



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cassius de Souza

Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum*

Rio de Janeiro
2014

Cassius de Souza

Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientadora: Prof.^a Dra Lílian de Oliveira Moreira

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Cassius de.

Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum* / Cassius de Souza. – 2014.

113 f.

Orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. *Corynebacterium* - Teses. 2. Infecções por *Corynebacterium*. 3. Glutaral. 4. Biofilme- Teses. 5. Infecção hospitalar - Teses. I. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.852.23

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Cassius de Souza

Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum*

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi (Orientadora)

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Maria Helena Simões Villas-Bôas

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a minha família, alicerce da minha vida, e em especial aos meus pais, minha esposa, meu filho, meus irmãos e a um grande homem, que mesmo não estando mais entre nós, se faz a cada vez mais presente, através de seus exemplos e de sua História de amor pelos mais carentes e pelas ciências farmacêuticas naturais, meu avô Dr. Edson Jaborany.

AGRADECIMENTOS

À Deus que manteve minha fé, iluminou a minha caminhada, cuidou da minha família, pois eu muitas vezes não estava presente, confortou meus amigos e parentes em momentos de perdas, pois eu também estava ausente, manteve acesa em mim a chama da perseverança que me alimentou nos momentos mais difíceis desta tão maravilhosa jornada. Somente ele poderia ser tão bom e generoso. Senhor Deus eu te amo! Muito obrigado por ser um verdadeiro pai me dando forças para conseguir caminhar e passar por tantas barreiras.

Aos meus pais, que deixaram presentes importantes como: caráter, dignidade e força de vontade, graças a essas características estive preparado para adversidades da vida.

À minha família: esposa, filho e irmãos que com um amor incondicional tolerou minha ausência, e fomentou a minha dedicação a esse estudo e que em cada momento de fraqueza, sempre encontrava incentivo através de palavras de afeto e carinho.

Aos colaboradores do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica – LDCIC (Lab 03), Faculdade de Ciências Médicas, que sempre estiveram presente para colaborar e compartilhar experiências, em especial o Prof Dr Raphael Hirata Jr pela colaboração e co-orientação em diversas etapas do nosso trabalho e ao mestrando Yuri Vieira pelo auxílio na análise de produção de biofilmes.

Pelo auxílio nos ensaios de Microscopia Confocal de Varredura a Laser e de Microscopia Eletrônica de Varredura em seus laboratórios, agradecemos aos Profs. Drs. Fábio Fortes e Sérgio Henrique Seabra da Universidade Estadual da Zona Oeste - UEZO, Rio de Janeiro.

À minha orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi que compartilhou suas experiências, emprestou seu conhecimento, me acolheu, depositou em mim muita confiança, proporcionou uma dedicação imensurável e que com certeza ficará como uma herança em minha vida para sempre.

À Profa. Dra. Lílian de Oliveira Moreira, minha segunda orientadora, sendo não só professora, mas também uma valorosa amiga, sempre disposta a colaborar e fornecer o verdadeiro suporte acadêmico e profissional.

Agradeço ao curso de Pós-Graduação em Saúde Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, representado pela Professor Dr. Luiz Cristóvão Porto, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas, pelo auxílio e desenvolvimento que contribuíram para a concretização deste projeto.

Agradeço as instituições de apoio financeiro, CAPES, CNPq, FAPERJ e SR2-UERJ.

...os sonhos não determinam o lugar aonde chegaremos, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar em que estamos. Devemos sonhar com as estrelas para que possamos pisar pelo menos na Lua. Devemos sonhar com a Lua para que possamos pisar pelo menos nos altos montes. Devemos sonhar com os altos montes para que possamos ter dignidade quando atravessarmos os vales das perdas e das frustrações. Se nossos sonhos são pequenos, nossa visão será pequena, nossas metas serão limitadas, nossos alvos serão diminutos, nossa estrada será estreita, nossa capacidade de suportar as tormentas será frágil.

Os sonhos regam a existência com sentido. Se nossos sonhos são frágeis, nossa comida não terá sabor, nossas primaveras não terão flores, nossas manhãs não terão orvalho, nossa emoção não terá romance.

A presença dos sonhos transforma os miseráveis em reis, faz dos idosos, jovens, e a ausência deles transforma milionários em mendigos, faz dos jovens idosos. Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades.

O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz uma escolha, escreve sua própria história e constrói seus próprios caminhos.

Augusto Cury

RESUMO

SOUZA, Cassius de. **Atividade de biocidas e produção de biofilme em *Corynebacterium striatum***. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A espécie *Corynebacterium striatum* tem sido relacionada com diversos casos de infecções nosocomiais, por vezes fatais, principalmente em pacientes imunocomprometidos que fazem uso de dispositivos invasivos. A ocorrência de surtos nosocomiais causados por clones multirresistentes aos agentes antimicrobianos (MDR) tem contribuído para incluir a espécie entre os patógenos responsáveis por infecções relacionadas aos serviços de atendimento a saúde (IRAS). Na literatura disponível ainda não foram observados trabalhos que investigassem os possíveis fatores de virulência que possam contribuir com o estabelecimento de IRAS pelo *C. striatum*. Neste sentido, investigamos a produção de biofilme em superfícies inertes sólidas e a susceptibilidade a diversos biocidas de formas planctônicas e sésseis de 14 amostras de *C. striatum* pertencentes a quatro pulsotipos isolados durante surto epidêmico em um hospital universitário localizado na região metropolitana do Rio de Janeiro. A habilidade de aderir a superfícies abióticas hidrofílica, hidrofóbica e metálica foi observada, porém em intensidades variadas. O clone epidêmico (PFGE I-MDR) exibiu maior capacidade de aderir as superfícies do vidro, plástico e metal. Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura confirmaram a habilidade de produzir biofilmes maduros em catéter de poliuretano para amostras dos pulsotipos I, II, III e IV. A susceptibilidade aos biocidas foi avaliada pelos testes de disco-difusão e *Time Kill*. Nos testes de triagem por disco-difusão, halos de sensibilidade, embora de diâmetros reduzidos, foram observados para amostras que permaneceram viáveis frente aos diversos desinfetantes quando avaliadas pelo *Time Kill*. Formas planctônicas foram avaliadas pela técnica de *Time Kill* em tempos de incubação (5, 10, 15, 30 minutos) quanto a susceptibilidade ao glutaraldeído 2%, ácido peracético 2%, Virkon 1%, hipoclorito de sódio 1%, clorexidina 2%, alquil benzeno sulfonato de sódio 2%, álcool etílico 70% e álcool iodado. As amostras de *C. striatum* exibiram tolerância quando submetidas aos tratamentos com glutaraldeído até 30 min e aos demais desinfetantes durante períodos de tempo reduzidos ($0,5 < t \leq 4$ min). A amostra 1961/III – MDS foi a que apresentou formas planctônicas com tolerância por maior período de tempo para todos os desinfetantes testados, inclusive para o glutaraldeído e álcool 70% (30 min). Menor tolerância foi observada para o hipoclorito de sódio e Virkon, principalmente para as amostras 2369/II-MDR e 1954/IV-MDS. A maioria das amostras de *C. striatum* também apresentou resistência ao álcool 70% e álcool iodado (70/1%). A amostra 1954/IV - MDS apresentou maior susceptibilidade aos desinfetantes e anti-sépticos testados. Amostras de *C. striatum* (pulsotipos I, II, III e IV) permaneceram capazes de produzir biofilme na superfície dos diferentes substratos abióticos na presença do desinfetante glutaraldeído 2% (30 min) e do anti-séptico álcool 70% (min) indicando que formas planctônicas e sésseis de *C. striatum* foram capazes de sobreviver aos tratamentos com anti-sépticos e desinfetantes diversos. A presença de matéria orgânica (soroalbumina bovina 1%) favoreceu a tolerância de formas planctônicas e sésseis de *C. striatum* aos biocidas. Em conclusão, a capacidade de produzir biofilme aliada a tolerância aos produtos utilizados nos procedimentos de desinfecção e anti-sepsia podem contribuir para o estabelecimento e disseminação de IRAS por amostras de *C. striatum*, independente da susceptibilidade aos antibióticos.

Palavras-chave: *Corynebacterium striatum*. Biocidas. Biofilme. Clone epidêmico. Glutaraldeído. Infecção hospitalar. PFGE.

ABSTRACT

SOUZA, Cassius de. **Biocidal activity and biofilm production in *Corynebacterium striatum***. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Corynebacterium striatum has been linked to a number of cases of nosocomial infections, sometimes fatal, mainly in immunocompromised patients that use invasive devices. The occurrence of outbreaks in nosocomial environments caused by clones multi-resistant to antimicrobial agents (MDR) may include *C. striatum* among pathogens responsible for infections related to the health service (IRAS). Until now, studies focused on the investigation of virulence factors that may contribute to IRAS caused by *C. striatum* were not found in the literature. Accordingly, we investigated the biofilm production on inert solid surfaces and the susceptibility to biocidal products by planktonic and sessile forms of 14 strains of *C. striatum* of pulsotypes I-IV that were isolated during an nosocomial outbreak in the metropolitan region of Rio de Janeiro. Micro-organisms showed the ability to adhere to abiotic, hydrophilic, hydrophobic and metallic surfaces at different intensities. The epidemic clone (PFGE I-MDR) demonstrated a greater capacity to adhere to glass, plastic and metal surfaces. The scanning electron microscopy assays confirmed the ability to produce mature biofilms on polyurethane catheters by *C. striatum* of pulsotypes I, II, III e IV. The susceptibility to biocides was assessed by the disk diffusion and Time Kill methods. Results of the disk-diffusion screening test showed zones of inhibition with reduced diameters for *C. striatum* strains that remained viable in the presence of biocides when evaluated by the Time Kill test. Susceptibility profiles of planktonic forms to glutaraldehyde 2%, peracetic acid 1%, Virkon 1%, sodium hypochlorite 1%, chlorhexidine 2%, benzalkonium chloride sodium sulphate 2%, ethyl alcohol 70% and iodized alcohol (70/1%) were assessed by the Time Kill test at incubation times of 5, 10, 15 and 30 minutes. *C. striatum* showed tolerance to biocides for reduced periods of time ($0,5 < t \leq 4$ min) when compared to the tolerance (30 minutes) observed with glutaraldehyde 2% solution. *C. striatum* 1961/III – MDS was the one that presented tolerant planktonic forms for the longest period of time for all the tested biocides, including glutaraldehyde 2% and ethyl alcohol 70% for 30 minutes. The lowest tolerance registered was for sodium hypochlorite and Virkon, especially of 2369/II-MDR and 1954/IV-MDS strains. The majority of the *C. striatum* samples also presented resistance to the antiseptics alcohol 70% and iodized alcohol (70/1%). The sample 1954/IV - MDS presented tolerance to all the disinfectants and antiseptics tested. *C. striatum* (pulsotypes I, II, III e IV) remained capable of producing biofilm on the surface of different abiotic substrates in the presence of glutaraldehyde 2% (30 min) and alcohol (30 min), indicating that planktonic and sessile forms of *C. striatum* were capable of surviving the treatments with different biocidal products. The presence of bovine serum albumin 2% enhanced the tolerance to biocides of both planktonic and sessile forms of *C. striatum*. In conclusion, biofilm production together with the tolerance to biocides used in nosocomial environment can contribute to the establishment and dissemination of IRAS caused by *C. striatum*, independent of antibiotics susceptibility profiles.

Keywords: *Corynebacterium striatum*. Biocides. Biofilm. Epidemic clone. Glutaraldehyde. Nosocomial infection. PFGE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenvolvimento de um biofilme Colonização, crescimento, desenvolvimento Coadesão e maturação	33
Figura 2 -	Imagem ilustrativa do teste de disco-difusão de <i>Corynebacterium striatum</i> frente de desinfetantes e anti-sépticos.....	44
Figura 3 -	Etapas de execução de ensaios do teste de susceptibilidade de <i>Corynebacterium striatum</i> frente a diversos agentes antimicrobianos <i>Time Kill</i>	46
Figura 4 -	Etapas de execução de ensaios de interação de <i>Corynebacterium striatum</i> em superfícies de carreadores metálicos (pinças).....	49
Figura 5 -	Técnica de rolamento semi-quantitativa da aderência em catéter de em poliuretano.....	50
Figura 6 -	Resultado do teste susceptibilidade de <i>Corynebacterium striatum</i> frente ao desinfetante glutaraldeído 2%, utilizando o método <i>Time kill</i>	61
Figura 7 -	Resultado do teste susceptibilidade de <i>Corynebacterium striatum</i> frente ao desinfetante ácido peracético 2% utilizando o método <i>Time kill</i>	62
Figura 8 -	Resultado do teste susceptibilidade de <i>Corynebacterium striatum</i> frente ao desinfetante hipoclorito 1% utilizando o método <i>Time kill</i>	63
Figura 9 -	Resultado do teste susceptibilidade de <i>Corynebacterium striatum</i> frente ao desinfetante Virkon ® 1%, utilizando o método <i>Time kill</i>	64
Figura 10 -	Resultado do teste <i>Time kill</i> . Análise comparativa da eficácia dos desinfetantes no tempo de 1 min de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i>	65
Figura 11 -	Resultado do teste <i>Time kill</i> . Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> na presença do anti-séptico álcool etílico 70% na (A) ausência e na (B) presença de soroalbumina bovina 2%.....	67
Figura 12 -	Interação com superfície hidrofílica do vidro de amostras <i>Corynebacterium striatum</i>	68
Figura 13 -	Análise semi-quantitativa da capacidade interação de <i>Corynebacterium striatum</i> com superfície hidrofóbica em microplacas de poliestireno.....	71
Figura 14 -	Análise (A) semi-quantitativa da capacidade de interação com superfície	

	abiótica metálica (pinças).....	72
Figura 15 -	Interação com a superfície de catéter de poliuretano de amostras de diferentes pulsotipos de <i>Corynebacterium striatum</i>	74
Figura 16 -	Microscopia eletrônica de varredura demonstrando (A) a formação de biofilme em poliuretano de <i>Corynebacterium striatum</i> 1959/pulsotipo I.....	75
Figura 17 -	Microscopia eletrônica de varredura demonstrando (A, B) formação de biofilme em poliuretano de <i>Corynebacterium striatum</i> 2369/pulsotipo II...	76
Figura 18 -	Microscopia eletrônica de varredura demonstrando (A) a formação de biofilme de poliuretano em <i>Corynebacterium striatum</i> 1961/pulsotipo III...	77
Figura 19 -	Microscopia eletrônica de varredura demonstrando (A, B) a formação de biofilme em poliuretano por <i>Corynebacterium striatum</i> 1954/pulsotipo IV	78
Figura 20 -	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando a formação de biofilme da cepa-controle <i>Corynebacterium diphtheriae</i> CAT5003/BR em poliuretano.....	79
Figura 21 -	Tolerância ao tratamento com desinfetante glutaraldeído 2% (Gluta) (30min) de formas sésseis aderidas a diferentes substratos abióticos e de formas planctônicas de amostras de <i>Corynebacteriumstriatum</i> (pulsotipos I, II, III e IV).....	82
Figura 22 -	Influência de matéria orgânica – soroalbumina bovina (BSA) 1% - na tolerância ao tratamento com desinfetante glutaraldeído 2% (Gluta), (30 min) de formas sésseis aderidas a diferentes substratos abióticos de amostras de <i>Corynebacteriumstriatum</i> (pulsotipos I, II, III e IV).....	83
Figura 23 -	Influência de matéria orgânica – soroalbumina bovina (BSA) 2% - na tolerância ao tratamento com anti-séptico álcool etílico 70% (30 min) de formas sésseis aderidas ao poliestireno de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema simplificado de caracterização bioquímica das principais espécies de corinebactérias de importância clínica.....	23
Tabela 2 – Origem e pulsotipos de amostras parcialmente estudadas de <i>Corynebacterium striatum</i> isoladas de hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro	42
Tabela 3 – Soluções de desinfetantes, anti-sépticos e agentes neutralizantes utilizados no presente estudo	43
Tabela 4 – Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK) avaliadas pelo método de disco-difusão de 12 amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> de diferentes pulsotipos	54
Tabela 5 – Resultado do teste de triagem de susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de <i>Corynebacterium striatum</i>	55
Tabela 6 – Resultados do teste de triagem de susceptibilidade aos anti-sépticos avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de <i>Corynebacterium striatum</i>	58
Tabela 7 – Resultados da avaliação da tolerância aos biocidas na ausência e na presença de matéria orgânica pelos testes de susceptibilidade <i>Time kill</i> e disco difusão de amostras de <i>Corynebacterium striatum</i> de diferentes pulsotipos	60
Tabela 8 – Resultados dos ensaios de interação com superfícies abióticas diversas e de produção de biofilme em cateter de poliuretano de amostras parcialmente estudadas de <i>Corynebacterium striatum</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA -	Padrão de aderência do tipo agregativo
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM -	<i>American Society for Testing and Materials</i>
BGPIs -	Bastonetes Gram-Positivos Irregulares
BHI -	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA -	Albumina Sérica Bovina
CCIH -	Comissão de Controle as Infecções Hospitalares
C° -	Grau Celsius
CFF -	Conselho Federal de Farmácia
CTI -	Centro de terapia intensiva
CTQ -	Centro de terapia e quarentena
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
D.O. -	Densidade Óptica
EPI -	Equipamentos de Proteção Individual
EPS -	Exopolissacarídeo
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
GA -	Glutaraldeído
HIV -	Vírus da imunodeficiência adquirida
HUPE -	Hospital Universitário Pedro Ernesto
Λ -	Lambda
LPS -	Lipopolissacarídeo
μg -	Micrograma
MEV -	Microscopia eletrônica de varredura

