01304-5](http://dx.doi.org/10.1016/S001-2029(13)01304-5)

Kovaleva J; Meessen N. E. L; Peters, F. T. M *et al.* Is bacteriologic surveillance in endoscopes reprocessing stringent enough? *Endoscopy*. 2009. 41: 913 - 916.

Kovaleva J; Peters F. T. M; Van Der Mei H. C. John E. D. *et al.* Transmission of Infection by Flexible Gastrointestinal Endoscopy and Bronchoscopy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013. v. 26, n.2.

Kovaleva J, Degener JE, Van der Mei HC. Mimicking disinfection and drying of biofilms in contaminated endoscopes. *Journal of Hospital Infection* 2010;76: 345-350.

Kovaleva J, Buss A. Usefulness of Bacteriological Monitoring of endoscope reprocessing. *Therapeutic Gastrointestinal Endoscopy* 2012; 9:141-162.

LaPlante K.L., Mermel L.A. In vitro activities of telavancin and vancomycin against biofilm-producing *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Enterococcus faecalis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. 53 (7), 3166 - 3169.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01642-08>.

Laverty G., Gorman S.P., Gilmore B.F. Biofilm eradication kinetics of the ultrashort lipopeptide C12-OOWW-HH2 utilizing a modified MBEC assayTM. *Chem. Biol. Drug.* 2015. 85, 645 - 652. <http://dx.doi.org/10.1111/cbdd.12441>.

Lee D.H, Kim D.B, Kim H.Y. *et al.* Increasing potential risks of contamination from repetitive use of endoscope. *American Journal of Infection Control* 2015: e1-e5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.01.017>

Lima A.L.M; Oliveira P.R.D; Carvalho V.C. Infecções em Pacientes Portadores de Dispositivos Ortopédicos. in: Carrara D; Strabelli T. M. V; UIP D. E. Controle de Infecção a Prática no terceiro Milênio. Ed. Guanabara. 2017.

Lindsay D; Holy A. V. Bacterial Biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection.* 2006.

Liu D, Lau Y .L, Chau Y.K, Pacepavicius G. Simple technique for estimation of biofilm accumulation. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1994. 53: 913 - 8.

Li L, Mendis N, Trigui H. *et al.* The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2014. 5: 258.

Machida H; Seki M; Yashiola N *et al.* Correlation between outbreaks of multidrug-

resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection and use of bronchoscopes suggested by Epidemiological analysis. Biol. Pharm. 2014.

Marion K., Freney J., James G. *et al.* Using an efficient biofilm detaching agent: an essential step for the improvement of endoscope reprocessing protocols. J. Hosp. Infect. 2006. 64, 136–142.

McDonnell G., Ehrman M., Kiess S. Effectiveness of the SYSTEM 1E Liquid Chemical Sterilant Processing System for reprocessing duodenoscopes. AJIC 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.01.008>

Nance WC, Dowd SE, Samarian D. *et al.* A high-throughput microfluidic dental plaque biofilm system to visualize and quantify the effect of antimicrobials. J Antimicrob Chemother 2013;68:2550-60.

Nelson DB. Recent advances in epidemiology and prevention of gastrointestinal endoscopy related infections. Current Opinion in Infectious Diseases. 2005.18: 326 - 330.

Nelson D. B; Muscarella L. F. Current issues in endoscope reprocessing and infection control during gastrointestinal endoscopy. World J. Gastroenterol. 2006. v. 25, n. 12.

Nomura K; Ogawa M; Miyamoto H *et al.* Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant *Mycobacterium chelonae* from bronchoscope washing machines. J. Hosp. Infect. , London. 2004. v. 32, n.4, p.185 - 8,

Ofstead C.L., Wetzeler H.P., Snyder A.K., *et al.* Endoscope reprocessing methods. A prospective study on the impact of human factors and automation. Gastroenterol. Nurs. 2010. 33 (4), 304 - 311.

Olson M.E., Ceri H., Mork D.W., *et al.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res. 2002. 66, 86 - 92.

Padoveze M. C. Limpeza, Desinfecção e Esterilização: Aspectos Gerais. In APECIH (Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção relacionada à Assistência a Saúde. Limpeza, Desinfecção e Esterilização de artigos em Serviços de Saúde. São Paulo: 1º Ed. 2010.

Pajkos A, Vickery K, Cossart Y. Is biofilm accumulation on endoscope tubing a contributor to the failure of cleaning and decontamination? *Journal of Hospital Infection*. 2004. 58: 224 - 229.

