

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E TEMPO NA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE AMBIENTE DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA***INFLUENCE OF TEMPERATURE AND TIME ON BIOFILM FORMATION OF STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLATED FROM INTENSIVE CARE UNIT ENVIRONMENT******INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE STAPHYLOCOCCUS SPP. AISLADOS DE AMBIENTE DE UNIDAD DE TERAPIA INTENSIVA***

Larissa Amianti de Araujo¹
Mayla Lopes Beneti¹
Dhára Cavalcanti de Oliveira¹
Ana Paula Marques Andrade¹
Caroline Lucio Moreira²
Caio Ferreira de Oliveira³

Resumo: *Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais causadores de infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS), sendo o mais virulento e conhecido do gênero. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade produtora de biofilme de isolados de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus*, de ambiente de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital de Presidente Prudente, interior do Estado de São Paulo. 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. Os resultados obtidos revelaram que *Staphylococcus* são melhores produtores de biofilme após 8 horas de incubação, e mais isolados de *Staphylococcus* produzem biofilme a 36°C após 24 horas de incubação que a temperatura de 20°C, no mesmo tempo, indicando que a temperatura interfira na produção de biofilme de *Staphylococcus* isolados de ambiente. 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: Infecção Hospitalar. Virulência. Desinfecção.

¹ Biomédica. Graduação em Biomedicina. Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

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

³ Docente 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: *Staphylococcus aureus* is a major cause of health care-related infection (IRAS), because of high virulence presented. This work aimed to evaluate the biofilm production capacity of *Staphylococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* samples obtained from the Intensive Care Unit environment of a Hospital in Presidente Prudente, located in São Paulo state. The ability to form biofilm in vitro was performed on 96-well flat bottom polystyrene plates in TSB broth supplemented with 1% glucose. The results showed that *Staphylococcus* are better biofilm producers after 8 hours of incubation, higher number of isolated *Staphylococcus* samples produced biofilm at 36°C after 24 hours of incubation than the temperature of 20°C at the same time, indicating that the temperature interferes in the production of isolated *Staphylococcus* biofilm environment. 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: Hospital Infection. Virulence. Disinfection.

Resumen: *Staphylococcus aureus* es considerado uno de los principales causantes de infección relacionada a la asistencia a la salud (IRAS), es el más virulento y más conocido del género. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad productora de biofilm de aislados de *Staphylococcus* spp. y *Staphylococcus aureus*, de muestras de ambiente de Unidad de Terapia Intensiva de un Hospital de Presidente Prudente, interior del estado de São Paulo. La capacidad de formar biofilm in vitro se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano en caldo TSB más el 1% de glucosa. Los resultados obtenidos revelaron que *Staphylococcus* son mejores productores de biofilm después de 8 horas de incubación, y más aislados de *Staphylococcus* producen biofilm a 36°C después de 24 horas de incubación que a una temperatura de 20°C, al mismo tiempo, indicando que la temperatura interfiere en la producción de biofilm de *Staphylococcus* aislados de ambiente. 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 UTI.

Descritores: Infección Hospitalaria. Virulencia. Desinfección.

INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é composto por 52 espécies e 28 subespécies de bactérias, que possuem como características: células esféricas, coradas positivamente por Gram, de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, catalase positivas, ocorrendo isoladamente, em pares, em tétrades ou em cadeias curtas (3 a 4 células), dividindo-se em mais de um plano, formando arranjos irregulares de células (LPSN, 2018). A capacidade de produzir coagulase, que reage com fibrinogênio do plasma

transformando-o em fibrina, reúne as espécies em dois grupos: os estafilococos coagulase positivos (CoPS, do inglês *coagulase-positive staphylococci*), incluindo as espécies: *S. aureus* subespécie *aureus*, *S. aureus* subespécie *anaerobius*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subespécie *coagulans* e *S. delphini*, e os estafilococos coagulase negativos (CoNS, do inglês *coagulase-negative staphylococci*), incluindo todas as demais espécies (LPSN, 2018; SCHLEIFER, BELL, 2015).