MDR -	Multiresistência aos agentes antimicrobianos
MDS -	Multisensibilidade aos agentes antimicrobianos
Nm -	Nanometro
NCCLS -	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PBS -	Solução salina tamponada fosfatada
PFGE -	Eletroforese de campo-pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
pH -	Potencial hidrogeniônico
RNA -	Ácido ribonucleico
SESDEC -	Secretaria de Estado de Saúde e Defesa Civil
TSA -	<i>Trypticase Soy agar</i>
TSB -	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC -	Unidade Formadora de Colônia
UTI -	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	SUPORTE LITERÁRIO	17
1.1	O gênero <i>Corynebacterium</i>	17
1.2	<i>Corynebacterium striatum</i>	17
1.3	Fatores que contribuem para a ocorrência de infecções hospitalares	22
1.4	Agentes químicos utilizados no ambiente hospitalar	26
1.4.1	<u>Glutaraldeído</u>	26
1.4.2	<u>Ácido peracético</u>	27
1.4.3	<u>Hipoclorito de sódio</u>	28
1.4.4	<u>Permonossulfato de potássio</u>	28
1.4.5	<u>Orftaldeído</u>	28
1.4.6	<u>Glucoprotamina</u>	29
1.5	Fatores que interferem no processo de desinfecção	30
1.6	O Biofilme bacteriano	31
1.7	Produção de biofilme de corinebactérias	34
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo gerais	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Origem, identificação e estocagem das amostras bacterianas	40
3.2	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	40
3.3	Testes de susceptibilidade aos desinfetantes e anti-sépticos	41
3.3.1	<u>Preparo de soluções de desinfetantes e anti-sépticos e de agentes</u>	41
3.3.2	<u>Método de disco-difusão</u>	42
3.3.3	<u>Técnica de <i>Time Kill</i></u>	45
3.4	Ensaio de interação bacteriana e de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas	45
3.4.1	<u>Preparo das suspensões bacterianas</u>	45
3.4.2	<u>Aderência na superfície hidrofílica de vidro</u>	45
3.4.3	<u>Ensaio semi-quantitativo de interação bacteriana na superfície hidrofóbica do poliestireno</u>	47

3.4.4	<u>Teste de aderência utilizando carreadores metálicos (pinças)</u>	47
3.4.5	<u>Avaliação da capacidade de interação bacteriana com a superfície de catéter de poliuretano</u>	48
3.4.5.1	Técnica de rolamento (Teste Maki).....	48
3.4.5.2	Técnica de cultura quantitativa.....	48
3.4.5.3	Análise morfológica e estrutural de biofilme produzido em superfície de catéter pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	51
3.5	Pesquisa de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas na presença de glutaraldeído e matéria orgânica	51
3.5.1	<u>Ensaio semi-quantitativo de interação bacteriana com o poliestireno</u>	52
3.5.2	<u>Ensaio de interação bacteriana com carreadores metálicos (pinças)</u>	52
3.5.3	<u>Ensaio quantitativo com superfícies inertes diversas</u>	53
4	RESULTADOS	53
4.1	Perfis de susceptibilidade aos antibióticos	53
4.2	Triagem dos perfis de susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método de disco-difusão	56
4.3	Triagem dos perfis de susceptibilidade aos anti-sépticos avaliados pelo método de disco-difusão	59
4.4	Susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método <i>Time-kill</i> na ausência e na presença de matéria orgânica	
4.5	Pesquisa da capacidade de aderência em superfície abiótica hidrofílica (vidro)	66
4.6	Pesquisa da capacidade de aderência em superfície abiótica hidrofóbica (poliestireno)	70
4.7	Pesquisa da capacidade de aderência em superfícies inertes sólidas de natureza metálica (material empregado na produção de pinças)	70
4.8	Pesquisa da capacidade de aderência e de produção de biofilme na superfície de catéter de poliuretano	73
4.9	Análise morfológica da composição estrutural do biofilme pela técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV	73
4.10	Pesquisa da influência da presença de glutaraldeído e clorexidina na produção de biofilme pelo <i>C. striatum</i>	80
4.11	Pesquisa da influência de matéria orgânica na produção de biofilme de <i>C. striatum</i> na presença de glutaraldeído 1%	80

5	DISCUSSÃO.....	85
	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	102
	ANEXO - Participação em eventos científicos internacionais e nacionais e publicação em livros de resumos durante o tempo de vigência do curso de Mestrado.....	112

INTRODUÇÃO

As infecções humanas causadas pelas corinebactérias vêm adquirindo crescente importância tanto em países industrializados quanto em desenvolvimento, e podem levar ao óbito tanto pacientes em condições de imunocomprometimento quanto os imunocompetentes. O aparecimento de amostras multirresistentes as drogas utilizadas na terapia antimicrobiana e o aumento do número de casos de infecções de origens diversas, algumas fatais, têm contribuído para aumentar o interesse pelos bastonetes Gram-positivos irregulares (BGPIs).

Estudos relatam diversos casos de surtos nosocomiais causados por microorganismos do gênero *Corynebacterium*, em casos onde se observa infecções associadas a o ambiente dispositivos de uso hospitalar, e a presença em ambient

O *Corynebacterium striatum* é um microorganismo presente na microbiota normal da pele e mucosas. Nos últimos anos a espécie tem sido associada com um número crescente de casos de infecções na comunidade ou em ambiente hospitalar. Foram descritos casos de sepsse, osteomielite, sinusite, artrite, meningite, endocardite, pneumonia, abscesso de mama, peritonite e infecções de feridas. Porém, é no ambiente hospitalar que *C. striatum* vem ganhando destaque devido a sua capacidade de causar surtos epidêmicos. O *C. striatum* pertence ao grupo dos Actinomecetales.

O *C. striatum* pode ser isolado de materiais de uso hospitalar, como catéteres, labaroscópicos e outros. Além disso, algumas amostras de *C. striatum* são altamente resistentes a diversos antimicrobianos. O recente surto de *C. striatum* no HUPE nos estimulou a investigar a eficácia de desinfetantes, usados em em ambiente hospitalar, sobre as amostras de *C. striatum*.

1 CONTEÚDO LITERÁRIO

1.1 O Gênero *Corynebacterium*

O gênero *Corynebacterium*, descrito por Lehmann & Neumann (1896), pertence à classe *Actinobacteria* a qual também pertencem as classes *Mycobacterium* e *Nocardia*, sua ordem é *Actinomycetales*, e a família *Corynebacteriaceae*. As corinebactérias possuem parede celular composta por arabinose, galactose, ácido mesodiaminopimélico e cadeias curtas de ácido micólico. As corinebactérias são catalase-positivas, não esporuladas, imóveis e que exibem morfologia celular pleomórfica, podendo se apresentar sob as formas cocoides, bacilares, e filamentosas, individualmente, em pares e/ou paliçadas. Algumas espécies apresentam grânulos metacromáticos que são reservas de fosfatos de elevada energia (BARON et al., 1994; BIBERSTEIN et al., 1994; HOLT et al., 1994; COLLINS et al., 1996).

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* consiste em 115 espécies válidas descritas (EUZÉBY, 2014) e um pouco mais de 50 espécies aparecem ocasionalmente ou raramente causando infecções em humanos (BERNARD, 2012). As corinebactérias estão distribuídas em uma ampla gama de ambientes ecológicos como solo, esgoto e superfície de plantas, sendo que algumas delas são patógenos para animais e para o homem. A espécie mais conhecida do gênero é o patógeno humano *Corynebacterium diphtheriae*, agente etiológico da difteria (JANDA, 1998; SCHRODER et al., 2012). Dentre as demais espécies de relevância clínica, podem ser destacados clones multirresistentes de *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jeikeium* e *Corynebacterium urealyticum*. Recentemente, têm sido observadas variações geográficas na frequência de isolamento e na resistência natural e adquirida, além do aumento na resistência aos agentes antimicrobianos nas espécies *Corynebacterium minutissimum*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium macginley* e *Corynebacterium striatum* (DAVIS et al., 1979; SEWELL et al., 1995; KNOX; HOLME, 2002; BELMARES et al., 2007; RENOM et al., 2007; MARTINS et al., 2009).

O fato de estas bactérias fazerem parte da microbiota normal da pele e das vias respiratórias superiores, torna difícil correlacioná-las como o agente de infecção ou como um

simples contaminante. Com a melhoria de condições de sobrevivência de pacientes imunocomprometidos, tem sido crescente o número de casos de corinebacterioses descritos na literatura (KONEMAN et al., 2008; BERNARD, 2012).

1.2 *Corynebacterium striatum*

Apesar de *C. striatum* ser uma espécie de microrganismo saprófita encontrado nas superfícies cutâneo-mucosas de humanos que, por conseguinte, pode ser acidentalmente introduzida como contaminante em amostras clínicas, não deve ser sempre considerada como mero colonizador dos diversos sítios anatômicos (DICKINSOM et al., 2001; DIEZ-AGUILAR et al., 2012; SAVINI et al., 2013).

Nos últimos anos, *C. striatum* tem sido associado com um número crescente de casos de infecções na comunidade ou no ambiente hospitalar (BRANDENBURG et al. 1996; SCHOLLE, 2007; OLIVA et al., 2010).

Como várias outras espécies multirresistentes (MDR) de corinebactérias, *C. Striatum* tem sido observado com maior frequência como um patógeno de infecções nosocomiais (LEE et al., 2005), incluindo bacteremia (SAVINI et al., 2013), septicemia (MARTÍN et al., 2003), infecção pulmonar (RENOM et al., 2007; WONG et al., 2010), meningite (WEISS et al., 1996), endocardite (OLIVA et al., 2010), osteomielite (FERNÁNDEZ-AYALA et al., 2001), artrite séptica (SCHOLLE, 2007), ceratite (HEIDEMANN et al., 1991), ferida de pele (MOORE et al., 2010), infecção intra-uterina (DURON; BOLTIN et al., 2009) além de sinusite e abscesso de mama (BRANDENBURG et al., 1996; OTSUKA et al., 2006; ADDERSON et al. 2008; CAMPANILE et al. 2009; MARTINS et al., 2009; BOLTIN et al., 2009). O primeiro caso de infecção do trato urinário por *C. striatum* em paciente ambulatorial, que não apresentava fatores predisponentes, foi relatado por López et al., (2009).

C. striatum também foi recentemente descrito como agente etiológico de infecção de trato respiratório inferior em pacientes hospitalizados com doença respiratória crônica e/ou imunossupressão. Na mesma oportunidade os autores descreveram as características clínicas e microbiológicas de casos de pneumonia e exacerbações das infecções respiratórias crônicas devido *C. striatum* (DIEZ-AGUILAR et al., 2012).

Nos últimos anos, *C. striatum* tem sido relacionado com quadros de infecções nosocomiais diversas principalmente associadas ao uso de dispositivos médicos invasivos,

principalmente em indivíduos debilitados ou imunodeprimidos, que estejam usando cateteres intravenosos e internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) (FUNKE et al., 1993; VARGAS et al., 2009). A presença de múltiplos dispositivos médicos pode facilitar a colonização do trato respiratório superior, com posterior infecção invasiva de *C. striatum*.

Portanto, amostras de *C. striatum* não devem ser simplesmente descartadas como contaminantes, especialmente quando isoladas em cultura pura de materiais clínicos coletados de pacientes cronicamente debilitados fazendo uso de dispositivos invasivos (BRANDENBURG et al., 1996; RENOM et al., 2007).

Estudos que relataram casos de infecções causadas por bactérias corineformes em pacientes de oncologia pediátrica do Research Hospital de St Jude Children (Tennessee, EUA) indicaram que a maioria dos casos de bacteremia foram devida a *C. striatum*. Estes pacientes tiveram complicações relacionadas às infecções, incluindo quadros de infecção recorrente de artrite séptica (ADDERSON et al., 2008). No estudo realizado em Hospital Universitário, Rio de Janeiro, Brasil, cepas *C. striatum* não foram isoladas de crianças. O patógeno foi isolado de adultos, sendo que a metade tinha 50 anos de idade ou mais velhos (BAIO et al., 2013).

Um surto é denominado como recorrência de casos de uma doença em uma comunidade com determinada frequência maior do que a normal (CHIN, 2000). *C. striatum* é um patógeno que tem a capacidade de produzir surtos de infecções em ambientes nosocomiais (BAIO et al., 2013). Amostras de *C. striatum* têm sido isoladas de pacientes e de diferentes materiais hospitalares como, cateteres, laparoscópios, colonoscópios, nasofibrocópios, broncoscópios, materiais de urologia e de assistência respiratória (BRANDENBURG et al., 1996; SCHOLLE, 2007; OLIVA et al., 2010).

Surto causado por *C. striatum* foram relatados em pacientes hospitalizados há longos períodos de tempo e com a exposição prolongada a antibióticos de amplo espectro e internados em UTIs (LEONARD et al., 1994; OTSUKA et al., 2006). Em um trabalho recentemente publicado por nosso grupo foram descritas características fenotípicas e genotípicas de quatorze amostras de *Corynebacterium striatum* isoladas em 2009, em um surto epidêmico no Hospital Universitário Pedro Ernesto (BAIO et al., 2013).

Na América do Sul, apenas os estudos realizados no Brasil descreveram o isolamento de *C. striatum* de materiais clínicos associado a pacientes internados que apresentavam sinais e sintomas de infecção (CAMELLO et al., 2003; MARTINS et al., 2009; SUPERTI et al., 2009). No Brasil, a maioria das cepas multiresistentes de *C. striatum* são isoladas de UTIs e enfermarias cirúrgicas, principalmente aspirados traqueais de pacientes submetidos a

procedimentos de intubação endotraqueal (BAIO et al., 2013). Investigações anteriores, revelaram que 1,9% (n=06) das amostras clínicas de origens diversas, as quais foram obtidas de pacientes com câncer e tratados em um centro de referência no Rio de Janeiro, durante um período de, um ano, foram positivas para *C. striatum*: um caso de infecção do trato respiratório superior, três de infecção do trato respiratório inferior e dois casos de feridas cirúrgicas (MARTINS et al. 2009).

