

FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLADAS DE AMBIENTE DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BIOFILM FORMATION ISOLATED FROM INTENSIVE CARE UNIT ENVIRONMENT****FORMACIÓN DE BIOFILM DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AISLADAS DE AMBIENTE DE UNIDAD DE TERAPIA INTENSIVA**

Paulo Alison Rocha Tonon¹
Bruna Mariana de Moraes Hondo¹
Caroline Lucio Moreira²
Joyce Marinho de Souza³
Caio Ferreira de Oliveira⁴

Resumo: A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça global em ascensão, sobretudo no ambiente hospitalar, onde microrganismos multirresistentes (MR) agravam os quadros de infecções. Dentre os principais MR causadores de infecções hospitalares, destaca-se *Klebsiella pneumoniae*, que pode produzir biofilme e se perpetuar no ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo e temperatura na formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de ambiente de UTI. A capacidade de formar biofilme *in vitro* foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços com fundo plano em caldo TSB acrescido de 1% de glicose, nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas, nas temperaturas de 25 e 36°C. Foram avaliados 6 isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Todos os isolados foram classificados como fracos produtores de biofilme nos tempos de 2 e 4 horas, à temperatura de 25 e 36°C. O isolado L38-A foi moderado produtor após 8 horas de incubação (25°C) e forte produtor nos tempos de 12 e 24 horas, tanto a 25 quanto a 36°C. O isolado L40-A foi classificado como moderado produtor de biofilme nos tempos de 8, 12 e 24 horas em ambas as temperaturas. Os demais isolados foram fracos produtores, em todas as temperaturas e tempos analisados. Medidas eficazes de desinfecção do ambiente são necessárias para minimizar o risco de infecções por esses microrganismos, visto que eles foram encontrados no ambiente de UTI.

Descritores: Biofilme. Infecção Hospitalar. Gram-negativo.

¹Curso de Farmácia. Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, São Paulo Brasil.

²Biomédica. Mestrado em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil.

³Biomédica. Doutorado em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Docente do Departamento de Medicina, Faculdades de Dracena – UNIFADRA, Dracena, São Paulo, Brasil. Mestre em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: caioferreira.biomed@gmail.com

Abstract: Antimicrobial resistance is a rising global threat, especially in the hospital environment where multiresistant (MR) microorganisms can aggravate infection. Among the main MRs that cause nosocomial infections, there is *Klebsiella pneumoniae*, which can produce biofilm, leading to persistence in the environment. The aim of this work was to evaluate the influence of time and temperature on biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae*, isolated from the ICU environment. Capacity of in vitro biofilm formation was performed in 96-well flat-bottomed polystyrene plates in TSB broth plus 1% glucose, at the times of 2, 4, 8, 12 and 24 hours, at temperatures of 25 and 36°C. Six isolates of *Klebsiella pneumoniae* were evaluated. All isolates were classified as poor biofilm producers at the time of 2 and 4 hours at 25 and 36°C. Sample L38-A was classified as moderate producer after 8 hours incubation (25°C) and strong producer at 12 and 24 hour (25 and 36°C). Sample L40-A was classified as a moderate biofilm producer at times of 8, 12 and 24 hours at both temperatures. The remaining isolates were weak producers at all temperatures and times analyzed. Effective measures to disinfect the environment are necessary to minimize the risk of infections by these microorganisms, since they were found in the Intensive Care Unit environment.

Descriptors: Biofilm. Nosocomial Infection. Gram-negative.

Resumen: La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza global en ascenso, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde microorganismos multirresistentes (MR) agravan los cuadros de infecciones. Entre los principales MR causantes de infecciones hospitalarias, destaca *Klebsiella pneumoniae*, que puede producir biopelículas (biofilm) y perpetuarse en el ambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del tiempo y temperatura en la formación de biofilm por *Klebsiella pneumoniae*, aisladas de ambiente de UCI. La capacidad de formar biofilm in vitro se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos fondo plano en caldo TSB más el 1% de glucosa, en los tiempos de 2, 4, 8, 12 y 24 horas, a las temperaturas de 25 y 36 °C. Se evaluaron 6 aislados de *Klebsiella pneumoniae*. Todos los aislados fueron clasificados como débiles productores de biofilm en los tiempos de 2 y 4 horas, a una temperatura de 25 y 36 °C. El aislado L38-A fue moderado productor después de 8 horas de incubación (25 °C) y fuerte productor en los tiempos de 12 y 24 horas, tanto a 25 como a 36 °C. El aislado L40-A fue clasificado como moderado productor de biofilm en los tiempos de 8, 12 y 24 horas en ambas temperaturas. Los demás aislados fueron débiles productores, en todas las temperaturas y tiempos analizados. Las medidas eficaces de desinfección del ambiente son necesarias para minimizar el riesgo de infecciones por estos microorganismos, ya que se encontraron en el ambiente de UCI.