Os estafilococos são importantes patógenos dos seres humanos, causando um amplo espectro de doenças sistêmicas que ameaçam a vida humana, incluindo infecções de pele, tecidos moles, ossos, trato urinário, bem como infecções oportunistas. As espécies mais comumente associadas às doenças humanas são *S. aureus* (o mais virulento e o mais conhecido membro do gênero), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* (MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2009).

O potencial infeccioso dessas espécies não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também devido à produção de muitas substâncias extracelulares (fatores de virulência), algumas delas enzimas e outras consideradas toxinas, como coagulases, hialuronidases, catalases, DNase, lipases, proteases, hemolisinas, leucocidina, toxina do choque tóxico e enterotoxinas (BROOKS, 2014).

Outro importante fator de virulência é a formação de biofilme, uma forma de vida microbiana sésil caracterizada pela adesão de microrganismos a alguma superfície, que contribui para a cronicidade dos processos infecciosos por *Staphylococcus*. 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 produzidas por estes próprios microrganismos, uma vez que a produção dessas substâncias aumenta sua adesão às superfícies (CRUZ-CÓRDOVA, 2014; OTTO, 2018).

Os microrganismos liberados dos biofilmes podem ser fonte de contaminação em seres humanos, alimentos e objetos. Quando esses patógenos

formam biofilmes, tornam-se mais resistentes à radiação ultravioleta e em tratamento com agentes antimicrobianos e sanitizantes, o que dificulta a sua eliminação.

A formação do biofilme envolve inúmeras fases, tais como: (1) ligação inicial de células planctônicas para a superfície, (2) produção de matriz polimérica extracelular (EPS), (3) formação de microcolônia e secreção de sinais químicos, (4) maturação da arquitetura biofilme e (5) de dispersão de células (WINKELSTRÖTER et al., 2014). A presença de biofilme de *Staphylococcus* no ambiente hospitalar, sobretudo no ambiente de Unidade de Terapia Intensiva (UTI), pode predispor pacientes, trabalhadores e visitantes à aquisição de infecções por esses microrganismos. Portanto, avaliar a capacidade de formação de biofilme sob influência de diferentes temperaturas ao longo do tempo é importante para o conhecimento desse processo e adoção de medidas efetivas para sua eliminação, proporcionando maior segurança aos usuários desse setor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados utilizados neste trabalho foram coletados dos leitos da UTI neonatal e denominados L1 a L10, da UTI coronariana de L11 a L20 e dos leitos da UTI adulto de L21 a L40. Todas as coletas foram realizadas no dia 20 de setembro de 2016 nos ambientes de UTIs do Hospital Regional de Presidente Prudente (SP). Para a coleta de cada ambiente de leito de UTI foi utilizado o seguinte procedimento: 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 (Koneman et al., 2008). Posteriormente à coleta, os swabs foram mergulhados no mesmo TSB original, e agitados para inoculação dos microrganismos coletados no caldo. Foram obtidos no total 40 caldos TSB, devidamente identificados (um para cada leito de UTI) e incubados em estufa microbiológica, por 24 horas, à temperatura de 36°C para pré-enriquecimento, seguidos da semeadura em ágar manitol salgado (seletivo e diferencial para o gênero) e incubados sob as mesmas condições descritas acima. As colônias crescidas nesse ágar foram isoladas e identificadas 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. Para a quantificação da biomassa dos biofilmes foi utilizada a coloração com cristal violeta (2% v/v), nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas, nas temperaturas de 25°C e 36°C (STEPANOVIC et al., 2007).

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 (DOc). Os isolados foram classificados em quatro categorias, de acordo com a média das densidades ópticas (DO): 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

Foram isolados 28 *Staphylococcus* spp., dos quais 10 estavam presentes em leitos da UTI neonatal, 4 na UTI coronariana e 14 na UTI adulto, e 13 *Staphylococcus aureus*, sendo 1 na UTI neonatal, 6 na UTI coronariana e 6 na UTI adulto, totalizando 41 isolados.

Os resultados desse estudo (Tabela 1) mostraram que, a 36°C, mais isolados produziram biofilme em comparação com a temperatura de 20°C. Observou-se que no tempo de 4 horas a 20°C somente 2 isolados produziram biofilme, enquanto que na temperatura de 36°C com o mesmo tempo de incubação, 7 isolados produziram biofilme, sendo 5 identificados como *Staphylococcus* spp. e 2 como *S. aureus*.