Recentemente, foi documentado surto nosocomial causado por cepas multiresistentes (MDR) de *C. striatum* em Hospital Universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro, Brazil. A análise por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) indicou a presença de quatro perfis PFGE, incluindo dois clones relacionados de cepas MDR (PFGE I e II). Os dados demonstraram a predominância de pulsotipos I e II compreendendo 11 amostras isoladas na maioria de UTIs e de enfermarias cirúrgicas. Uma correlação entre a morte e infecção por cepas MDR de *C. striatum* (PFGE tipos I e II) foi observada em cinco casos (BAIO et al., 2013)

A disseminação de microrganismos multiresistentes aos agentes antimicrobianos no ambiente nosocomial tem sido motivo crescente de preocupação (SAVINI et al., 2013). Exceto a invariável atividade de vancomicina contra as corinebactérias, a variabilidade na resistência a outras classes de agentes antimicrobianos ressalta a necessidade de contínua vigilância dos perfis de resistência das espécies. Embora a maioria das amostras descritas de *C. striatum* terem sido sensíveis a uma ampla gama de antibióticos (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1995; WEISS et al., 1996), tem sido sugerido que a pressão seletiva exercida pelos tratamentos prévios com antimicrobianos estimula o crescimento de *C. striatum* como um segundo microrganismo em hospedeiros imunocomprometidos. Neste sentido, a emergência de cepas MDR é motivo especial de preocupação (LEONARD et al., 1994; ADDERSON et al., 2008; CAMPANILE et al., 2009).

Critérios específicos de avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos para as corinebactérias ainda não foram definidos até o presente momento, porém alguns autores sugerem que sejam relatados os casos de resistência total aos antibióticos, ou seja, a ausência de qualquer zona de inibição com o teste de disco, a fim de tentar entender este comportamento de espécies sob exposição as drogas (SAVINI et al., 2013). A susceptibilidade aos antibióticos foi avaliada pelo método de difusão de disco por alguns autores (DIEZ-AGUILAR et al., 2012).

No Japão, Otsuka et al. (2006) relataram taxas variáveis da susceptibilidade de *C. striatum* aos β -lactâmicos e aminoglicosídeos, além de elevados níveis de resistência à

eritromicina, tetraciclina, rifampicina e ciprofloxacina, embora todas as cepas tenham sido sensíveis à vancomicina. Análise por PFGE identificou 14 perfis de *C. striatum*, com tipos A, D e E associados com surtos nosocomiais de origem respiratória e com subtipos A1, A2, D2 e E associados a resistência a uma ampla gama de antimicrobiano. Além disso, Renom et al. (2007), observaram que para amostras clínicas analisadas naquela oportunidade o critério de multirresistência (resistência a três ou mais antibióticos de diferentes famílias) se aplicava a 100% das cepas isoladas em surtos nosocomiais, dos quais 65% eram resistentes aos quatro ou cinco grupos de antibióticos diferentes, sendo 6,9% sensíveis apenas ao imipenem e vancomicina, e 11% sensíveis somente a vancomicina. Um surto nosocomial causado por *C. striatum* (MDR) no Rio de Janeiro, Brasil, também foi documentada por Baio et al. (2013). Esses autores observaram que o critério de multirresistência descritos por Otsuka et al. (2006) se aplica a 87% das amostras de *C. striatum* (PFGE tipos I e II) do surto nosocomial brasileiro. Uma correlação entre a morte e infecção por cepas MDR de *C. striatum* (PFGE tipos I e II) foi observada em cinco casos.

Os mecanismos de tolerância e resistência do *C. striatum* ainda não estão bem elucidados, entretanto sabe-se que a baixa permeabilidade da parede externa, o grande conteúdo lipídico ou a capacidade de formação de biofilme pode contribuir para uma possível tolerância a diversos agentes antimicrobianos (STEPHAN et al., 2004; FONTANA, 2008; LORENA; DUARTE; PITOMBO, 2009).

Um aumento no número de casos de isolamento de *C. striatum* de amostras clínicas obtidas de pacientes com diferentes graus de imunocomprometimento e apresentando infecções graves tem sido observado em países industrializados com recursos financeiros para realizar esses tipos de estudos. Com o auxílio de técnicas moleculares, a natureza clonal dos microrganismos isolados durante surtos nosocomiais tem sido inequivocamente estabelecida (BRANDENBURG et al., 1996; MARTÍN et al., 2003; OTSUKA et al., 2006; RENOM et al., 2007; ADDERSON et al., 2008; CAMPANILE et al., 2009; MARTINS et al., 2009; WONG et al., 2010).

Para *C. striatum*, não existe nenhum banco de dados disponível publicamente, tais como PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet>), para permitir a comparação de PFGE padrões observados nos diferentes surtos nosocomiais. Campanile et al. (2009), observaram que os perfis *SwaI*-PFGE de *C. striatum* exibiram faixas variando em tamanho de 48,5 para 533,5 kb. Baio et al. (2013) observaram perfis *SwaI*-PFGE de *C. striatum* com bandas que validam entre 97,0 a 533,5 kb. A ausência de bandas, variando em tamanho de 48,5 KB 97,0 sugeriu que as cepas MDR de *C. striatum* isoladas neste surto nosocomial no Brasil eram diferentes

dos isolados na Itália por Campanile et al. (2009). Além disso, a análise dos perfis fenotípicos de *C. striatum* indicaram que as cepas brasileiras eram diferentes das isoladas na Holanda (biótipo: nitrato/pyz-positivos e sacarose-negativo; Código API 3100104) (BRANDENBURG et al., 1996).

No laboratório de bacteriologia, cepas de *C. striatum* muitas vezes são descartadas como contaminantes, inclusive quando cultivadas a partir de amostras de sangue (SAVINI et al., 2013). *C. striatum* não deve ser considerado como contaminante, especialmente quando isolado de pacientes cronicamente debilitados utilizando fazendo uso de dispositivos invasivos (BRANDENBURG et al., 1996; RENOM et al., 2007). Nos casos de infecção respiratória, crescimento em cultura pura de *C. striatum* é obtido na maioria das oportunidades (DIEZ-AGUILAR et al., 2012; BAIO et al., 2013).

Além dos métodos bioquímicos convencionais (**Tabela 1**) encontram-se comercialmente disponíveis sistemas semi-automatizados de identificação (CAMELLO et al., 2003; MURRAY et al., 2007; BAIO et al., 2013). Métodos moleculares geralmente são utilizados em Laboratórios de Referência. A identificação laboratorial de *C. striatum* pode ser confirmada pelo sequenciamento de genes 16S rRNA e *rpoB* (BAIO et al., 2013). *C. striatum* também pode ser identificado por espectrometria de massa através do aparelho MALDI-TOF MS (DIEZ-AGUILAR et al. 2012).

1.3 Fatores que contribuem para a ocorrência de infecções hospitalares

As infecções hospitalares representam um agravo de grande significado epidemiológico tanto no contexto de Saúde Pública como no da assistência hospitalar. Elas elevam as taxas de morbimortalidade, ampliam o tempo de permanência dos pacientes no hospital e, conseqüentemente, oneram os custos do tratamento e têm conseqüências irreparáveis, seja do ponto de vista humano, econômico ou social. As Unidades de Terapia Intensiva são setores onde os índices de infecção hospitalar podem ser mais elevados, o que geralmente resulta da interação entre microrganismos, meio ambiente e deficiência dos fatores de defesa dos pacientes. As superfícies inanimadas de um hospital podem servir como reservatório e fonte de bactérias potencialmente patogênicas. (ANVISA-CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR, 2000).

Uma vez que ambiente hospitalar contribui diretamente para a recuperação da saúde do paciente, existe uma preocupação mundial com o controle dos ambientes hospitalar em

razão das diversas recorrências de surtos das infecções hospitalares causadas por diversos microrganismos entre eles as estirpes multirresistentes (ANVISA, 2014).

Tabela 1 - Esquema simplificado de caracterização bioquímica das principais espécies de corinebactérias de importância clínica

Espécies	Testes	Catalase	Metabolismo Oxidativo/Fermentativo	Lipofilia	Redução Nitrito	Hidrólise Ureia	Hidrólise Esculina	PYZ	Glicose	Maltose	Sacarose	CAMP	Outros
<i>C. afermentans</i>		+	O	v	-	-	-	+	-	-	-	v	
<i>C. amycolatum</i>		+	F	-	v	v	-	+	+	v	v	-	
<i>C. diphtheriae</i>		+	F	v	v	-	-	-	+	+	v	-	Hemólise*; Glicogênio V
<i>C. jeikeium</i>		+	O	+	-	-	-	+	+	v	-	-	Frutose - ; Galactose +
<i>C. minutissimum</i>		+	F	-	-	-	-	+	+	+	v	-	Frutose + ; Tirosina +
<i>C. propinquum</i>		+	O	-	+	-	-	v	-	-	-	-	Tirosina +
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>		+	O	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
<i>C. pseudotuberculosis</i>		+	F	-	v	+	-	-	+	+	v	Rev	β hemólise*; Glicogênio -
<i>C. striatum</i>		+	F	-	+	-	-	+	+	-	v	v	Tirosina +
<i>C. ulcerans</i>		+	F	-	-	+	-	-	+	+	-	Rev	Hemólise*; Glicogênio +; Gelatina +;
<i>C. urealyticum</i>		+	O	+	-	+	-	+	-	-	-	-	
<i>C. xerosis</i>		+	F	-	v	-	-	+	+	+	+	-	

Legenda: PYZ, Atividade pirazinamidásica; +, positivo; -, negativo; V, variável; Rev, reação reversa; *, hemácias carneiro, fonte: Microbiologia Clínica Para O Controle De Infecção Relacionada À Assistência À Saúde - Anvisa 2013.

A busca por qualidade do ambiente hospitalar, com a extinção dos surtos epidêmicos depende de vários procedimentos e rotinas, relacionados principalmente com ações voltadas a uma rotina inteligente e atualizada, bem como, empenho dos funcionários e profissionais que devem estar preparados tecnicamente para esse tipo de responsabilidade, sobretudo da parte dos gestores.

A preocupação com fatores essenciais no combate às doenças infecciosas tais como o uso racional de agentes químicos antimicrobianos, o gerenciamento ou gestão da Comissão de

Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) que será responsável por adotar rotinas, treinamento da mão de obra, controle das terapias antibacterianas, padronização de protocolos e ainda, atualização quanto às novas técnicas de limpeza, descontaminação e desinfecção, na utilização de agentes químicos, incluindo aplicações de testes de eficácia desses agentes sempre padronizados pela Anvisa, contribuirá diretamente para um ambiente controlado.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) tem como principal função institucional a promoção e a proteção da saúde e isso envolve um grande leque de responsabilidades que abrange controles de ambientes relacionados ao paciente, controle de produtos e insumos que serão utilizados diretamente nesses ambientes com a finalidade de servir e contribuir para o restabelecimento dos pacientes (Anvisa, 2008).

As áreas hospitalares subdividem-se conforme os riscos em: (i) CRÍTICAS - são aquelas onde há maior número de pacientes graves com sistema imunológico deprimido, maior número de procedimentos invasivos, em consequência, maior risco de infecções, ex.: Centro Cirúrgico, CTI, Centro de esterilização, Hemodiálise, Lactário, CTQ, Necrotério, Laboratório, Expurgo; (ii) SEMI-CRÍTICAS - são aquelas onde se encontram pacientes internados e o risco de infecção é menor. ex.: Enfermarias, Quartos, Ambulâncias, Ambulatórios; (iii) NÃO CRÍTICAS - Todos os setores onde não há risco de transmissão de infecção, não existem pacientes. ex.: Sala do médico, Farmácia, Auditório, Administração, Refeitório, Centro de estudos, pátios, jardins, etc (RUTALA,1996).

Procedimentos invasivos e cirúrgicos realizados no ambiente hospitalar podem contribuir para as IRAS. Apesar de procedimentos de esterilização e de técnicas de assepsia mais avançadas, as infecções associadas a dispositivos hospitalares representam ainda um grave problema relacionado, em parte, com o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos (RENOM et al., 2007). Há relatos de infecções associadas a procedimentos invasivos diretamente relacionadas com limpeza e desinfecção primária e de alto nível inadequadas. A transmissão desses agentes infecciosos está diretamente relacionada com a maneira incorreta de reaproveitar os materiais de fins cirúrgicos, tão comuns nestes ambientes (HOWIE; ALFA, 2008).

Dentre os fatores que contribuem para a ocorrência de infecções hospitalares podemos ressaltar as transferências de genes de resistência bacteriana, o uso indiscriminado e irracional de agentes antimicrobianos, a limpeza e desinfecção inadequada das superfícies inanimadas e de materiais críticos e semi-críticos.

O crescimento de microrganismos pode ser controlado através de métodos químicos e físicos. Este controle pode levar à eliminação total dos microrganismos ou não. Dentre os

métodos de eliminação parcial de microrganismos de determinado material ou ambiente, os mais conhecidos são os de desinfecção e anti-sepsia. Os agentes químicos são utilizados para controlar o crescimento bacteriano tanto em tecidos vivos como em objetos inanimados. A maioria dos agentes químicos somente reduz a população bacteriana. Nenhum desinfetante isolado será apropriado para todas as circunstâncias. Uma importante diferença entre os desinfetantes e os anti-sépticos está o grau de toxicidade, onde os desinfetantes atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de microrganismos em superfícies e materiais inanimadas, enquanto que os anti-sépticos atuam eliminando e/ou inibindo a multiplicação de microrganismos em tecidos vivos (VERMELHO et al., 2007).

O processo de desinfecção pode ser classificado como de (I) alto nível, onde o agente químico tem ação em formas vegetativas, esporos bacterianos, fungos e vírus, (II) nível intermediário, o agente químico não tem ação nos esporos bacterianos e (III) nível baixo, onde o agente químico possui ação somente em formas vegetativas bacterianas, ou seja, não há diferença por definição significativa entre estes dois últimos níveis, o que vai variar de acordo com cada processo de desinfecção (FAVERO; BOND, 1991; MCDONNELL, 2007).

A desinfecção de alto nível, em geral, é aplicada em instrumentos cirúrgicos ou outros materiais com fins semelhantes classificados como críticos e semicríticos, onde o agente químico realiza a desinfecção por um período de mínimo de 30 minutos. Os artigos destinados à penetração através da pele e mucosas adjacentes, nos tecidos sub-epiteliais e no sistema vascular, bem como, em todos os que estejam diretamente conectados com este sistema, são chamados de artigos críticos. De forma geral, artigos críticos requerem esterilização para satisfazer os objetivos a que se propõem. Já os artigos destinados ao contato com a pele não íntegra ou com mucosas íntegras, são chamados de artigos semicríticos e requerem desinfecção ou esterilização, dependendo do fim a que se destinam exemplos endoscópios, lâminas de laringoscópios, diafragma e outros. Esses materiais devem ser livres de microrganismos, entretanto é permitido um pequeno número de esporos bacterianos. Os materiais não críticos são aqueles que entram em contato com a pele intacta, mas não com as membranas mucosas, e a pele atua como uma barreira efetiva contra possíveis patógenos, por isso a esterilidade dos artigos não é essencial (FAVERO, 1987; GERVERICHI, et al., 1990; RUTALA;WEBER, 2008).

Descontaminação é um termo usado para descrever um processo ou tratamento que torna um material hospitalar, instrumento ou superfície, seguro para o manuseio e uso. Um processo de descontaminação não significa, necessariamente, que este material está seguro para sua utilização no paciente, uma vez que, o procedimento de descontaminação pode variar

desde um processo de esterilização ou desinfecção ou até uma simples lavagem com água e sabão (BLOCK, 1991).

Quando se emprega o termo descontaminação, o que usualmente vem à mente é apenas a primeira etapa de um processo de esterilização ou desinfecção, e como tal, denominado descontaminação prévia que além de tornar os materiais médico-cirúrgicos seguros para o manuseio, tornando a desinfecção e esterilização mais fáceis, menos dispendiosas e com menor probabilidade de carrear material pirogênico (VERMELHO et al., 2007).