Parker A.E, Walker D.K, Goeres D.M. *et al*. Ruggedness and reproducibility of the MBEC biofilm disinfectant efficacy test. *J Microbiol Methods*. 2014. 102: 55 - 64.

Park S; Jang J. Y; Koo J. S. *et al*. A review of current disinfectants for gastrointestinal Endoscopic Reprocessing. *Clin Endosc*. 2013.

Picchiai, D; Farias, R. M. A visão sistêmica da lavanderia hospitalar: limites e propostas. *Revista de Gestao em Sistemas de Saúde*. 2013.

Pineau L; Desbuquois B; Marchetti B *et al*. Comparison of the fixate properties of five disinfectant solution. *Journal of Hospital Infection*. 2008a. 68, 171 – 177.

Pineau L., Villard E., Duc D.L. *et al*. Endoscope drying/storage cabinet: interest and efficacy. *Journal of Hospital Infection*. 2008b. (68), 59-65.

Pineau L, Phellippe ED. Evaluation of endoscope cleanliness after reprocessing: a clinical-use study. *Cent Serv*. 2013. 1: 22 - 7.

PHAC (Public Health Agency of Canada). Infection prevention and control guideline for flexible gastrointestinal endoscopy and flexible bronchoscopy. Public Health Agency of Canada. 2010. Disponível em: www.phac-aspc.gc.ca/nois-sinp/guide/endo/index-eng.php.

Prodanov C.C; Freitas E.C. Metodologia do Trabalho Científico: Métodos e Técnicas de pesquisa e do trabalho acadêmico. 2º Ed. Universida Feevall. Novo Hamburgo. Rio Grande de Sul. Brasil. 2013.

Psaltikidis E.M; Quelhas M.C.F. Desinfecção de Artigos. In APECIH (Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção relacionada à Assistência a Saúde. Limpeza, Desinfecção e Esterilização de artigos em Serviços de Saúde. São Paulo: 1º Ed. 2010.

Ren W., Xiaoyan S.M.D., Huang X., *et al.* Evaluation of detergents and contact time on biofilm removal from flexible endoscopes. American Journal of Hospital Infection. 2013. 41, e89 - e92.

Ren-Pei W; Hui-Jun Xi; Ke Qi. *et al.* Correlation between the growth of bacterial biofilm in flexible endoscopes and endoscopes reprocessing Methods. American Journal of Infection Control. 2014. 42: 1203 - 1206.

Ribeiro M. M. Avaliação da efetividade do reprocessamento do endoscópio gastrointestinal flexível. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011: tese (doutorado), 2011, 148p.

Ribeiro M. M; Oliveira A. C. Analysis of the air/water channels of gastrointestinal endoscopies as a risk fator for the transmission of microorganisms among patients. American Journal of Infection Control. 2012.

Ribeiro M. M; Oliveira A. C; Ribeiro, S. M. C. P *et al.* Effectiveness of flexible gastrointestinal Endoscope Reprocessing. Infection control and Hospital Epidemiology. 2013.

Roberts C.G., The role of biofilms in reprocessing medical devices. Am. J. Infect. Control. 2013. 41, S77 - S80.

Ross A. S; Baliga C; Verna P *et al.* A quarantine process for the resolution of

duodenoscope associated transmission of multidrug-resistant *Escherichia coli*. Gastrointestinal Endoscopy. 2015.

Rutala W. A., Weber D.J. Disinfection and sterilization: an overview. Am. J. Infect. Control. 2013. 41, S2 - S5.

Rutala W. A; Weber D.J. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, CDC. 2008.

Rutala W. A, Weber D.J. Reprocessing endoscopes: United States perspective. Journal of Hospital Infection. 2004; 56: 527 - 539.

SGNA (Society of Gastroenterology Nurses and Associates). Reprocessing of endoscopic Accessories and Valves. Gastroenterol Nurs., 2007.

SGNA (Society of Gastroenterology Nurses and Associates). Standards of infection control in reprocessing of flexible gastrointestinal endoscopes. Gastroenterology Nursing. 2013. 36: 293 - 303.

Sakae T. M; Sakae G. R. F. M; Ruzon R. F. L. Perfil epidemiológico dos exames de endoscopia digestiva alta no Hospital Nossa Senhora da Conceição de 2007 a 2010. Arquivos Catarinenses de Medicina. 2012.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. J Endod. 2010. 26:1820 - 3.

Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drugs resistant clinical isolates. J Med Microbiol. 2008. 57:966 - 73.

Srinivasan, A. Epidemiology and Prevention of Infections related to Endoscopy. Hospital Epidemiology. Current Science Inc. 2003.

Stewart, P. S; Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The Lancet. 2001. v. 358.

SOBEEG (Sociedade Brasileira de Enfermagem em Endoscopia e Gastrointestinal)
Muller S, Graziano K.U, Hoefel H.K; Agência Nacional de Vigilância Sanitária;
Sociedade Brasileira de Enfermagem em Endoscopia e Gastrointestinal. Manual de
limpeza e desinfecção de aparelhos endoscópicos [Internet]. Brasília; 2005 [citado
2012 junho 12]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/sobeeg_manual.pdf

SOBECC (Sociedades Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico, Recuperação
Anestésica e Central de Materiais e Esterilização). Práticas recomendadas. São
Paulo: SOBECC. 2013.

Spaulding F.H. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Block SS.
Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Fabinger; 1968. 517-
531.

Takei S., Hotomi M., Yamanaka N. Minimal biofilm eradication concentration of
antimicrobial agents against nontypeable *Haemophilus influenza* isolated from mid-
dle ear fluids of intractable acute otitis media. J. Infect. Chemother. 2013. 19, 504 -
509. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-013-0592-y>.

Trentin D. S; Giordani R. B; Macedo A. J. Biofilmes Bacterianos patogênicos:
aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Revista Liberato.
Novo Hamburgo. 2013. v. 14, n.22, p. 113 - 238.

Tipple, A. F. V; Souza, A. C. S; Abreu, N. B *et al.* Uso de glutaraldeído em serviços
de saúde e a segurança do trabalhador. R Enferm UERJ 2004; 12:186-91.

Tosh P. K; Disbot M; Duffy J *et al.* Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* Surgical
site infections after Arthroscopic Procedures: Texas, 2009. Infection Control and
Hospital Epidemiology. 2011.

Ubhayawardana D.L.N.L., Kottahachchi J., Weerasekera M.M., *et al.* Residual

bioburden in reprocessing side-view endoscopes used for endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP). *Endoscopy International* 2013. 1 (E12-E16.ucm253010.pdf).

Verfaillie C. J; Bruno M. J; Holt A. F. V *et al.* Withdrawal of a novel-design duodenoscope ends out-break of a VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Endoscopy*. 2015.

Vickrey K; Pajkos A; Cossart Y *et al.* Removal of biofilm from endoscopes: Evaluation of detergent efficiency. *AJIC major article*. 2004; 32:170 - 6.

Vickery K Ngo QD, Zou J *et al.* The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscopes tubing. *Am J Infect Control*. 2009; 37: 470 - 5.

Walker SL, Fourgialakis M, Cerezo B. *et al.* Removal of microbial biofilms from dispense equipment: the effect of enzymatic pre-digestion and detergent treatment. *J Inst Brew*. 2007. 113: 61 - 6.

Wendelboe, A. M; Baumbach, J. Blossom, D. B *et al.* Outbreak of cystoscopy related infections with *Pseudomonas aeruginosa*: New Mexico, 2007. *J Urol*. 2008.

Wendorf K.A, Kay M, Baliga C. *et al.* Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography-Associated AmpC *Escherichia coli* outbreak. *Infection Control e Hospital Epidemiology*. 2015. 36: 634 - 642.

WEO (World Endoscopy Organization). Desinfecção de Endoscópios-enfoque sensível aos recursos. World Endoscopy Organization. Practice Guidelines. 2011.

WHO (World Health Organization) World Health Organization and Pan American Health Organization. Decontamination and Reprocessing of Medical Devices for Health-care Facilities. 2016. <http://www.paho.org>

Zhang X; Kong J; Tang P *et al.* Current status of cleaning and disinfection for gastrointestinal endoscopy in China: A survey of 122 endoscopy units. Digestive and Liver Disease. 2011.

Zhong W., Alfa M., Zelenitsky S. *et al.* Simulation of cyclic reprocessing buildup on reused medical devices. Computers in Biology and Medicine. 2009. (39), 568 - 577. DOI:10.1016/j.combiomed.2009.04.003.