Descriptores: Biofilm. Infección Hospitalaria. Gram-negativa.

INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça global em ascensão, sobretudo no ambiente hospitalar, onde microrganismos multirresistentes (MR - resistentes a um ou mais antimicrobiano de três ou mais classes testadas) agravam os quadros de infecções e tornam os tratamentos mais caros e demorados (HOWDEN et al., 2013). Este fenômeno tem como consequências o fracasso na terapia antimicrobiana, incremento na morbidade e mortalidade e sofrimento de pacientes e familiares (CASTELLANOS et al., 2014).

Os MR tornam-se mais preocupantes em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), que são definidas como toda e qualquer infecção que acomete o indivíduo, seja em instituições hospitalares, atendimentos ambulatoriais na modalidade de hospital dia ou domiciliar, e que possa estar associada a algum procedimento assistencial, seja ele terapêutico ou diagnóstico. Dentre todos os locais de internação de pacientes, a Unidade de Terapia Intensiva (UTI) é, sem dúvida, o local de maior risco para aquisição de MR (OLIVEIRA et al., 2012).

As UTIs, adulta ou pediátrica, são unidades destinadas ao atendimento de pacientes clinicamente graves, que necessitam de monitorização e suporte contínuos de suas funções vitais. É considerada uma área crítica, tanto pela instabilidade hemodinâmica dos pacientes internados, quanto pelo risco elevado de desenvolver IRAS, visto que os pacientes são submetidos a procedimentos médicos invasivos (cateterismo vesical, cateteres venosos, intubações, traqueostomia, ventilação mecânica), são pacientes que fazem uso de imunossupressores, muitas vezes com doenças crônicas e traumatizados, e estão com sua imunidade debilitada (CARVALHO, 2011).

Dentre os microrganismos classicamente descritos como causadores de IRAS, destaca-se o grupo “ESKAPE”, composto pelos microrganismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*. São assim agrupados para enfatizar que atualmente causam a maioria das IRAS nos Estados Unidos da América, possuindo a habilidade de “escapar” dos antimicrobianos (do inglês, *escape*) (NNISSR, 2004).

Os bacilos Gram-negativos desse grupo (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) podem apresentar diversos mecanismos de resistência, dentre eles enzimas carbapenemases, β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), β -lactamases AmpC adquiridas, além das metalo- β -lactamases, recentemente descritas no Brasil (BOUCHER et al., 2009; BARROS et al., 2015).

O potencial infeccioso desses MR não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos do hospedeiro, mas também devido à produção de muitas substâncias extracelulares (fatores de virulência), algumas delas enzimas e outras consideradas toxinas. A formação de biofilme, uma forma de vida microbiana séssil caracterizada pela adesão de microrganismos a alguma superfície, é um importante fator de virulência que contribui para a cronicidade dos processos infecciosos. Os biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos que apresentam predisposição de aderir a superfícies úmidas, multiplicar-se e concentrar-se em uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por estes próprios microrganismos, uma vez que a produção de substâncias poliméricas extracelulares aumenta a adesão de microrganismos às superfícies (CRUZ-CÓRDOVA et al., 2014).

Acredita-se que a formação de biofilme por *K. pneumoniae* contribua para sua persistência no ambiente, muitas vezes resistentes aos desinfetantes utilizados em ambiente hospitalar. As bactérias dentro do biofilme são 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que as células planctônicas, mas seu mecanismo de resistência ainda é pouco conhecido (ABDULHASAN et al., 2016; CHUNG, 2016).