A descontaminação prévia tem sido realizada pela imersão dos materiais médico-cirúrgicos com presença de matéria orgânica, microrganismos e outros resíduos decorrentes do uso, em uma solução desinfetante por um tempo de exposição que varia de 15 a 30 minutos, objetivando-se a eliminação ou redução dos microrganismos presentes, antes de submetê-los à limpeza mecânica com água e sabão, com vista a minimizar os riscos ocupacionais (RUTALA;WEBER, 2008).

Um processo muito importante na busca por um ambiente hospitalar controlado é a escolha dos agentes químicos adequados para cada tipo de desinfecção bem como o controle de desinfecção de superfícies, a desinfecção de materiais críticos e semicríticos, antisepsia e outros materiais de pertinência hospitalar.

1.4 Agentes químicos utilizados em procedimentos de desinfecção no ambiente hospitalar

1.4.1 Glutaraldeído

Glutaraldeído é um agente desinfetante bactericida que apresenta rápida e efetiva ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis*, alguns fungos e vírus, incluindo os da hepatite B e HIV. É lentamente efetivo contra esporos. Uma solução apresenta atividade ótima em pH entre 7,5 e 8,5, sendo quimicamente estáveis por 14 dias. Soluções com valores de pH menores são mais estáveis (DRUGDEX, 2007). A solução a 2%, em pH 8 (glutaraldeído ativado/alcalino) é utilizado para a desinfecção e esterilização de instrumentos, como endoscópios, instrumentos odontológicos, equipamentos de borracha ou plástico e outros que não podem ser submetidos ao calor (WHO, 2004; MARTINDALE, 2007). Até alguns anos atrás a Anvisa indicava o glutaraldeído 2%, como um potente biocida, bactericida, virucida, fungicida e esporicida

sendo o desinfetante de primeira escolha utilizado nos hospitais, cuja atividade advem da alquilação de grupos sulfidríla, hidroxila, carboxila e amino dos microrganismos alterando seu DNA, RNA e a síntese de proteínas. A atividade esporicida do glutaraldeído se deve ao fato deste reagir com a superfície do esporo, provocando o endurecimento das camadas externas. O glutaraldeído tem sido utilizado em muitos hospitais para desinfecções de materiais, sobretudo os de fins cirúrgicos críticos e semicríticos como endoscópios, instrumentos odontológicos, equipamentos de borracha ou plástico e outros (que não podem ser submetidos ao calor) em razão de não ser corrosivo (LORENA; DUARTE; PITOMPO, 2009), embora mesmo com suas desvantagens tóxicas.

Consoante, diversos artigos vêm contestando sua eficácia frente alguns microrganismos isolados desses materiais. A família *Mycobacteriaceae* que abrange microrganismos caracterizados como bastonetes aeróbicos, imóveis, não encapsulados e não esporulados possui características tais como: coloração álcool-ácido resistentes que em uma camada espessa de ácido micólicos a qual substitui a camada externa de lipopolissacarídeo encontrado em outras bactérias e contribui no seu processo de resistência a agentes químicos e físicos (TORTURA; FUNKE; CASE, 2005; BRITO, 2008). Especificamente um deles foi o clone BRA100 de *Mycobacterium massiliense*, que foi isolado em um surto de infecção pós-cirúrgica. Após a realização de testes de susceptibilidade ele apresentou tolerância ao glutaraldeído a 2% por até 10 horas de exposição a este agente (DUARTE et al., 2009).

Em razão de diversos outros relatos de tolerância ao glutaraldeído a 2%, bem como, o fato da sua toxicidade, teratogenicidade ele foi suspenso inicialmente para uso como esterelizante pela secretaria do Estado do Rio de Janeiro pela Resolução SESDEC nº 431 de 29 de agosto de 2008 e, posteriormente, pela Anvisa através da RDC nº 31 de 04 de julho de 2011. Adicionalmente, este agente químico teve sua aplicação bastante reduzida quando o objetivo é a desinfecção de alto nível.

1.4.2 Ácido peracético

O ácido peracético tem como princípio ativo uma combinação estabilizada de uma molécula de oxigênio ativo, doada pelo peróxido de hidrogênio e uma molécula de ácido acético. Devido ao seu alto poder oxidante, o ácido peracético promove a oxidação dos componentes celulares, agindo sobre a membrana citoplasmática e desativando as funções fisiológicas incluindo a barreira osmótica. Foi sugerido o seu uso como alternativa para substituir o GA na desinfecção de artigos críticos e semicríticos visto que apresenta eficácia

contra diversos microrganismos devido à sua ação esporocida, bactericida, tuberculocida, virocida e fungicida, mesmo na presença de matéria orgânica (SATTAR; SPRINGTHORPE, 2001; MCDONNELL, 2007). Entretanto, o uso do ácido peracético possui algumas desvantagens, tais como: tempo reduzido de ação pós-diluição, onde uma solução a 1% de perde a atividade em seis dias por hidrólise e/ou oxidação na presença de ferro e cobre, além da baixa estabilidade durante a estocagem e necessidade de manuseio especializado uma vez que provoca irritação da pele e de possuir uma pequena atividade corrosiva (BLOCK, 2001).

1.4.3 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio um sal do ácido hipocloroso que possui um alto poder oxidante e em equilíbrio com o ânion hipoclorito, devido à carga neutra e ao pequeno tamanho, difunde-se facilmente pela parede celular das bactérias. A mudança no potencial de oxidação-redução da célula causada pela presença do ácido hipocloroso desativa a enzima triosefosfato desidrogenase, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é essencial para a digestão da glicose dos microrganismos, entretanto sua utilização se limita a superfícies físicas inanimadas como chão, parede e outros materiais que não entram em contato direto com o paciente, graças ao seu alto poder corrosivo, sendo descartado na desinfecção em materiais críticos e semicríticos, uma vez que estes são constituídos de materiais sensíveis como plástico, borracha e metais leves (ANDRADE, 1988).

1.4.4 Monopersulfato de potássio 1%

Monopersulfato de potássio é um agente químico novo que atua oxidando os grupos sulfidrilas presente nas proteínas com isso eliminando os microrganismos, sua característica mais importante é que ele é ativo na presença de matéria orgânica, além de não ser corrosivo para metais. Entretanto, tem sido mais usado em materiais não críticos, possui pontos negativos como: sua baixa eficácia frente às micobactérias além de ter sua atividade diminuída totalmente após sete dias de sua ativação, sem contar que necessita ser diluído e manter controle de sua cor e com isso a necessidade de manejo por profissionais

tecnicamente capacitados, pois de acordo com a diminuição da intensidade da cor significa diminuição de sua eficácia.

1.4.5 Ortoftaldeido

Considerado desinfetante de alto nível pelo FDA (Food and Drug Administration), em outubro de 1999, o ortoftaldeido tem como mecanismo de ação a sua interação com proteínas e aminoácidos dos microrganismos e possui vantagens quando comparado com glutaraldeído em relação à toxicidade, odor, boa estabilidade no pH entre 3 e 9, não é irritante aos olhos nem tão pouco às vias aéreas, não é teratogênico e também não é mutagênico. Entretanto, como desvantagens possui propriedades que mancham a pele, mucosas, roupas e superfícies expostas ao meio ambiente, pode causar hipersensibilidade em pacientes com exposições repetidas e possui custo maior que glutaraldeído além de possuir baixa atividade esporocida (DISCH, 1994).

1.4.6 Glucoprotamina

A glucoprotamina, outro agente recentemente desenvolvido, oriundo de uma reação de conversão do aminoácido L-Glutâmico com a cocosamina, uma substância extraída do coco. Possui eficácia bem acreditada mesmo com seu mecanismo de ação ainda não completamente elucidado, muitos acreditam que tem relação com a oxidação de substância vitais dos microrganismos, possui vantagens ecologicamente importantes, pois como é biodegradável tem seu descarte, sem agressividade para o meio ambiente, não sendo necessária sua neutralização. Outro ponto positivo é seu auto espectro de ação contra microrganismos, não é corrosivo tem afinidade com grande parte dos metais como aço inoxidável, latão, alumínio, e outros (SIMONS et al.,2000; WIDMER; FREI, 2003).

São grandes as promessas mas até o momento não temos muitas opções quando o assunto é desinfecção de materiais médicos-cirúrgicos, que são muitas das vezes contestados em razão de peculiaridades específicas com vantagens e desvantagens, entretanto não se pode deixar de considerar que quem executa esse trabalho muitas das vezes não tem o preparo técnico para diluir corretamente, verificar tempo de atividade e outras atividades técnicas. Por essa razão a otimização de protocolos, ensaios e testes assim como palestras e cursos para estes funcionários devem ser feitos com períodos de tempos curtos.

Outro possível mecanismo de tolerância, são as deficiências nos canais de purinas, que são proteínas expostas na superfícies da célula bacteriana e que geralmente transportam moléculas como antibióticos e desinfetantes, para o interior da célula, também pode representar um possível mecanismo de tolerância a agentes químicos sobretudo a agentes a base de aldeído como glutaraldeído e ortoftalaldeído (SVETLIKOVÁ et al., 2009), um estudo desenvolvido utilizou um Cepa de *M. smegmatis* que sofreu uma mutação que não continha o gene de MspA, da principal porina, apontou aumento significativo com relação a resistência a alguns antibióticos, em razão da modificações na permeabilidade da parede celular (STEPHAN et al., 2004).

1.5 Fatores que interferem no processo de desinfecção

A matéria orgânica é um fator diretamente relacionado com a ineficácia de agentes químicos uma vez, que alguns agentes químicos sofrem interferência em sua ação quando na presença de cadeias carbônicas (LEWIS; ARENS, 1995). Avaliar a influência da matéria orgânica no processo de desinfecção é muito importante uma vez que, materiais críticos e semicríticos estão em contato direto com substancia com pus, sangue, soro e outras cadeias carbônicas.

A limpeza mecânica com água e sabão, realizada manualmente com auxílio de escova e com uso de equipamento de proteção individual (EPI), visa a remoção de todo material orgânico e a redução dos microrganismos presentes nos materiais cirúrgicos.

A presença de matéria orgânica pode interferir com a atividade antimicrobiana dos desinfetantes ou mesmo constituir-se numa barreira física de proteção aos microrganismos durante os processos de desinfecção e/ou esterilização por meios físicos ou químicos.

A limpeza meticulosa dos materiais cirúrgicos, antes de submetê-los à desinfecção e/ou esterilização é um procedimento unânime e universal, as controvérsias ocorrem em relação ao momento da realização da limpeza e até mesmo na conceituação e compreensão do que seja limpeza e descontaminação(SOUZA et al., 1998).

Existem fatores que podem interferir diretamente no controle microbiano nestes ambientes como, por exemplo, mecanismos de auto defesa utilizados por microrganismos, como produção de biofilme, a parede celular das bactérias Gram positivas que possui uma alta concentração de diversos compostos bioquímicos como LPS, lipídios e outros apresentando com isso um perfil hidrofóbico muito intenso que confere propriedades favorecendo a tolerância a agentes químicos hidrofílicos. (DONLAN; COSTERTON, 2002)

Outros fatores que podem alterar a ação dos agentes químicos nos processos de desinfecção são aquisição de genes de resistência através de transferência genética, bombas de efluxo, mecanismos de bombeamento de substâncias químicas para fora do citoplasma bacteriano, canais de porinas que são proteínas de grande peso molecular encontrada tipicamente em membranas externas de bactérias e que como estas membranas são compostas de lipídeos e peptídeoglicanos, são bastante impermeáveis estes canais favorecem a entrada de substâncias hidrofílicas, entretanto quando estes canais são irregulares há uma diminuição de substâncias e nutrientes hidrofílicos. (COSTERTON et al., 2003)

1.6 Biofilme bacteriano

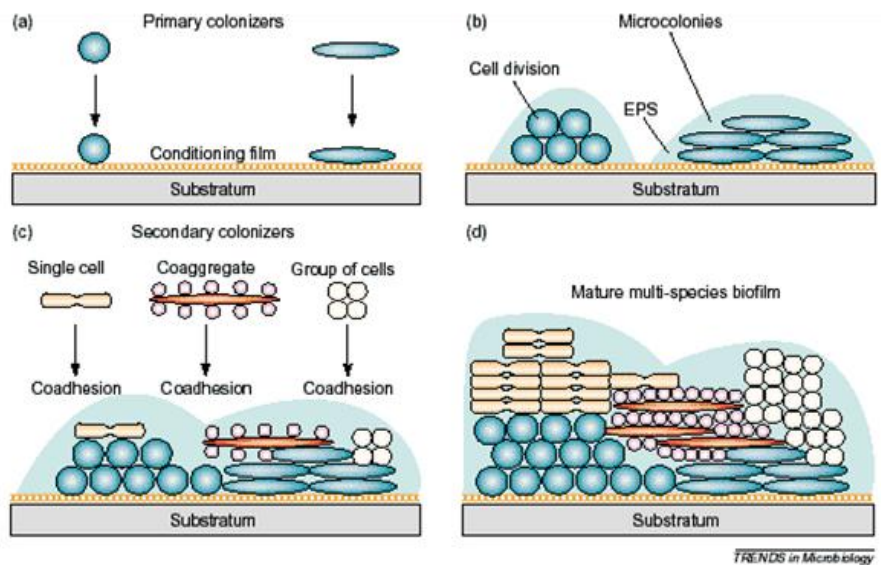
O biofilme pode ser definido como um conjunto de bactérias firmemente aderida a uma superfície, englobado por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos produzidos pelas próprias bactérias. O biofilme bacteriano consiste em uma forma sésil e adaptativa no ciclo biológico das bactérias, com características genótípicas e fenótípicas distintas que o distingue das formas bacterianas livres e circulantes, denominadas de formas planctônicas. Estima-se que cerca de 99% das bactérias da natureza em algum momento se apresentam sob a forma de biofilme. Analogamente, os biofilmes poderiam ser comparados aos recifes de corais e as bactérias planctônicas aos plânctons do oceano (COSTERTON et al., 2003). Os biofilmes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas.

O ciclo biológico para a formação de um biofilme passa pelas etapas de contato, adesão, formação de pequenas colônias, maturação e dispersão que dependem da influência do meio ambiente e das características genéticas das bactérias. A formação do biofilme é iniciada através das bactérias circulantes, que ao entrarem em contato com uma superfície, iniciam o processo de adesão formando pontes de ligação entre si e a superfície. À medida que a população em sua proximidade aumenta, as bactérias se organizam em microcolônias dispostas em monocamadas. Durante as etapas de contato, adesão e formação de pequenas colônias cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que, dependendo dos estímulos locais e principalmente da concentração atingida no microambiente, desencadeiam na ativação de genes específicos com a mudança do fenótipo de bactérias planctônicas para o fenótipo de biofilme, conforme ilustrado na **(Figura 1)** (COSTERTON et al., 1995).

Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada à proteção contra possíveis agressões no ambiente. As modificações que ocorrem na forma de biofilme trazem inúmeras vantagens às bactérias. O envoltório extracelular as protege contra agressões físicas e químicas do meio externo, como a ação de raios ultravioleta e alterações do pH e de osmolaridade, além de reduzir significativamente a ação de mecanismos adaptativos e inatos do sistema imunológico, como a ação de células fagocitárias, opsonização de anticorpos. Neste processo as proteínas (opsoninas) ligam-se à superfície de bactérias ou a outros patógenos, facilitando o seu reconhecimento por receptores específicos presentes na superfície de fagócitos, favorecendo a digestão dos mesmos pelos neutrófilos, e atuando no sistema complemento (HOYLE; COSTERTON, 1991).