Para o tempo de 8 horas à temperatura de 20°C, 34 isolados não produziram biofilme enquanto 7 produziram fracamente: 6 *Staphylococcus* spp. e um isolado, identificado como *S. aureus* (L15A). No mesmo tempo à temperatura de 36°C observa-se que 23 isolados não produziram biofilme, enquanto que 17

produziram fracamente: 11 *Staphylococcus* spp. e 6 *S. aureus*. Somente um isolado foi fortemente produtor nesse tempo e temperatura: L3A, identificado como *Staphylococcus* spp.

Após 24 horas de incubação a 20°C, 17 isolados não produziram biofilme, enquanto que 24 foram fracos produtores, sendo 20 *Staphylococcus* spp. e 4 *S. aureus*. A 36°C somente 2 isolados não produziram biofilme: L4A e L35A, ambos *Staphylococcus* spp.; 22 isolados produziram fracamente biofilme: 16 *Staphylococcus* spp. e 6 *S. aureus*; 12 foram classificados como moderados produtores de biofilme, sendo 9 *Staphylococcus* spp. e 3 *S. aureus*; 5 isolados foram fortes produtores de biofilme: um *Staphylococcus* spp. e 4 *S. aureus*.

DISCUSSÃO

A formação do biofilme pode sofrer interferência de numerosos fatores, entre os principais pode-se destacar: o pH, a temperatura, a força iônica do meio, a velocidade de escoamento, a concentração de nutrientes do meio líquido, as características dos microrganismos presentes no meio líquido, o tipo de material e a rugosidade da superfície sólida, a presença de material particulado, de micronutrientes e de agentes antimicrobianos (OTTO, 2018).

O estudo realizado mostra que *Staphylococcus* spp. produzem biofilme melhor a temperaturas mais elevadas (36°C) em comparação com temperaturas amenas (20°C). Além disso, na cinética de formação do biofilme, o tempo é fundamental para sua produção, visto que os poucos isolados que foram bons produtores de biofilme somente apresentaram esse resultado após 8 horas de incubação.

Tabela 1. Classificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* quanto à formação de biofilme segundo Stepanovic et al. (2007), nos tempos de 4, 8 e 24 horas, nas temperaturas de 20 e 36°C.

ISO ¹	ESP ²	4h 20°C	4h 36°C	8h 20°C	8h 36°C	24h 20°C	24h 36°C
L1B	spp	NP	NP	NP	FP	FP	MP
L2A	spp	NP	NP	NP	FP	FP	MP
L3A	spp	NP	FP	NP	FOP	FP	FOP

L5A	spp	NP	NP	FP	NP	FP	MP
L6A	spp	NP	NP	NP	FP	FP	MP
L7B	spp	NP	FP	NP	FP	FP	MP
L8A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	FP
L10A	spp	NP	FP	NP	FP	FP	MP
L11A	spp	NP	NP	NP	FP	FP	FP
L12A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	MP
L20A	spp	FP	NP	FP	NP	FP	FP
L22A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	FP
L23A	spp	NP	FP	FP	FP	FP	FP
L25A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	MP
L26A	spp	NP	NP	FP	FP	FP	FP
L27A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	FP
L30A	spp	NP	NP	FP	NP	FP	FP
L34A	spp	NP	NP	NP	NP	FP	FP
L14B	spp	NP	NP	FP	NP	FP	FP
L21B	spp	NP	NP	NP	NP	FP	FP
L31B	spp	NP	NP	NP	FP	NP	FP
L38B	spp	NP	NP	NP	FP	NP	FP
L39C	spp	NP	NP	NP	NP	NP	MP
L40D	spp	NP	NP	NP	NP	NP	FP
L4A	spp	NP	NP	NP	NP	NP	NP
L7C	aureus	NP	NP	NP	FP	FP	MP
L9A	spp	NP	FP	NP	FP	NP	FP
L13A	aureus	NP	FP	NP	FP	FP	MP
L15A	aureus	FP	NP	FP	FP	FP	FP
L16A	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	FP
L17B	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	FP
L18A	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	FP
L19A	aureus	NP	FP	NP	FP	NP	FP
L24A	aureus	NP	NP	NP	NP	FP	FOP
L28B	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	FP
L29B	aureus	NP	NP	NP	FP	NP	FOP
L32D	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	MP
L33D	aureus	NP	NP	NP	FP	NP	FOP
L35A	spp	NP	NP	NP	NP	NP	NP
L36B	aureus	NP	NP	NP	NP	NP	FOP
L37B	spp	NP	NP	NP	NP	NP	FP

¹ISO: isolado; ²ESP: espécie; spp: *Staphylococcus* spp.; aureus: *S. aureus*; NP: não produtor; FP: fraco produtor; MD: moderado produtor; FOP: forte produtor.