Portanto, avaliar a influência do tempo e temperatura na formação de biofilme por *K. pneumoniae*, isoladas de ambiente de UTI, mostra-se importante para contribuir com a adoção de protocolos de higiene e desinfecção dos ambientes de assistência à saúde (sobretudo UTI), proporcionando maior segurança aos pacientes, funcionários e frequentadores desses ambientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados utilizados nesse trabalho foram coletados no dia 20 de setembro de 2016, nos ambientes de UTIs do Hospital Regional de Presidente Prudente (SP). Os leitos da UTI neonatal foram denominados L1 a L10, UTI coronariana L11 a L20 e os leitos da UTI adulto L21 a L40. Para cada ambiente de leito de UTI foi coletado um swab da seguinte forma: um swab esterilizado foi mergulhado em caldo tríptico de soja (TSB) e depois friccionado sobre as superfícies do leito, borda de leito, aparelhos e mobiliário, em regiões de frequente contato com mãos e fômites. Após a coleta, os swabs foram mergulhados no mesmo TSB original, e agitados, para que os microrganismos coletados fossem inoculados nesse caldo. Os 40 caldos TSB (devidamente identificados, um para cada leito de UTI) foram então incubados em estufa microbiológica, por 24 horas, à temperatura de 36°C para pré-enriquecimento e depois semeados em ágar MacConkey, incubados sob as mesmas condições. Para identificação desses microrganismos, as colônias crescidas em ágar MacConkey foram inoculadas nos seguintes meios: ágar TSI (*triple sugar iron*), ágar Citrato Simmons, ágar Fenilalanina e meio SIM (citrato ferroso de amônio e tiosulfato de sódio). Adicionalmente, foram utilizados os meios Arginina, Ornitina e Lisina para diferenciação das bactérias em nível de gênero e espécie. Após o crescimento nesses meios, eles foram identificados e interpretados segundo Koneman e colaboradores, 2008.

Formação e quantificação de biomassa de biofilme

A capacidade de formar biofilme *in vitro* foi realizada em placas de poliestireno de 96 poços com fundo plano em caldo TSB acrescido de 1% de glicose. A biomassa dos biofilmes foi medida usando a coloração com cristal violeta (2% v/v), nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas, nas temperaturas de 25 e 36°C (STEPANOVIC et al., 2007).

Para a montagem das placas, foram aplicados em cada poço 180µL de caldo TBS acrescido de 1% de glicose, logo em seguida adicionou-se 20µL das suspensões bacterianas (turbacão semelhante ao tubo 0,5 da escala de McFarland), em quintuplicata, sendo utilizado como controle negativo o caldo TBS sem inóculo bacteriano e como controle positivo, a cepa ATCC® 25923 de *S. aureus*, uma vez

que esta cepa é preconizada como controle positivo para ensaios de biofilme. Para reduzir a possibilidade de contaminação, as etapas anteriores foram realizadas em fluxo laminar, a fim de minimizar erros e fornecer informações confiáveis. Posteriormente, as placas foram tampadas e incubadas de acordo com suas temperaturas correspondentes: 25°C, sendo esta monitorada por termômetro digital e 36°C (estufa microbiológica), sendo realizadas leituras nos tempos acima descritos.

Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi descartado e cada poço foi lavado três vezes com 200µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) esterilizada, aguardando-se, então, a secagem total das placas. Em seguida, realizou-se a fixação do biofilme, utilizando em cada poço 150µL da solução metanol absoluto por 20 minutos, sendo então esvaziados os poços e secagem ao ar livre. Posteriormente, as microplacas foram coradas com 200µL de solução de cristal violeta (2%, v/v) durante 15 minutos à temperatura ambiente, desprezando-se o excesso e lavagem das microplacas sob água corrente.

Em seguida, foi adicionado 150µL de ácido acético glacial 30% em cada poço, sendo as placas tampadas para minimizar a evaporação da solução. Aguardaram-se 20 minutos em temperatura ambiente. Decorrido este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Mindray, modelo MR-96A), em comprimento de onda de 570nm.

O valor das densidades ópticas para cada isolado (DOc) foi obtido pela média dos três poços, após descarte dos dois valores discrepantes, onde a média dos valores foram comparados com a densidade óptica do controle negativo. Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das densidades ópticas (DO) relacionada com os resultados obtidos para a DOc. As categorias foram baseadas nos critérios estabelecidos por Stepanovic e colaboradores (2007): não produtor de biofilme se $DO \leq DOc$; fraco produtor (+) se $DOc < DO \leq 2 \times DOc$; moderado produtor (++) se $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$; ou fortemente produtor (+++) se $4 \times DOc < DO$.