A produção de biofilme pelos microrganismos ocorre preferencialmente em superfícies inertes, como dispositivos médicos, mas pode também ocorrer em tecidos vivos, como ocorre em infecções invasivas. O tratamento bem sucedido, nestes casos, a longo prazo depende de doses elevadas de antibióticos e a remoção de qualquer corpo estranho (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; MOHAMED et al., 2004, FUX et al., 2005, SOUSA et al., 2011). Por outro lado, tem sido demonstrado que a ação de antimicrobiano sobre os biofilmes se torna extremamente reduzida em função de mecanismos de inativação exercidos pela matriz extracelular, da dificuldade de penetração no interior dos biofilmes e alteração na taxa de metabolismo das bactérias em seu interior, desta forma, bactérias em um biofilme encontram-se abrigadas e em relativa homeostase, graças à presença da matriz exopolissacarídica (EPS). A matriz contém vários componentes: exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros. O exopolissacarídeo é secretado para o meio externo, sendo de diferentes composições. Ao que parece, o EPS tem diferentes estruturas e funções, dependendo das comunidades e/ou condições ambientais. Uma de suas funções é impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente. Em alguns casos o EPS é capaz de sequestrar cátions, metais e toxinas. Por estas razões, o biofilme é um fator imprescindível para a bactéria no que tange a proteção a agentes externos, e ainda favorecer a transferência de genes de resistência entre microrganismos da mesma espécie ou até de espécies diferentes (CERI et al., 2001).

Figura 1 - Desenvolvimento de um biofilme



Legenda:(a) Colonização primária de um substrato; (b) crescimento, divisão celular e produção do exopolissacarídeo (EPS), com o desenvolvimento de microcolônias; (c) coadesão de células individuais, de células coagregadas e grupos de células idênticas, originando um biofilme jovem, de múltiplas espécies; (d) maturação e formação de mosaicos clonais no biofilme maduro.

Fonte: (Adaptado de Rickard *et al.*, *Trends Microbiol.*, **11**:94-100, 2003)

Outra preocupação com o biofilme são os plasmídeos bacterianos que são componentes genéticos extracromossomiais capazes de transferir genes de resistências para outras bactérias. Estes podem ser transferidos horizontalmente por conjugação, para diferentes espécies presentes em um biofilme. Muitos pesquisadores alertam que biofilmes bacterianos favorecem a resistência a agentes químicos antimicrobianos como: desinfetantes, antibióticos e também a radiação ultravioleta (ELASRI; MILLER, 1999). Estudos alertam que a radiação ultravioleta não produz nenhum efeito sobre células contidas no biofilme, pois há evidências que os biofilmes apresentam uma propriedade protetora à radiação ultravioleta (MOHAMED; MILLER, 1999). As células bacterianas contidas em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos comparadas com as células em seu estado planctônico (CERI *et al.*, 2001). Diversos são os problemas causados pelos biofilmes como: biocorrosão, comprometimento de

dispositivos pertinentes em ambientes hospitalar, entre outros, tudo isso é acrescido ao potencial de resistência cruzada aos agentes químicos antimicrobianos (SIMÕES et al., 2003).

Infecções associadas a biofilmes geralmente são de natureza recorrente, visto que as terapias antimicrobianas convencionais eliminam predominantemente as formas planctônicas, deixando as células sésseis livres para se reproduzir e propagar no biofilme após o tratamento. Para tornar o quadro ainda mais grave, as bactérias presentes nos biofilmes encontram-se mais protegidas contra o sistema imune do hospedeiro. Exemplos típicos de doenças associadas a biofilmes incluem as infecções de implantes tais como válvulas cardíacas, cateteres, lentes de contato, dentre outros (MOHAMED et al., 2004).

Os biofilmes podem ainda promover doenças se formados em tecidos, tais como nas infecções pulmonares, periodontite e outras que colonizam uma grande parte das superfícies direta ou indiretamente, sendo então capaz de invadir as células das mucosas e liberar toxinas (MILLER, 1999).

Em determinados momentos, os biofilmes sofrem dispersão, liberando microrganismos que podem vir a colonizar novos ambientes. Esse processo pode ser dividido em dispersão, quando parte das células de uma colônia sofre lise e outras retomam a motilidade, sendo então liberadas da estrutura. Outro processo de dispersão é chamado de dispersão de fragmentação. Neste, porções de matriz extracelular associadas a microrganismos são liberadas. Enfim o último processo de dispersão que é chamado de dispersão superficial que ocorre pelo crescimento do próprio biofilme como um todo (SIMÕES et al., 2003).

1.7 Produção de biofilme de corinebactérias

A adesão microbiana e a formação de biofilme podem representar um problema de Saúde Pública. Mais de 60% das infecções bacterianas tratadas pelos clínicos são consideradas com envolvimento de espécies formadoras de biofilme. Nas últimas duas décadas o interesse no estudo em biofilmes tem ganhado grande impulso após a demonstração da relação causal entre inúmeras doenças infecciosas crônicas e hospitalares associando a infecções relacionadas a dispositivos invasivos e recidivantes e a presença de biofilmes bacterianos (COSTERTON, 1999). Mesmo em indivíduos com excelentes reações imunes celulares e humorais, essas infecções são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Tomando em consideração o envelhecimento da população e o número cada vez maior de dispositivos médicos implantáveis, espera-se o aumento do número de

infecções causadas por patógenos oportunistas, associadas a biofilmes (STEWART; COSTERTON, 2001; SOUSA et al., 2011).

Para algumas espécies de corinebactérias já foram descritas propriedades adesivas as superfícies bióticas e abióticas e de produção de biofilme, incluindo *C. jeikeium*, *Corynebacterium macginleyi* e *C. diphtheriae* (WANG et al., 2001; KWASZEWSKA et al., 2006, SUZUKI et al., 2007). Estudos iniciais sobre a adesão a superfícies abióticas e formação de biofilme por *C. pseudodiphtheriticum* foram realizados recentemente em nosso laboratório (SOUZA, 2013).

Amostras de *C. pseudodiphtheriticum* exibiram um padrão de aderência agregativa que foi previamente associada com a invasividade e sobrevivência intracelular de alguns agentes patogênicos humanos, incluindo *C. diphtheriae* (HIRATA Jr et al., 2008) e *Escherichia coli* (PEREIRA et al., 2008). É geralmente reconhecido que a patogênese da *Escherichia coli* pode ser dividida em várias fases, incluindo a colonização, a aderência e a formação de biofilme. Aderência deste microorganismo pode ser mostrada e contar com vários fatores diferentes que em conjunto contribuem de várias formas para mostrar o fenótipo de aderência agregativa. Sugere-se uma correlação entre a capacidade de expressar as fímbrias AA (AAF) e a capacidade de formar biofilme (HARRINGTON et al., 2006; HUANG et al., 2006, FUJIYAMA et al., 2008). Desde a década de 70, já tem sido demonstrada a presença de fímbrias em algumas espécies de corinebactérias incluindo *C. pseudodiphtheriticum* e *C. diphtheriae* (YANAGAWA; HONDA, 1976).

Frequentemente as bactérias podem mudar um estilo de vida livre a um estilo de vida multicelular superficial adaptado, conhecido como biofilme. Em biofilmes, as bactérias tornam-se altamente diferenciadas de bactérias de vida livre e muitas vezes apresentam uma sequência de desenvolvimento caracterizada em diferentes fases, tais como: fixação inicial, fixação irreversível, maturação e dispersão. Adesão primária de bactérias planctônicas é um passo crucial na formação de biofilme. Na fase inicial, a aderência microbiana reversível é principalmente dependente das características da superfície da célula bacteriana e de parâmetros ambientais, tais como a natureza da superfície do material, a disponibilidade de substratos e nutrientes (STANLEY; LAZAZZERA, 2004). A aderência das bactérias à superfície biomateriais é uma consequência das interações físico-químicas ocorridas entre o microrganismo e o substrato durante o processo de adesão. Este processo de adesão compreendem as forças de van der Waals, ácido-base de Lewis, e as forças electrostáticas (ROSENBERG, 1981). A presença de proteínas associadas a superfície bacteriana pode estar associadas com a adesão inicial e a hidrofobicidade de superfície celular (COSTERTON et

al., 1999; EIFF VON et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; SOUSA et al., 2011). Em geral, as amostras produtoras de biofilme demonstram uma maior aderência a superfícies plásticas, em comparação com as amostras não produtoras de biofilme. *C. diphtheriae* e espécies lipofílicas de corinebactérias isoladas de pele foram relacionadas com hidrofobicidade e a formação de biofilmes em superfícies sólidas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1999; KWASZEWSKA et al., 2006). Semelhante a *C. diphtheriae*, *C. urealyticum* e um número de outras espécies bacterianas (ROSENBERG, 1981; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; SORIANO et al., 2008), foi observada a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* ao poliestireno atribuída às interações hidrofóbicas entre as células e a carga negativa da superfície do plástico. No entanto, as amostras clínicas de *C. pseudodiphtheriticum* parecem exibir diferenças na capacidade de produção de biofilmes em superfícies de poliestireno (SOUZA, 2013).

Após a etapa inicial de aderência à superfície do substrato, as bactérias se multiplicam formando microcolônias e se acumulam como agrupamentos de células em várias camadas, um passo que envolve a adesão intercelular e a síntese de moléculas de matriz extracelular, tais como proteínas e polissacarídeos. A formação de microcolônias é uma resposta coordenada e adaptativa que facilita o desenvolvimento continuado e dispersão do biofilme. O contínuo crescimento dos microrganismos no biofilme ocorre conduzindo à formação de densos agregados bacterianos incorporados à matriz exopolimérica rodeado por uma rede de canais, típicos de biofilmes maduros (O'TOOLE et al., 2000; WEBB et al., 2003). Os biofilmes maduros podem então ser submetido a um processo de distanciamento liberando bactérias planctônicas que podem, em seguida, colonizar uma outra região ou substrato para formar novas microcolônias (KARATAN; WATNICK, 2009).

As amostras de *C. pseudodiphtheriticum* foram evidenciadas como forte produtoras de biofilme na superfície do vidro. Da mesma forma a amostra de *C. diphtheriae* BR-CAT5003748 relacionada ao cateter (GOMES et al., 2009; SOUZA, 2013), a formação de microcolônia foi verificada por ambas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* ATCC 10700/Faringite e HHC1507/Bacteremia em superfícies hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (poliuretano). Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzidas por microrganismos são uma mistura complexa de biopolímeros principalmente constituídos por polissacarídeos, bem como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e de substâncias húmicas. Contudo, os EPS formam o espaço intercelular dos agregados microbianos, a estrutura e a arquitetura do biofilme (VU et al., 2009). A aderência de *C. diphtheriae* a superfícies hidrofílicas de vidro foi atribuída à presença de moléculas de matriz extracelular, principalmente polissacarídeos

com níveis elevados de resíduos de ácido siálico (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1991; GOMES et al., 2009).

A quantidade de microrganismo, a espécie do microrganismo, em que superfície ele está exposto, que outras substâncias bióticas ou abióticas estão associadas a superfície e os microrganismos, muitos são os fatores que podem influenciar na formação de biofilme. Os poliuretanos são normalmente usados em várias aplicações médicas, incluindo cateteres e tubos para fins gerais, de cama hospitalar, lençóis cirúrgicos e curativos (DONLAN; COSTERTON, 2002; DONLAN, 2008). Geralmente são encontrados estudos na literatura que indicam que o aumento da síntese de exopolissacárido está muitas vezes relacionado com espécies bacterianas produtoras de biofilme em cateteres associados com infecções sintomáticas (OLSON et al., 2002). Uma grande quantidade de material de biofilme exibindo microcolônias bacterianas e material amorfo foi observado na superfície e interior do cateter de poliuretano infectado *in vitro* com *C. pseudodiphtheriticum*. Assim como outros agentes patogênicos Gram-positivos e *C. diphtheriae* (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; GOMES et al., 2009) a aderência de *C. pseudodiphtheriticum* a poliuretano pode ser parcialmente explicada pelas cargas positivas associadas com este polímero. A substância amorfa depositada ou glicocálice observada circundante às microcolônias de *C. pseudodiphtheriticum* nas superfícies do cateter de poliuretano reforça o fato de que as bactérias podem produzir ou atrair componentes exopoliméricos que fortalecem a sua ligação com superfícies inertes *in vitro*. Além disso, a substância amorfa foi observada na superfície externa de cateter de poliuretano infectados *in vitro* com *C. pseudodiphtheriticum*. Os dados sugerem que a espécie *C. pseudodiphtheriticum*, como outros agentes patogênicos, a partir de fontes exógenas ou endógenos, podem invadir através de uma ferida na inserção do cateter e migrarem ao longo da superfície externa do cateter e eventualmente colonizar o segmento de cateter (FRANSON et al., 1984).

Em ambientes naturais, as bactérias aderem principalmente à camada de moléculas adsorvidas, que reveste as superfícies inertes, a "película de condicionamento", assim chamada, e não diretamente ao substrato. *In vivo*, qualquer superfície de material é rapidamente coberta por plasma e proteínas de matriz para a qual as bactérias podem expressar adesinas específicas (ARCIOLA et al., 2005). A estimulação da formação de biofilme bacteriano por proteínas exógenas de mamíferos tem sido relatada em muitos patógenos humanos (BONIFAIT et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Uma vez que não foram observados na literatura disponível, trabalhos que investigassem a produção de biofilme e a ação de desinfetantes e de antissépticos sobre *C. striatum*, o presente estudo teve como objetivo geral a avaliação do perfil de resistência/tolerância frente a diferentes biocidas de formas planctônicas de amostras de *C. striatum* isoladas de surto nosocomial. Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de produção de biofilme em superfícies abióticas e de sobrevivência das formas sésseis na presença de biocidas (glutaraldeído e álcool etílico 70%) comumente utilizados na manutenção do ambiente hospitalar e também na comunidade.

2.2 Objetivos específicos

Nesse sentido, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos utilizando -se 14 amostras de *C. striatum* pertencentes a quatro pulsotipos que foram isoladas durante um surto epidêmico em hospital universitário a região metropolitana do Rio de Janeiro.

- a) Avaliação da susceptibilidade a soluções dos desinfetantes glutaraldeído 2%, ácido peracético 2%, hipoclorito de sódio 2,5%, alquil benzeno sulfonato de sódio 2% e monopersulfato de potássio 1%;
- b) Avaliação da susceptibilidade aos anti-sépticos álcool etílico 70%, álcool iodado e clorexidina 2%;
- c) Pesquisa da capacidade de aderência em superfícies inertes sólidas de natureza hidrofílica (vidro), hidrofóbica (poliestireno) e metálica (material empregado na produção de pinças);
- d) Pesquisa da capacidade de aderência e de produção de biofilme em superfícies externas e internas de catéteres de poliuretano pela técnica de Maki;
- e) Análise morfológica da composição estrutural do biofilme pela técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV;
- f) Pesquisa da influência da presença de desinfetantes e de anti-sépticos na produção de biofilme pelo *C. striatum*;
- g) Pesquisa da influência de matéria orgânica na produção de biofilme de *C. striatum* na ausência e na presença dos agentes químicos antimicrobianos utilizados no estudo;

h) Correlação das propriedades biológicas descritas acima com os perfis de susceptibilidade a 21 antimicrobianos e os diferentes clones determinados por PFGE (pulstipos I, II, III e IV) das amostras estudadas de *C. striatum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem, identificação e e estocagem das amostras bacterianas

Foram utilizadas 14 amostras parcialmente estudadas (Baio et al., 2013) de *C. striatum* isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto Estado, Rio de Janeiro, Brasil (**Tabela 2**) além das amostras isoladas de humanos - *Corynebacterium diphtheriae* CAT5003/BR e *Staphylococcus aureus* - que foram incluídas como controles em diferentes etapas desta investigação. Os microrganismos encontravam-se estocados em *Skim Milk* a -70°C , na Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebacterioses de Importância Clínica – LDCIC – Disciplina de Microbiologia e Imunologia – FCM/UERJ.