Zühlsdorf B, Emmrich M.H, Floss A *et al.* Cleaning efficacy of nine different cleaners in a washer-disinfector designed for flexible endoscopes. Journal of Hospital Infection. 2002. 52: 206 - 211.

APÊNDICE A

American Journal of Infection Control ■■ (2016) ■■ ■■

Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Infection Control

journal homepage: www.ajicjournal.org




Major Article

Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm

Cristiana da Costa Luciano MSc ^a, Nancy Olson BSc ^b, Anaclara Ferreira Veiga Tipple PhD ^a, Michelle Alfa PhD ^{b,c,*}

^a Department of Nursing, University Federal of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil
^b St. Boniface Research Centre, Winnipeg, MB, Canada
^c Department of Medical Microbiology, St. Boniface General Hospital, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

Key Words:
Endoscopes
biofilm removal
cleaning and high-level disinfection

Background: The objective of this study was to assess the ability of different detergent and disinfectant combinations to eradicate bacteria in traditional biofilm.

Methods: *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* were used to develop biofilm over 8 days. The biofilm on each minimum biofilm eradication concentration peg contained 8 log₁₀ colony forming units (CFU)/cm² of both bacteria. The detergents evaluated were as follows: Prolystica Enzymatic 2X, Prolystica Neutral 2X, Neodisher, and Endozime Bio-Clean. The disinfectants evaluated were as follows: glutaraldehyde, accelerated hydrogen peroxide, and ortho-phthalaldehyde. Biofilm removal was evaluated using viable count, protein and carbohydrate quantitation, and scanning electron microscopy.

Results: Only Prolystica Enzymatic 2X and Endozime Bio-Clean killed both *E. faecalis* (3.90 log₁₀ CFU/mL reduction) and *P. aeruginosa* (3.96 log₁₀ CFU/mL reduction) in suspension. None of the detergents tested could provide >1 log₁₀ CFU/cm² reduction for bacteria within biofilm. Any combination of detergent and high-level disinfectant reduced the level of both *E. faecalis* and *P. aeruginosa* within biofilm by 3–5 log₁₀ CFU/cm². Although the combination of Endozime Bio-Clean and glutaraldehyde provided a 6 log₁₀ reduction, it could not eliminate both bacteria within biofilm.

Conclusions: Our data indicate that if biofilm accumulates in flexible endoscope channels during repeated rounds of reprocessing, then neither the detergent nor high-level disinfectant will provide the expected level of bacterial removal or killing.

© 2016 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Flexible endoscopes are widely and increasingly used for diagnostic and therapeutic procedures.^{1–3} For example, gastrointestinal endoscopy is the gold standard for the diagnosis of gastric cancer, gastric ulcer, duodenal ulcers, and gastrointestinal conditions worldwide.¹⁴ Flexible endoscopes are classified as semicritical devices that come in contact with mucous membranes or nonintact skin¹⁴ and as such should be sterilized or receive a minimum of high-level disinfection (HLD).¹⁴ Although low temperature sterilization using plasma has been validated for some flexible endoscopes with short channels, the flexible endoscope with longer channels (eg,

those used for gastrointestinal procedures) requires ethylene oxide sterilization, which has long aeration requirements (eg, 18–24 hours). As such, the most commonly used approach to flexible endoscope reprocessing involves cleaning (generally with enzymatic detergent), followed by HLD with a liquid chemical disinfectant, rinsing, drying, and storage.^{4,5}

The complex design of flexible endoscopes with narrow lumens (that may contain an elevator wire) and crevices makes them extremely difficult to clean.² Changes in the integrity of endoscope surfaces resulting from frequent use can hinder the removal of organic material and microorganisms during reprocessing.^{4,5} Because of their complexity, frequent use, and narrow margin of safety during reprocessing, flexible endoscopes pose unique challenges for infection control.^{4,7,8} A single contaminated endoscope may be used hundreds of times each year and as such has the potential to infect or colonize a large number of patients. The level of surface alterations on the internal channel surface increases during repetitive use (each endoscope is typically used for 5–10 years), and the risk of

* Address correspondence to Michelle Alfa, PhD, St. Boniface Research Centre, 351 Tache Ave, Winnipeg, MB R2H 2A6, Canada.
 E-mail address: m.alfa@sbcc.ca (M. Alfa).

Funding/Support: The CAPES (Ministry of Education) of Brazil provided funding to C.C.L. to perform her research studies at the St. Boniface Research Centre (9999.010443/2014-02).

Conflicts of Interest: None to report.