RESULTADOS

K. pneumoniae foi isolada somente em 6 leitos (diferentes) da UTI adulta (leitos 31, 32, 33, 37, 38 e 40), todos com pacientes hospitalizados há mais de 1 dia, com uso de antimicrobianos. Na tabela 1, observa-se que todos os isolados foram classificados como fracos produtores de biofilme nos tempos de 2 e 4 horas, à temperatura de 25 e 36°C. O isolado L38-A foi moderado produtor após 8 horas de incubação (25°C) e forte produtor nos tempos de 12 e 24 horas, tanto a 25 quanto a 36°C. O isolado L40-A foi classificado como moderado produtor de biofilme nos tempos de 8, 12 e 24 horas em ambas as temperaturas. Os demais isolados foram fracos produtores, em todas as temperaturas e tempos analisados.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *K. pneumoniae* do ambiente de UTI do Hospital Regional de Presidente Prudente (SP), quanto à formação de biofilme em placas de poliestireno, segundo Stepanovic et al., (2007).

ISO	2 horas		4 horas		8 horas		12 horas		24 horas	
	25°C	36°C	25°C	36°C	25°C	36°C	25°C	36°C	25°C	36°C
L31-A	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
L32-A	NP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
L33-C	NP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
L37-A	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP	FP
L38-A	FP	FP	FP	FP	MP	FOP	FOP	FOP	FOP	FOP
L40-A	FP	FP	FP	FP	MP	MP	MP	MP	MP	MP

Legenda: ISO – isolados; NP – não produtor de biofilme; FP – fraco produtor de biofilme; MP – moderado produtor de biofilme; FOP – forte produtor de biofilme.

DISCUSSÃO

As IRAS têm sido um problema de saúde pública que envolve morbidade, mortalidade e muitos custos. O índice de IRAS vem crescendo cada vez mais, por isso é de extrema importância a presença de profissionais que zelem pela saúde do paciente que está debilitado. Aproximadamente dois terços das IRAS são de origem autógena, ou seja, a infecção tem origem a partir da microbiota do paciente que, por sua vez, pode ter origem comunitária ou intra-hospitalar. Nas duas situações, a colonização precede a infecção, o que torna difícil determinar se o paciente trouxe o

microrganismo da comunidade ou adquiriu de fonte exógena durante a internação (PEREIRA et al., 2005; PASTA et al., 2008; RENNER, CARVALHO, 2013).

Os resultados desse estudo mostram a presença de *K. pneumoniae* no ambiente de UTI, o que predispõe a translocação desses microrganismos do ambiente para o paciente, caso haja quebra no protocolo de segurança do paciente. Além disso, as mãos e fômites podem carrear esses microrganismos de um leito para o outro, disseminando uma cepa de microrganismo por todo o hospital ou ambiente de assistência à saúde.

K. pneumoniae pertence à família *Enterobacteriaceae* e promove infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos. É um problema particular para pacientes com diabetes mellitus que levam a infecções do “pé diabético” e osteomielite, além de outras comorbidades. Uma vez estabelecida a infecção, *K. pneumoniae* produz biofilme que permite a evasão das defesas do hospedeiro. Além disso, sintetiza uma cápsula polissacarídica protetora externa, que suprime os componentes do sistema complemento, particularmente C3b, contribuindo para a evasão do sistema imunológico (DIAGO-NAVARRO et al., 2014; GRUPTA et al., 2016; TAHA et al., 2018).

Da mesma forma que no hospedeiro, *K. pneumoniae* pode produzir biofilme em superfícies abióticas, como beira de leito e equipamentos que ficam próximos ao paciente (SANCHEZ et al., 2013; SEIFI et al., 2016). Observa-se neste estudo que a maioria dos isolados foram fracos produtores de biofilme (exceto os isolados L38-A e L40-A), sobretudo com pouco tempo de incubação. Esse achado corrobora com os protocolos de higienização de serviços de saúde, que preconizam a higienização três vezes ao dia (em média de 8 em 8 horas) para as áreas críticas, como é o caso de UTI (ANVISA, 2012).