As amostras de *C. striatum* foram previamente identificadas fenotípicamente por métodos bioquímicos convencionais e pelo *API Coryne System REF20900* (BioMérieuxTM), seguindo as indicações do fabricante.

3.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das amostras de *C. striatum* foram avaliados pelo método disco-difusão em e os resultados foram expressos como sensível (S) resistente (R) e intermediário (I), conforme previamente descrito por alguns autores como: Martinez-Martinez et al., 1995; Funke et al., 1997; CLSI, 2007; Martins et al., 2009; CLSI, 2011; Baio et al., 2013). Os seguintes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK) foram testados: penicilina (10U), ampicilina (30 μg), meticilina (5 μg), cefotaxima (30 μg), cefepime (30 μg), ceftriaxona (30 μg), imipenem (10 μg), eritromicina (15 μg), clindamicina (2 μg), linezolida (30 μg), ciprofloxacino (5 μg), moxifloxacino (5 μg), tetraciclina (30 μg), gentamicina (10 μg), rifampicina (5 μg), fosfomicina (200 μg), vancomicina (30 μg), mupirocina (200 μg), tobramicina (10 μg), nitrofurantoína (300 μg), ticarcilina/clavulanato (75 μg /10 μg).

3.3 Testes de susceptibilidade aos desinfetantes e antissépticos

3.3.1 Preparo de soluções de desinfetantes e antissépticos e de agentes neutralizantes

No presente estudo foram avaliados os perfis de sensibilidade de cepas de *C. striatum* frente a oito princípios ativos: álcool etílico 70%, álcool etílico iodado (70%/ 1%), Alquil benzeno sulfonato de sódio 2%, hipoclorito de sódio 1% glutaraldeído 2%, ácido peracético 2%, monopersulfato de potássio 1% e clorexidina 2%. Água destilada estéril foi utilizada como solvente no preparo de todas as soluções químicas apresentadas na **Tabela 3**.

3.3.2 Método de disco-difusãoTabela 2 - Origem e pulsotipos de 14 amostras parcialmente estudadas de *Corynebacterium striatum* isoladas de hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro*

Amostras	Ano	Idade/ sexo	Setor hospitalar	Sítio de isolamento	Evolução	Código API Coryne	Pulsotipos
2023	2009	M/66	UTI Geral	Sangue	Óbito	0100105	I
2032	2009	F/23	UTI Geral	Urina	Cura	2100105	I
2038	2009	F/54	DIP	Sangue	Óbito	0100104	II
1954	2009	M/NI	Cirurgia torácica	Ferida cirúrgica	NI	3100105	IV
1958	2009	M/51	Cirurgia torácica	Aspirado traqueal	NI	0100105	I
1959	2009	M/85	UTI Cardíaca	Aspirado traqueal	Cura	0100105	I
1961	2009	F/37	DIP	Urina	NI	3100105	III
1974	2009	M/59	Urologia	Aspirado traqueal	Óbito	0100105	I
1987	2009	F/50	Enf 18	BAL	Óbito	2100105	I
2369	2009	M/NI	UTI Geral	Aspirado traqueal	Cura	2100104	II
2539	2009	F/NI	Enf 18	Aspirado traqueal	Óbito	0100105	I
2063	2010	F/NI	UTI Geral	Aspirado traqueal	Óbito	2100105	I
2061	2010	M/57	Cirurgia torácica	Aspirado traqueal	Cura	2100105	I
2083	2010	F/38	UTI II	Aspirado traqueal	Óbito	2100105	I

Legenda: NI, Não Informado; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; Enf, Enfermaria; BAL, Lavado bronco-alveolar; MDR, multiresistente (três ou mais tipos de antibióticos); *, Baio et al. 2013.

Seguindo as recomendações do CLSI 2010, todas as cepas bacterianas estudadas foram inicialmente semeadas pela técnica de esgotamento em placas de Petri (150 mm) preenchidas com 70 mL de meio ágar Mueller-Hinton. Para o preparo de suspensões bacterianas na concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, cinco colônias de cada cepa de *C. striatum* foram transferidas das placas de ágar sangue para tubos de ensaios contendo 2 mL de caldo brain heart infusion (BHI) acrescido de 0,1% de Tween 80. Após período de incubação de 48h/37C°, *swabs* estéreis foram imersos nas suspensões bacterianas, com o cuidado de pressioná-los contra as paredes do tubo para retirada do excesso de líquido, e

semeados uniformemente, por estrias justapostas, nas placas de ágar Mueller-Hinton sangue, em três direções e por toda a superfície do meio (**Figura 2**). Antes da inserção dos discos na placa, foram esperados 10 minutos para a secagem do inóculo semeado na placa.

Discos estéreis de papel filtro, com 12,5 mm de diâmetro, foram embebidos em 75 µL da solução controle (solução salina estéril, NaCl 0,95%) e de cada solução a ser testada (álcool 70%, álcool iodado, hipoclorito de sódio 1%, glutaraldeído 2%, ácido peracético 2%, VIRKON 1%, clorexidina 2%) e mantidos em temperatura ambiente para secagem, durante um período de 10 minutos. Posteriormente, os discos foram distribuídos na superfície do ágar de maneira equidistante, com o auxílio de uma pinça estéril. Uma distância mínima de 24 mm foi mantida entre os centros dos discos na placa. Os resultados foram obtidos a partir da mensuração do diâmetro das zonas de inibição, onde se observa a ausência total de crescimento bacteriano. Após a realização dos testes, foi realizada a confirmação de pureza do microrganismo no ágar (BAUER, et al., 1996). É necessário ressaltar que os testes de sensibilidade *in vitro* realizados pelo método de disco-difusão podem sofrer interferência de alguns fatores de difícil controle que podem ser responsáveis por gerar resultados variáveis como, por exemplo, o coeficiente de difusão de cada produto analisado (OSBALDISTON 1973; SANTIAGO et al., 2010).

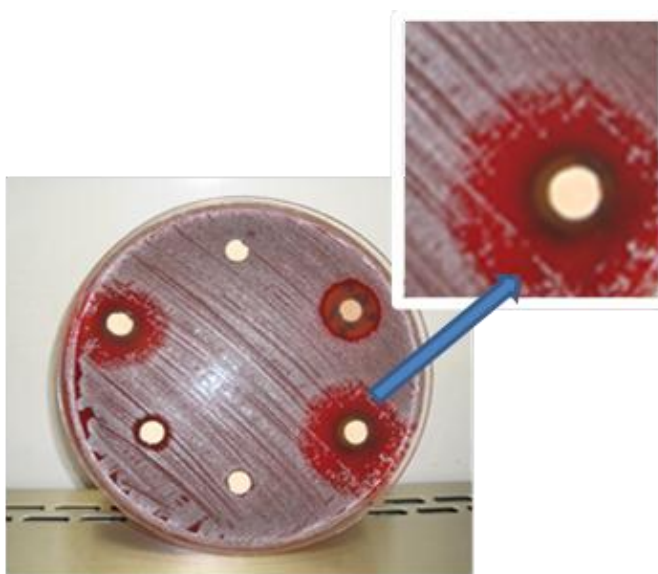
Tabela 3 - Soluções de desinfetantes, anti-sépticos e agentes neutralizantes utilizados no presente estudo

Agente químico	Ação	Concentração*	Referências
Glutaraldeído	Desinfetante	2%	SOUZA, et al., 1998.
Sulfito de sódio	Neutralizante	0,1%	SOUZA, et al., 1998.
Ácido peracético	Desinfetante	2%	MORAIS et al., 1997.
Tiosulfato de sódio	Neutralizante	0,6%	MORAIS et al., 1997.
Hipoclorito de sódio	Desinfetante	1%	SOUZA, et al., 1998.
Tiosulfato de sódio	Neutralizante	0,5%	SOUZA, et al., 1998.
Permonosulfato de potássio	Desinfetante	1%	ÁLVAREZ et al., 2011.

Tiosulfato de sódio e Soro fetal bovino	Neutralizante	1%,10%	ÁLVAREZ et al., 2011.
Clorexidina	Anti-séptico	2%	ÁLVAREZ et al.,2011.
Tween 80	Neutralizante	0,1%	ÁLVAREZ et al.,2011.
Álcool etílico-iodado	Anti-séptico	70%/1%	SOUZA, et al., 1998.
Tween 80	Neutralizante	2%	SOUZA, et al., 1998.
Álcool etílico	Anti-séptico	70%	SOUZA, et al., 1998.
Tween 80	Neutralizante	2%	SOUZA, et al., 1998.
Cloreto de Benzalcônio	Desinfetante	50%	NÁDIA; MITSUKO, 2003
Lecitina de soja	Neutralizante	0,5%	NÁDIA; MITSUKO, 2003.

Nota: *, Todos os agentes químicos foram solubilizados em H₂O destilada estéril.

Figura 2 - Imagens ilustrativas do teste de disco difusão com desinfetantes e antissépticos



Legenda: Realizado com amostras de *Corynebacterium striatum*.

Nota: Em detalhe, para alguns dos desinfetantes e anti-sépticos testados foram observadas colônias de bacteriais resistentes viáveis dentro dos halos.

3.3.3 Técnica de *Time Kill*

A eficácia dos desinfetantes e antissépticos utilizados em ambiente hospitalar foi investigada através do método *Time kill* (ASTM E 2315-03). Quatro cepas de *C. striatum* representantes de cada pulstotipo (1959/I; 2369/II; 1961/III; 1954/IV), isolados de hospital universitário na região metropolitana do Rio de Janeiro (BAIO et al., 2013), foram cultivadas em meio Trypticase Soy Broth -TSB, por 48h/37°C e depois foram lavadas em solução salina tamponada fosfatada – PBS, pH 7,2. Em seguida, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina com turvação correspondente a 0.5 da escala de McFarland. Após centrifugação as amostras foram ressuspensas na presença dos agentes de desinfecção e incubadas por diferentes períodos em temperatura de 22°C (**Figura 3**). A ação do desinfetante foi bloqueada pela adição dos respectivos compostos neutralizantes (**Tabela 3**) após o término do período de incubação. Em seguida, 100µL da suspensão bacteriana, contendo desinfetantes e os respectivos neutralizantes, foram diluídos e realizada a diluição seriada na base 10, semeados e plaqueados em meio Trypticase Soy agar - TSA em *spots* de 10 µL para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) após incubação por 48h/37°C.

3.4 Ensaios de interação bacteriana e de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas

3.4.1 Preparo das suspensões bacterianas

As 4 cepas representantes dos quatro pulstotipos de *C. striatum* foram previamente cultivados 37°C/48 h em placas de Trypticase Soy Agar –TSA. Suspensões bacterianas foram preparadas em tampão PBS pH 7,2 de turbidez equivalente a 0,5 e 0,2 da escala nefelométrica de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL e $\sim 10^3$ UFC/mL, respectivamente).

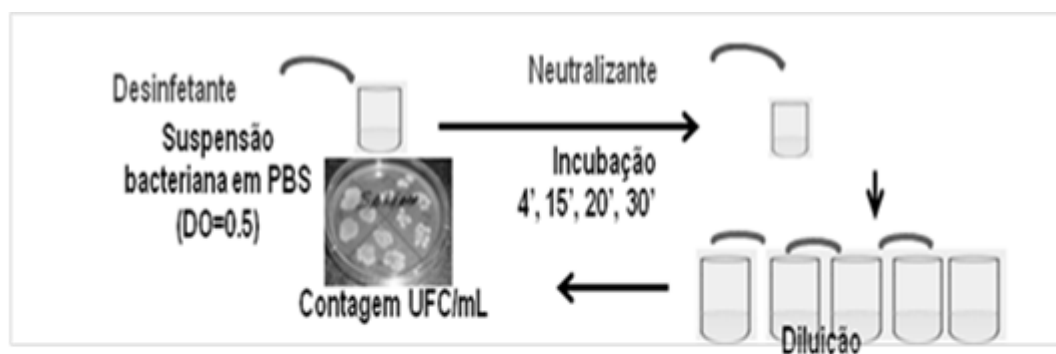
3.4.2 Aderência na superfície hidrofílica de vidro

Tubos de ensaio (15x100 mm) contendo 5 mL de meio de cultura TSB foram inoculados com amostras de *C. striatum* ($\sim 10^8$ UFC/mL) e incubados por 48 horas a 37°C. Cada cultura foi levemente homogeneizada por 5 segundos para remover células bacterianas não aderentes a superfície do vidro. Foi adicionado novo meio de cultura aos tubos e reincubados por mais 48 horas. O experimento foi repetido duas vezes. Após descarte do meio

de cultura, os tubos foram classificados numa escala de I a IV de acordo com os seguintes critérios: I – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV – ausência de bactérias aderidas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991).

Após a incubação também foi realizada cultura quantitativa através de extração das células sésseis por abrasão utilizando areia, realizado a diluição seriada na base 10. Após o crescimento em placa de ágar sangue, os microrganismos foram submetidos a contagem de viáveis (CFU/ml) e submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específicas, e depois confirmadas pelos mesmos métodos de identificação realizados na identificação das amostras estudadas (BRUN-BRUISSON et al., 1987; DOOLEY et al., 1996)

Figura 3 - Etapas de execução de ensaios *Time Kill* (ASTM E 2315-03)



Legenda: Testes realizados com amostras de origens diversas de *Corynebacterium striatum*

3.4.3 Ensaio semi-quantitativo de interação bacteriana na superfície hidrofóbica do poliestireno

Nos ensaios realizados em microplacas de 96 poços (Nunc®), foram adicionado em cada poço 200 µL de suspensão bacteriana preparada em meio TSB na concentração de $\sim 10^3$ UFC/mL. Após 48 h de incubação a 37°C, as microplacas foram lavadas com PBS pH 7,2 e coradas com cristal violeta a 2% por 5 min, depois as placas foram lavadas com H₂O, e submetidas a secagem em temperatura ambiente. Para a leitura, as placas foram eluídas com ácido acético e levadas ao leitor de ELISA (570 nm). A densidade óptica de corte (DOC) foi definida como a média da DO do controle negativo. As amostras foram classificadas nas seguintes categorias: não-aderentes (0: $DO < DOC$), fracamente (+: $DOC < DO \leq 2x DOC$), moderadamente (+ +: $2x DOC < DO \leq 4x DOC$), ou fortemente (+ + +: $4x DOC \leq DO$) aderente, com base na densidade óptica das suspensões bacterianas (STEPANOVIC et al., 2009 e GOMES et al., 2009).

3.4.4 Teste semi-quantitativo da interação bacteriana em metal utilizando carreadores metálicos (pinças)

Suspensões bacterianas preparadas em 5ml de meio TSB ($DO=0.8$; $\lambda=550nm$) foram inoculadas em tubos 16x100 mm de modo a recobrir toda a superfície de pinça de metal estéril (4 cm) introduzida no interior dos tubos. Após período de incubação de 48h/37°C, as pinças foram lavadas com água destilada estéril e re-incubadas em novo meio TSB a 37°C/48h. Como controle negativo foi utilizado um tubo de TSB com pinça não contaminada. Para determinação da presença de bactérias sésseis viáveis, alíquotas de 100 µl de suspensão foram inoculados em agar sangue (SOUZA et al., 1998). Após o crescimento em placa de ágar sangue, os microrganismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específicas, e depois confirmadas pelos mesmos testes de identificação utilizados na identificação das amostras estudadas (**Figura 4**).

Uma análise semi-quantitativa baseada nos critérios previamente estabelecidos por Stepanovic et al., (2009) para ensaios de aderência bacteriana ao poliestireno também foi realizada. Os microrganismos foram classificados como não-aderentes (0: $DO < DOC$), fracamente (+: $DOC < DO \leq 2x DOC$), moderadamente (+ +: $2x DOC < DO \leq 4x DOC$), ou

fortemente (+ + +: $4x \text{ DOC} \leq \text{DO}$) aderente, com base na densidade óptica das películas bacterianas.