0196-6553/© 2016 Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, Inc. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.03.040>

APÊNDICE B

Journal of Microbiological Methods 127 (2016) 224–229



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

A new buildup biofilm model that mimics accumulation of material in flexible endoscope channels



Cristiana da Costa Luciano^a, Nancy Olson^b, Patricia DeGagne^b, Rodrigo Franca^c,
Anaclara Ferreira Veiga Tipple^a, Michelle Alfa^{b,d,*}

^a Department of Nursing, University Federal of Goiás – UFG, Goiânia, Goiás, Brazil

^b St. Boniface Research Centre, Winnipeg, Manitoba, Canada

^c Department of Dentistry, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

^d Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2016

Received in revised form 20 June 2016

Accepted 20 June 2016

Available online 21 June 2016

Keywords:

Endoscopes channels

Build-up-biofilm

Cleaning and disinfection

ABSTRACT

The objective of this study was to develop a new build up biofilm (BBF) model that was based on repeated exposure to test soil containing *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* and repeated rounds of fixation to mimic the accumulation of patient material in endoscope channels during reprocessing. The new BBF model is a novel adaptation of the minimum biofilm effective concentration (MBEC) 96-well model where biofilm is formed on plastic pegs. The new MBEC-BBF model was developed over eight days and included four rounds of partial fixation using glutaraldehyde. There was 6.14 Log₁₀ cfu/cm² of *E. faecalis* and 7.71 Log₁₀ cfu/cm² of *P. aeruginosa* in the final BBF. Four detergents (two enzymatic and two non-enzymatic) were tested alone or in combination with orthophthalaldehyde, glutaraldehyde or accelerated hydrogen peroxide to determine if BBF could be either removed or the bacteria within the BBF killed. None of the detergents alone could remove the biofilm or reduce the bacterial level in the BBF as determined by viable count and scanning electron microscopy. The combination of detergents and disinfectants tested provided a 3 to 5 Log₁₀ reduction in viable bacteria but no combination could provide the expected 6 Log₁₀ reduction. Our data indicated that once formed BBF was extremely difficult to eliminate. Future research using the BBF model may help develop new cleaning and disinfection methods that can prevent or eliminate BBF within endoscope channels.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Flexible endoscopes are used for therapeutic procedures as well as diagnostic purposes including; visualization and sample collection (PHAC, 2010; AAMI, 2015). Endoscopic clinical techniques are continuing to expand and the number of endoscopic procedures per year has greatly increased (Kovaleva and Buss, 2012). Overall, the rate of infections attributed to transfer of infectious agents from contaminated endoscopes is low but recent publications have demonstrated that these rates may be higher than previously thought as there is poor documentation and reporting of such events (Ofstead et al., 2010). In the past few years there has been world-wide documentation of outbreaks associated with antibiotic-resistant organisms due to contaminated flexible

endoscopes (Aumeran et al., 2012; Carbonne et al., 2010), with recent USA outbreaks attributed to transmission of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) arising from endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) procedures (Wonderf et al., 2015; Ubhayawardana et al., 2013; Epstein et al., 2014). It has been difficult to understand the documented survival of microorganisms in flexible endoscopes despite repeated rounds of reprocessing using manufacturer validated cleaning and disinfection methods which should preclude biofilm development.

Accurate reprocessing of flexible endoscopes includes meticulous cleaning, followed by high level disinfection (HLD) or sterilization with further drying before storage (Pineau et al., 2008). Most contemporary flexible endoscopes cannot be heat-sterilized and have narrow internal channels that are difficult to clean and disinfect (Kovaleva et al., 2010; Rutala and Weber, 2013; SGNA, 2013; Fushimi et al., 2013). Organic material binds and inactivates many chemical disinfectants and some disinfectants such as glutaraldehyde and alcohol fix protein, thereby creating a physical barrier of denatured protein that can shield microorganisms from subsequent HLD (GESA, 2011).

* Corresponding author at: St. Boniface Research Centre, 351 Tache Avenue, Winnipeg, Manitoba R2H 2A6, Canada.

E-mail addresses: crisgenetica@gmail.com (C. da Costa Luciano), nolson@sbrcc.ca (N. Olson), pdgagne@sbrcc.ca (P. DeGagne), Rodrigo.Franca@umanitoba.ca (R. Franca), anaclara@fen.ufg.br (A.F.V. Tipple), malfa@sbrcc.ca (M. Alfa).