A temperatura é um fator determinante no desenvolvimento dos microrganismos, e podem afetar tanto a formação como a atividade de qualquer biofilme, bem como o tipo microbiano que o compõe. Em elevadas temperaturas, ocorre a desnaturação das proteínas que constituem os microrganismos, o que acarreta em uma redução da taxa de crescimento microbiano. A temperatura na qual os efeitos de desnaturação ocorrem é designada por limite máximo de temperatura,

enquanto onde é registrado um valor máximo da taxa de crescimento é definida por temperatura ótima. Por outro lado, com a diminuição da temperatura ocorre uma redução da taxa de crescimento dos microrganismos até um dado valor em que o crescimento é interrompido. Sabe-se que cada microrganismo apresenta valores precisos para os limites mínimo e máximo e temperatura ótima (OTTO, 2018).

Bimanand e colaboradores (2018) mostram que *S. aureus* resistente a oxacilina (MRSA) são melhores formadores de biofilme em comparação com aqueles que não apresentam resistência a esse antimicrobiano. A presença de biofilme de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina em ambiente de assistência à saúde predispõe a infecção de pacientes, agravando os quadros e dificultando o tratamento (NEOPANE et al., 2018). A avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos é uma etapa ainda a ser realizada em nosso trabalho, para uma melhor correlação dos achados, entretanto, a presença desses microrganismos no ambiente de UTI já é preocupante.

Tiwari e colaboradores (2018) mostram que *Staphylococcus* de origem clínica são bons formadores de biofilme, e que hipoclorito de sódio a 0,6% demonstrou eficácia superior ao etanol 70% na destruição de biofilme de *Staphylococcus*. Esse achado corrobora com o presente trabalho para adequada higienização de ambiente de assistência à saúde, visto que após 24 horas a 36°C, somente 2 isolados não produziram biofilme, enquanto 17 não formaram biofilme a 20°C, após 24 horas.

CONCLUSÕES

O trabalho realizado permite concluir que *Staphylococcus* são melhores produtores de biofilme após 8 horas de incubação, e mais isolados de *Staphylococcus* produzem biofilme a 36°C após 24 horas de incubação que a temperatura de 20°C, no mesmo tempo, indicando que a temperatura interfira na produção de biofilme de *Staphylococcus* isolados de ambiente. Ainda é possível afirmar que todos os isolados de *S. aureus* produzem biofilme após 24 horas de incubação a 36°C e a maioria (26; 92,9%) dos *Staphylococcus* spp. produz biofilme após 24 horas de incubação a 36°C. 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

BIMANAND, L. et al. Association between biofilm production, adhesion genes and drugs resistance in different SCCmec types of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from several major hospitals of Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 21, n. 4, 2018.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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

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

LPSN, **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 15 de outubro de 2018.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Staphylococcus e Cocos Gram Positivos Relacionados**: Microbiologia Médica. 6. ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2009.

NEOPANE, P. et al. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. **International Journal of General Medicine**, v. 18, n. 11, 2018.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 4, 2018.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, 2007.

SCHLEIFER, K. H.; BELL, J. A. **Staphylococcus**. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Georgia, USA: William B. Whitman, 2015. p. 1-43.

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.

TIWARI, S. et al. Sodium hypochlorite is more effective than 70% ethanol against biofilms of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Infection Control**, v. 46, n. 6, 2018.

WINKELSTROTER, L. K; TEIXEIRA, F.B; SILVA, E.P; ALVES, V.F; DE MARTINIS, E.C. Unraveling Microbial Biofilms of Importance for Food Microbiology. **Microbial Ecology**, v. 68, n.1, p. 35-46, 2014.