3.4.5 Avaliação da capacidade de interação bacteriana com a superfície de catéter de poliuretano

3.4.5.1 Técnica de rolamento (Teste de Maki)

Catéteres de poliuretano estéreis foram seccionados em partes de aproximadamente 5 cm e depois introduzidos em tubos contendo 5 ml de meio TSB. Em seguida, 100µL da suspensão bacteriana (tubo 0.5 da escala nefelométrica) foram adicionados e incubação por 37°/48 horas. Após etapa de lavagem com PBS pH 7,2 os segmentos de cateteres contaminados foram submetidos a rolamento na superfície do meio de ágar sangue com o objetivo de detectar a formação de tapete formado por bactérias sésseis viáveis que estavam aderidas no cateter (**Figura 5**) (Maki et al., 1977). Este procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

3.4.5.2 Técnica de cultura quantitativa

Após a incubação em 0,2 de D.O de solução bacteriana de amostras representantes dos quatros pulsotipos, um fragmento de cateter de poliuretano de 0,5 cm foi retirado, lavado em PBS, e depois o biofilme foi quantificado através de extração do biofilme por abrasão utilizando areia estéril, sendo em seguida realizada a diluição seriada na base 10, após o crescimento em placa de TSA, os microrganismos foram submetidos a contagem de viáveis (CFU/ml) e submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específicas, e depois confirmadas pelos mesmos testes de identificação utilizado na identificação das amostras estudadas (BRUN-BRUISSON et al., 1987; DOOLEY et al., 1996).

Figura 4 - Etapas de Execução de ensaios de interação de *Corynebacterium striatum* com superfícies de carreadores metálicos (pinças)

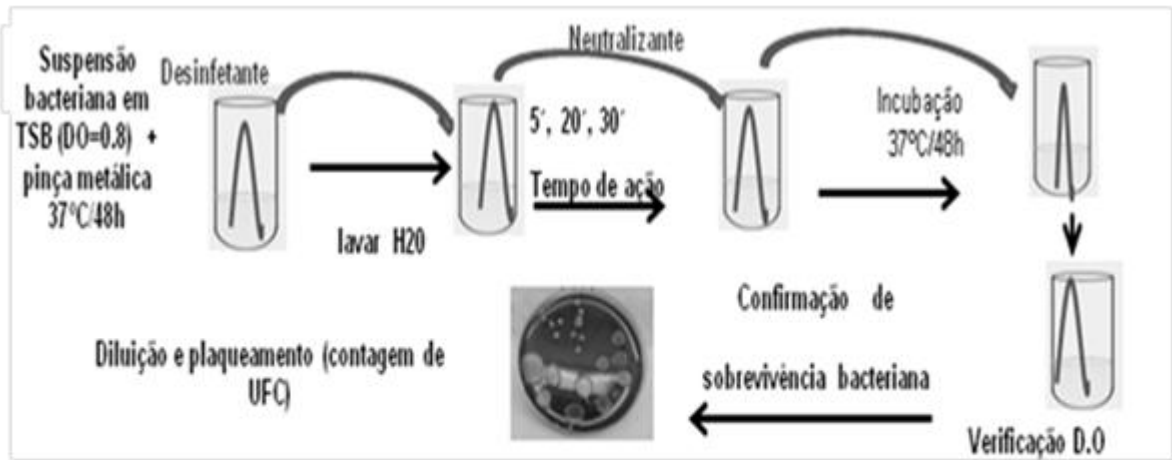


Figura 5 - Técnica de rolamento de catéter (Maki et al., 1977)



3.4.5.3 Análise morfológica e estrutural de biofilme produzido em superfície de catéter pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Foram avaliadas por MEV, cepas representantes dos quatro pulsotipos de *C. striatum* isolados de pacientes internados em hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro. Resumidamente, pequenos segmentos de 1 cm de cateter de poliuretano (Intracath) estéreis foram adicionados aos poços de placas de cultura de células de 24 poços estéreis (Kasvi) e incubados durante uma noite à temperatura de 4°C. Em seguida, cada poço foi lavado duas vezes com água destilada estéril. Após este procedimento, 1 mL de suspensão bacteriana em caldo TSB estéril com DO 0,2 a $\lambda=570\text{nm}$ foi adicionado aos poços e o material foi incubado por 48 h a 37°C em aerobiose.

Após cada período de incubação, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado duas vezes com 1 mL de salina estéril. O material foi então fixado em solução de glutaraldeído a 2,5%, pós-fixado com tetróxido de ósmio a 1% e desidratado em diferentes soluções de etanol. Em seguida, o material foi submetido ao ponto crítico com dióxido de carbono, coberto com nanopartículas de ouro e examinados em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 5310 (FRANSON et al., 1984), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra (UEZO). O controle negativo foi realizado com segmentos de cateter de poliuretano estéreis, os quais também foram processados diretamente após a remoção da embalagem comercial. A cepa BR-CAT5003/BR de *C. diphtheriae* isolada de cateter de nefrostomia (GOMES et al., 2009) foi utilizada como controle positivo.

3.5 Pesquisa de produção de biofilme em superfícies abióticas diversas na presença de glutaraldeído e matéria orgânica

3.5.1 Ensaio semi-quantitativo de interação bacteriana com o poliestireno

Foi utilizada a mesma metodologia descrita no **item 3.4.3** (GOMES et al., 2009; STEPANOVIC et al., 2009), com modificações. Nos poços das microplacas foram adicionados 100 μL de suspensão bacteriana (DO 0.4; $\lambda=550\text{nm}$) em meio TSB adicionado de 100 μL de solução de glutaraldeído 4%. Nos ensaios de pesquisa de influência da presença de matéria orgânica na ação dos desinfetantes na produção de biofilme em cada orifício foram

adicionados: 50 µL de suspensão bacteriana (DO 0.8; $\lambda=550\text{nm}$) em meio TSB mais 50 µL de solução soro albumina bovina (BSA) 8% mais 100 µL de glutaraldeído 4%.

3.5.2 Ensaio de interação bacteriana com carreadores metálicos (pinças)

Foi utilizada a mesma metodologia descrita no **item 3.4.4**. Suspensões bacterianas preparadas em 5ml de meio TSB (DO=0,8; $\lambda=550\text{nm}$) foram inoculadas em tubos 16x100 mm de modo a recobrir toda a superfície de pinça de metal estéril (4 cm) introduzida no interior dos tubos. Após período de incubação de 48h/37°C, as pinças foram lavadas com água destilada estéril e emergidas em soluções de glutaraldeído 2% e clorexidina 1% e re-incubadas de 5, 15 e 30 minutos. Após o término de cada período as pinças foram introduzidas em tubos contendo os respectivos neutralizantes específicos (sulfito de sódio e lectina de soja) com cada agente químico (**Tabela 3**). Depois da neutralização os carreadores metálicos (pinças) foram novamente introduzidas em meio estéril de TSB e re-incubadas 37°C/48h para realização da leitura (SOUZA et al., 1998).

3.5.3 Ensaio quantitativo com superfícies inertes diversas

A metodologia foi baseada nos ensaios de Stepanovic et al., (2009) descrita no **item 3.4.3**, porém com modificações. Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços contendo 500 µl de meio TSB e lamínulas de vidro, Thermanox® (Nunc; 13 mm diâmetro), fragmentos de 0,5 cm de metal (pinças) e de cateteres de poliuretano estéreis. Os ensaios foram realizados com suspensões bacterianas ($\sim 10^8$ UFC/mL) na presença de glutaraldeído 2% e de BSA 2%.

4 RESULTADOS

4.1 Perfis de susceptibilidade aos antibióticos

Os perfis de resistência a 21 agentes antimicrobianos expressos pelas amostras de *C. striatum* estão apresentados na **Tabela 4**. Perfis de multiresistência (MDR) foram observados para a maioria das amostras testadas, que foram sensíveis apenas para vancomicina, linezolida e tetraciclina. Apenas duas amostras (1961/III e 1954/IV) foram sensíveis à maioria dos agentes antimicrobianos testados (MDS), exceto mupirocina, fosfomicina e ticarcilina/clavulanato.

4.2 Triagem dos perfis de susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método de disco-difusão

Os resultados do teste de triagem de susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de *C. striatum* pertencentes a diferentes pulsotipos estão apresentados na **Tabela 5**. Para 14 amostras testadas, independente dos pulsotipos, foram observados halos de sensibilidade aos discos de glutaraldeído 2%, porém de pequeno diâmetro (5 a 10 mm). Resistência (R) para o glutaraldeído 2% foi detectada para duas amostras pertencente ao pulsotipo I (1959 e 1974).

A maioria das amostras apresentou sensibilidade ao hipoclorito de sódio 1%. Dentre todas as amostras estudadas, foi observada resistência (R) para o hipoclorito de sódio apenas para a amostra pertencente ao pulsotipo IV (1954). Para o agente quaternário de amônio, foram observadas cinco amostras com perfil R pertencentes aos pulsotipos I, II e IV. A maioria das amostras foi resistente ao ácido peracético 2% (n=10) e Virkon 1% (n=12).

Houve variação na sensibilidade aos desinfetantes entre as 10 amostras do pulsotipo I. A amostra 1987 apresentou halo de sensibilidade para todos os desinfetantes. As demais amostras foram resistentes ao monopersulfato de potássio 1% (n=9) e/ou ao ácido peracético 2% (n=6).

As amostras pertencentes aos pulsotipos II apresentaram halo de sensibilidade para o glutaraldeído 2% e hipoclorito de sódio. Ambas foram resistentes ao ácido peracético 2% (n=10) e apresentaram susceptibilidade variada para os agentes quaternário de amônio e Virkon 1%.

Tabela 4 - Perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK) avaliadas pelo método de disco-difusão de 14 amostras de *Corynebacterium striatum* de diferentes pulsotipos

<i>C. striatum</i> / pulsotipos	Penicilina (10U)	Ampicilina (30µg)	Meticilina (5µg)	Cefotaxima (30µg)	Cefepime (30µg)	Ceftriaxona (30µg)	Imipenem (10µg)	Eritromicina (15µg)	Clindamicina (2µg)	Linezolida (30µg)	Ciprofloxacino (5µg)	Moxifloxacino (5µg)	Tetraciclina (30µg)	Gentamicina (10µg)	Rifampicina (5µg)	Fosfomicina (200µg)	Vancomicina (30µg)	Mupirocina (200µg)	Tobramicina (10µg)	Nitrofurantoína (300µg)	Ticarclina/clavulanato(75µg/10µg)	Perfil de susceptibilidade
2063/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
1987/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2023/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2032/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2083/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2061/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2539/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
1958/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
1974/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
1959/I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2369/II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
2038/II	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	MDR
1961/III	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	MDS
1954/IV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	MDS

Nota: os resultados foram expressos como sensível (S), resistente (R) e intermediário (I) conforme previamente realizado por Baio e colaboradores (2013); MDR, multiresistente e MDS, multisensível.

Tabela 5 - Resultado do teste de triagem de susceptibilidade aos desinfetantes avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de *Corynebacterium striatum*

<i>C. striatum</i> / <i>Pulsotipos</i>	Glutaraldeído 2%	Hipoclorito de sódio 1-2,5%*	Quaternário de amonio	Ácido peracético 2%	Monopersulfato de potássio 1% pré-diluído	Virkon 1% pós diluído
1987/I	S(7)*	S(11)*	S(10)	S(15)	S(5)	R
2061/I	S(6)	S(14)	S(11)	S(11)	R	S(6)*
2063/I	S(7)	S(11)	S(7)	R	R	R
2032/I	R	S(10)	S(7)	R	R	R
2083/I	S(7)	S(15)	S(9)	R	R	R
2539/I	S(9)	S(10)	S(7)	R	R	R
2023/I	S(6)	S(20)	R	R	R	R
1959/I	R	S(11)*	S(11)*	S(10)*	R	R
1974/I	R	S(9)	R	S(11)*	R	S(7)*
1958/I	S(9)	S(11)	R	R	R	R
2369/II	S(9)	S(11)*	R	R	S(7)	R
2038/II	S(6)	S(15)	S(9)	R	R	R
1961/III	S(5)	S(11)*	S(8)	R	R	R
1954/IV	S(10)*	R	R	R	R	R

Legenda: R, amostra resistente - ausência de halo; S, amostra sensível - presença de halo (diâmetro dos halos em mm); *, Halos de sensibilidade com presença de algumas colônias bacterianas dentro dos halos de inibição.

A amostra 1954 pertencente aos pulstotipo IV foi resistente para a maioria dos desinfetantes testados apresentou diâmetro reduzidos de sensibilidade ao glutaraldeído 2%, enquanto a amostra 1961 representante do pulstotipo III apresentou resistência para o ácido peracético 2% e monopersulfato de potássio 1% .

O tempo de diluição do monopersulfato de potássio 1% também influenciou no comportamento de algumas amostras de *C. striatum* frente a este biocida. Amostras que apresentaram halo de sensibilidade ao monopersulfato de potássio pré-diluído (1987/I, 2369/II) foram resistentes na presença de monopersulfato de potássio 1% pós-diluído, mostrando que o tempo de estabilidade do agente de desinfecção deve ser rigorosamente observado.

Importante ressaltar que no interior de halos de inibição do glutaraldeído, hipoclorito de sódio e de Virkon 1% foi observada a presença de colônias bacterianas para algumas amostras, conforme ilustrado na **Figura 2** e na **Tabela 5**.

4.3 Triagem dos perfis de susceptibilidade aos anti-sépticos avaliados pelo método de disco-difusão

Os resultados do teste de triagem de susceptibilidade aos anti-sépticos avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de *C. striatum* pertencentes a diferentes pulstotipos estão apresentados na **Tabela 6**. A maioria das amostras de *C. striatum* apresentou halo de sensibilidade para os discos de clorexidina 2% que variaram halos de 19 a 24 mm de diâmetro. Por outro lado, a maioria das amostras foi resistente ao álcool 70% e álcool iodado. Nos ensaios de triagem de disco-difusão, a amostra 1954/IV foi resistente a todos os desinfetantes e anti-sépticos testados, exceto ao glutaraldeído 2%. A semelhança do observado nos ensaios com desinfetantes, no interior dos halos de inibição da clorexidina 2% e do álcool 70% foi observada a presença de colônias bacterianas para algumas amostras testadas (**Figura 2** e **Tabela 6**).

A amostra 1987/I, que havia apresentado halo de sensibilidade para todos os desinfetantes, também apresentou halo de sensibilidade a todos os anti-sépticos testados. Para a clorexidina 2%, foi observada ausência de halo de sensibilidade (R) apenas para a amostra pertencente ao 1954/IV. A maioria das amostras de *C. striatum*, exceto a 1987/I, foi resistente

ao álcool etílico-iodado enquanto para o álcool etílico 70% foi observada sensibilidade (S) apenas para as amostras 1987/I e 1961/III.

Tabela 6 - Resultados do teste de triagem de susceptibilidade aos anti-sépticos avaliados pelo método de disco-difusão de 14 amostras de *Corynebacterium striatum*

<i>C. striatum</i> / <i>Pulsotipo</i>	Clorexidina 2%	Alcool etílico iodado	Alcool etílico 70%*
1987/I	S(20)*	S(10)	S(17)*
2061/I	S(22)	R	R
2063/I	S(22)	R	R
2032/I	S(24)	R	R
2083/I	S(20)	R	R
2539/I	S(22)	R	R
2023/I	S(23)	R	R
1959/I	S(19)*	R	R
1974/I	S(23)	R	R
1958/I	S(22)*	R	R
2369/II	S(22)*	R	R
2038/II	S(22)*	R	R
1961/III	S(20)*	R	S(10)*
1954/IV	R	R	R

Legenda: R, amostra resistente - ausência de halo; S, amostra sensível - presença de halo (diâmetro dos halos em mm); *, Halos de sensibilidade com presença de algumas colônias bacterianas dentro dos halos de inibição.