Outro achado importante se refere à temperatura: as condições térmicas das UTIs devem proporcionar conforto quando mantidas estáveis e iguais nos ambientes, entre 20 e 24°C (ANVISA, RDC N° 50, 2002). Pelo visto nesse trabalho, a temperatura não influenciou na produção de biofilme, o que, em teoria, não pode ser entendido como uma regra, pois foram utilizados poucos isolados. Rossatto e colaboradores (2017) mostraram que temperaturas elevadas (35 e 40°C) e adição

de glicose e cloreto de sódio favorecem a formação de biofilme de *Staphylococcus* em superfícies abióticas, bem como a presença de componentes do hospedeiro, como plasma, promove a formação de biofilme, sobretudo de isolados clínicos. Embora sejam microrganismos totalmente diferentes dos utilizados nesse estudo, trabalhos futuros devem ser desenvolvidos para investigar melhor a influência da temperatura da formação de biofilme de *K. pneumoniae*.

CONCLUSÕES

Dos 6 isolados de *K. pneumoniae*, somente 2 são bons produtores de biofilme, após 8 horas de incubação tanto à temperatura de 25 quanto 36°C. Os demais isolados são fracos produtores, em todas as condições testadas. Estudos adicionais devem ser realizados para elucidar melhor a influência do tempo e temperatura na formação de biofilme de *K. pneumoniae*, assim como deve-se investigar a influência de outras substâncias no ambiente que podem ou não auxiliar esses microrganismos a produzirem biofilme. Medidas eficazes de desinfecção do ambiente são necessárias para minimizar o risco de infecções por esses microrganismos, visto que eles foram encontrados no ambiente de UTI.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULHASAN, G. A.; ALZUBAIDY, S. K.; ABED, I. J. Effect of sub-inhibitory and inhibitory concentrations of some antibiotics and rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) on biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. **World Journal of Experimental Biosciences**, v. 4, p. 130–5, 2016.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002. **Dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde**. Brasília - DF; 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0050_21_02_2002.pdf/ca7535b3-818b-4e9d-9074-37c830fd9284>. Acesso em: 14 de out. 2018.

BARROS, E. M. L. R. et al. First detection of metallo- β -lactamases in nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Alagoas, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 5, p. 291-295, 2015.

BOUCHER, H. W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 1-12, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Segurança do paciente em serviços de saúde: limpeza e desinfecção de superfícies**. Brasília: Anvisa, 2012.

CARVALHO, M. M. et al. Infecções hospitalares nas Unidades de Terapia Intensiva em um hospital público. **Revista Interdisciplinar NOVAFAPI**, Teresina. v.4, n.4, p.42-48, 2011.

CASTELLANOS, T. G.; MARSHAL, A. C.; RODRÍGUEZ, D S. Mecanismos de resistência a betalactâmicos en bacterias gram negativas. **Revista Cubana de Salud Pública**, v. 40, n. 1, p. 129-135, 2014.

CHUNG, P. Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 20, p. 1–21, 2016.

CRUZ-CÓRDOVA, A. et al. Pathogenic determinants of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains associated with the persistence in the hospital environment. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 1, n. 71, p. 15-24, 2014.

DIAGO-NAVARRO, E. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, p. 803–813, 2014.

GUPTA, P.; et al. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. **Archives of microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1–15, 2016.

HOWDEN, B. P.; PELEG, A. Y.; STINEAR, T. P. The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. **Infection Genetics and Evolution**, v. 21, p. 575-582, 2013.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008.

NNISSR – National Nosocomial Infections Surveillance System Report. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 470–485, 2004.

OLIVEIRA, A. C. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 89-96, 2012.

PASTA, A. A. C. et al. Prevalência e Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de B-lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do Hospital Universitário/UEL. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 2, p. 137-141, 2008.

PEREIRA, M. S. et al. A infecção nosocomial e suas implicações para o cuidar da enfermagem. **Texto contexto – Enfermagem**, v. 14, n. 2, p. 250-257, 2005.

RENNER, J. D. P.; CARVALHO, E. D. Microrganismos isolados de superfícies da UTI adulta em um hospital do Vale do Rio Pardo – RS. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 1-5, 2013.

ROSSATTO, F. C. P.; PINTO, J. B.; COSTA, G. A.; FRAZZON, A. P. G. *In vitro* biofilm formation ability of staphylococci under different growth conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 5, n. 2, p. 12-19, 2017.

SANCHEZ, C. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 47, 2013.

SEIFI, K. et al. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 198, n. 1, p. 1-15, 2016.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

TAHA, O. A. et al. Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Diabetic Foot Patients. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. p. 21-27, 2018.