4.4 Susceptibilidade de *C. striatum* aos biocidas avaliados pelo método *Time-kill* na ausência e na presença de matéria orgânica

Amostras de *C. striatum* representantes dos diferentes pulsotipos foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos desinfetantes na ausência e na presença de matéria orgânica (BSA 2%) (**Tabela 7; Figuras 6 a 9**). Os dados apresentados na **Tabela 7** indicaram pouca relação entre os resultados obtidos pelos ensaios de disco-difusão e pelo teste *Time kill*.

Em relação ao glutaraldeído 2%, os resultados apresentados na **Figura 6** e na **Tabela 7** indicaram diversidade na capacidade de sobrevivência das amostras de *C. striatum* frente a este desinfetante. Todas as amostras exibiram tolerância ao glutaraldeído porém em diferentes tempos de tratamento ($3 < t < 30$ min). Entretanto, a amostra 1961/III (MDS) foi capaz de sobreviver ao glutaraldeído por até 30 minutos. O menor tempo de sobrevivência (< 4 min) foi observado para a amostra 2369/II (MDR). Para o glutaraldeído 2%, a presença de matéria orgânica (BSA 2%) favoreceu a sobrevivência da maioria das amostras em relação ao tempo e ao número de bactérias viáveis.

Nas **Figura 7 a 9** e na **Tabela 7**, os resultados indicaram uma maior eficácia dos demais desinfetantes para amostras representantes dos quatro pulsotipos de *C. striatum* quando comparados aos dados obtidos com o glutaraldeído.

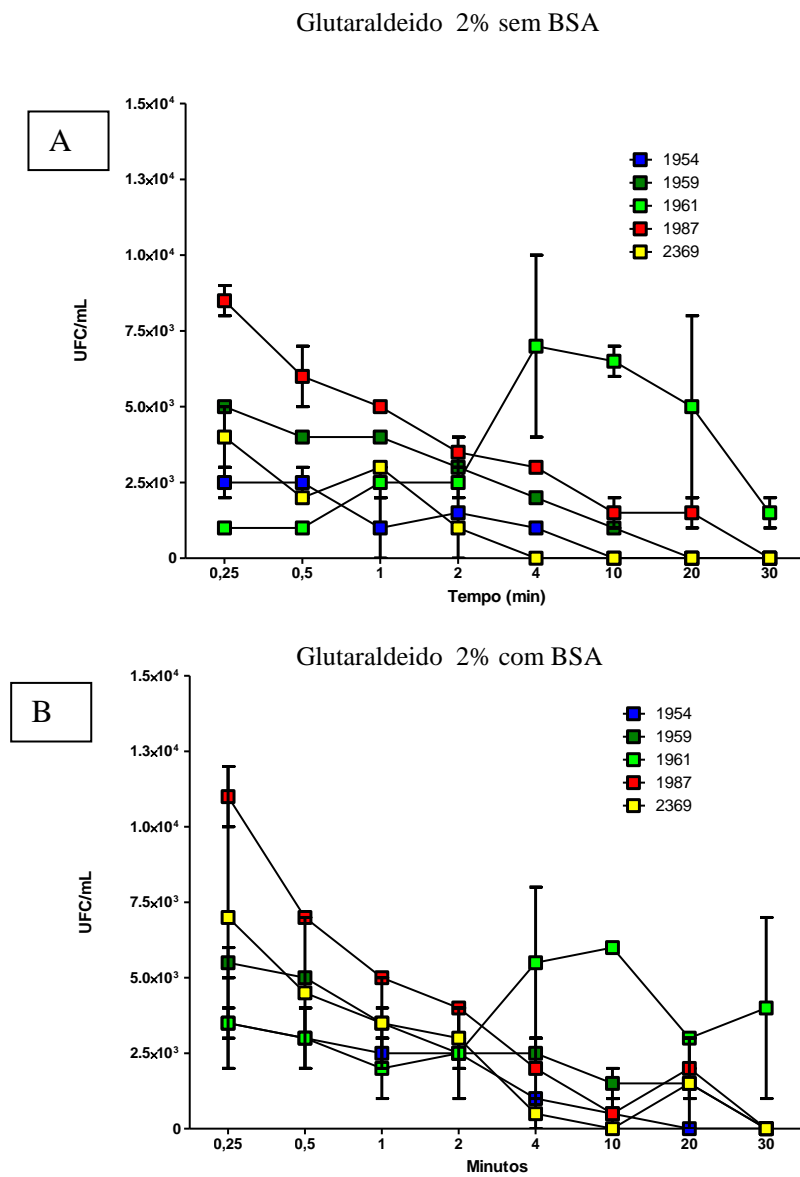
Todas as amostras exibiram tolerância ao ácido peracético, hipoclorito de sódio e permonopersulfato de potássio, porém em períodos reduzidos de tempo, ($0,5 < t < 4$ min). A amostra 1961/III foi a que apresentou maior tolerância a todos os desinfetantes testados. Menor tolerância foi observada para os desinfetantes hipoclorito de sódio e Virkon, principalmente para as amostras 2369/II e 1954/IV (**Tabela 7**). A eficácia do permonopersulfato de potássio mostrou-se dependente do tempo de preparo da solução, uma vez que os microrganismos exibiram maior capacidade de sobrevivência frente a solução de monopersulfato de potássio preparada três dias antes do uso, quando comparada com a solução preparada no momento do uso.

Os resultados da análise comparativa da eficácia dos desinfetantes no tempo de 1 min de amostras de *C. striatum* pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954 estão representados na **Figura 10**.

Tabela 7 - Resultados da avaliação da tolerância aos desinfetantes na ausência e na presença de matéria orgânica pela técnica de *Time kill* e disco-difusão de amostras de *Corynebacterium striatum* de diferentes pulsotipos

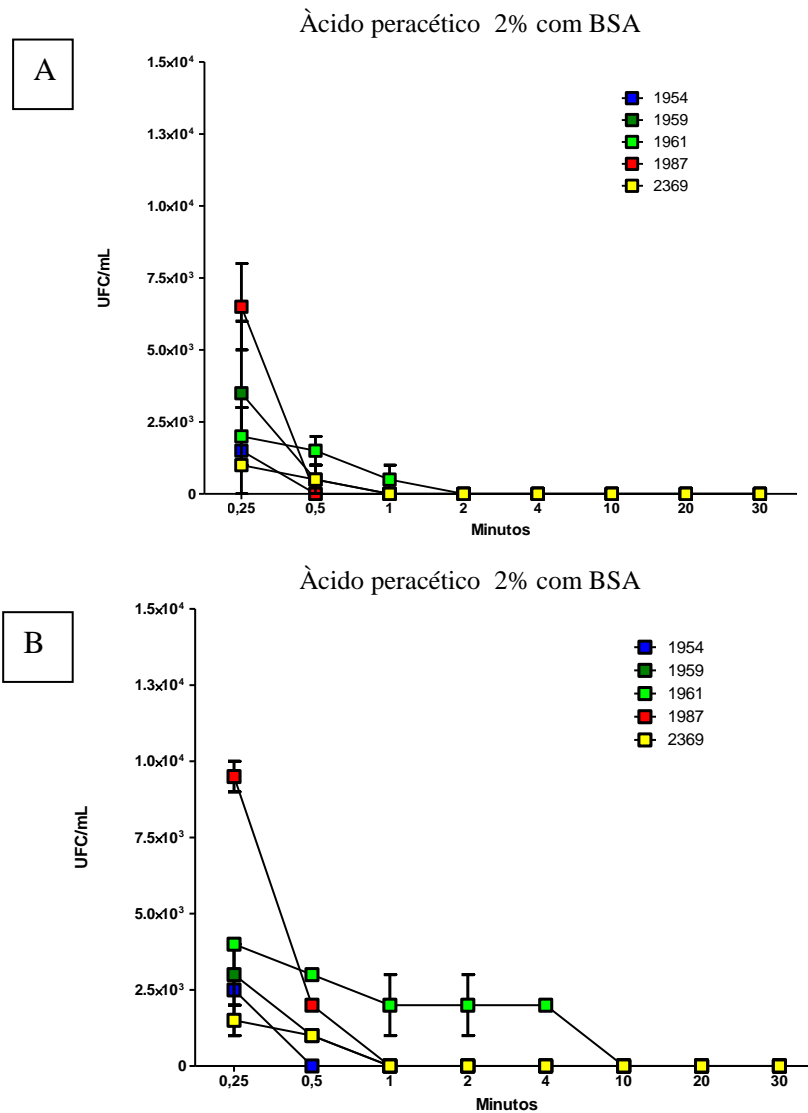
Desinfetantes	Sobrevivência das amostras de <i>C. striatum</i>			
	Pulsotipo I	Pulsotipo II	Pulsotipo III	Pulsotipo IV
	1959 MDR	2369 MDR	1961 MDS	1954 MDS
<i>Glutaraldeído 2%</i>				
Time kill s/ BSA	<20 min	<4 min	30 min	<10 min
Time kill c/ BSA	20 min	<30 min	30 min	>20 min
Disco-difusão	R	S	S	S
<i>Ácido peracético 2%</i>				
Time kill s/ BSA	<1 min	<1 min	<2 min	<1 min
Time kill c/ BSA	<1 min	<1 min	<10 min	<0,5 min
Disco-difusão	S	R	R	R
<i>Hipoclorito de sódio</i>				
Time kill s/ BSA	<0,5 min	<0,5 min	<2 min	<0,5 min
Time kill c/ BSA	<2 min	<1 min	<4 min	<2 min
Disco-difusão	S	S	S	R
Per. de potássio 1%				
Recém-diluído				
Time kill s/ BSA	<1 min	0	<1 min	0
Time kill c/ BSA	<1 min	<1 min	<10 min	<1 min
Disco-difusão	R	S	R	R
Pós-diluído				
Time kill s/ BSA	<4 min	<10 min	<10 min	<1 min
Time kill c/ BSA	<10 min	<20 min	<20 min	<2 min
Disco-difusão	R	R	R	R

Legenda: MDR, multiresistente aos agentes antimicrobianos; MDS, multisensível aos agentes antimicrobianos.

Figura 6 - Resultado do teste *Time kill*

Legenda: Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de *Corynebacterium striatum* ao glutaraldeído 2% na (A) ausência e na (B) presença de soroalbumina bovina 2%. Amostras pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954. Inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL em todos os experimentos.

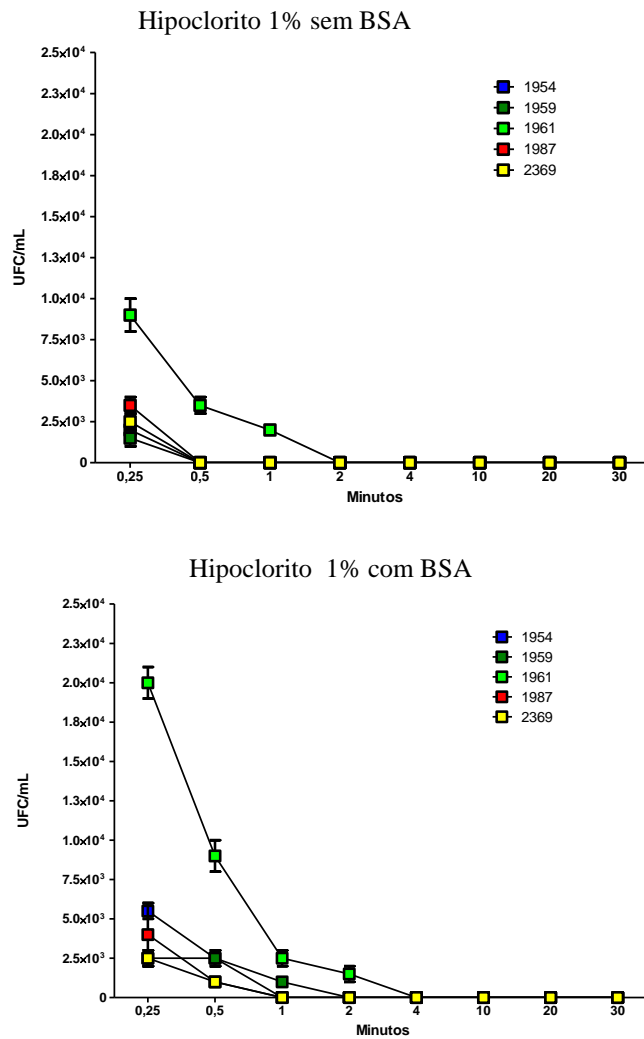
Nota: Médias de 2 experimentos independentes.

Figura 7 - Resultado do teste *Time kill*

Legenda: Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de *Corynebacterium striatum* ao ácido peracético 1% na (A) ausência e na (B) presença de soroalbumina bovina 2%. Amostras pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954.

Nota: Inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL em todos os experimentos, Médias de 2 experimentos independentes.

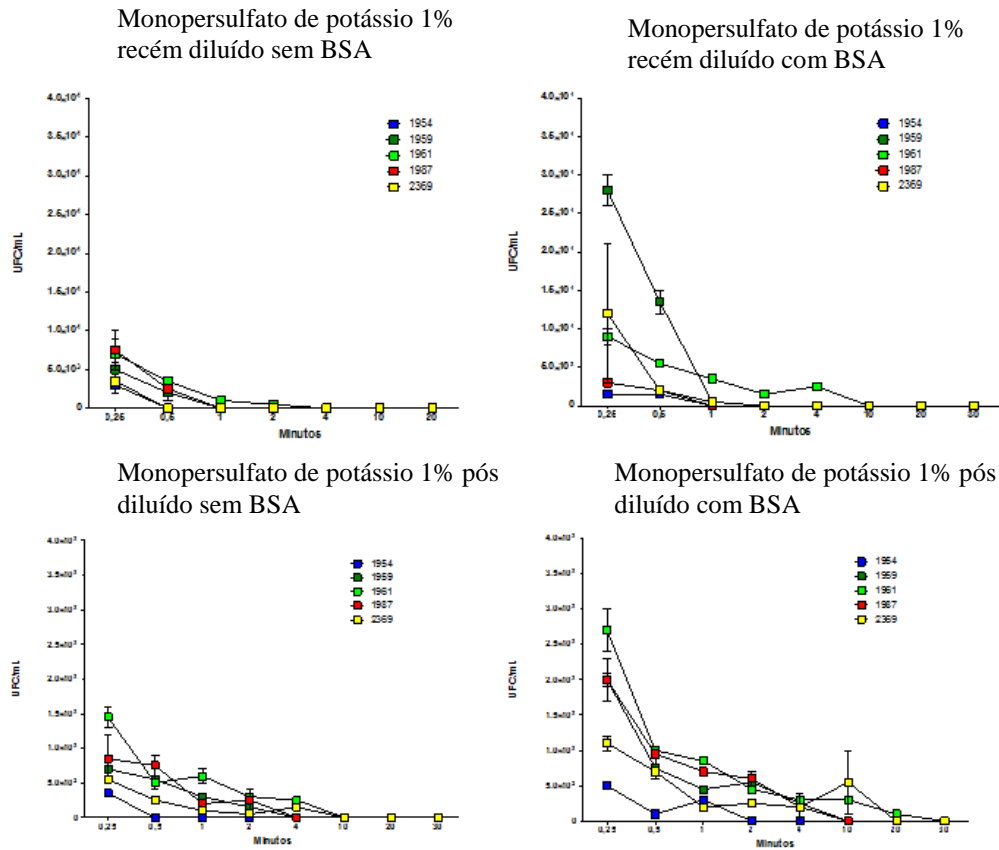
Figura 8 - Resultado do teste *Time kill*. Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de *Corynebacterium striatum* ao hipoclorito de sódio 1%



Legenda: (A) ausência e na (B) presença de soroalbumina bovina 2%. Amostras pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954. Inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Nota: Em todos os experimentos, Médias de 2 experimentos independentes.

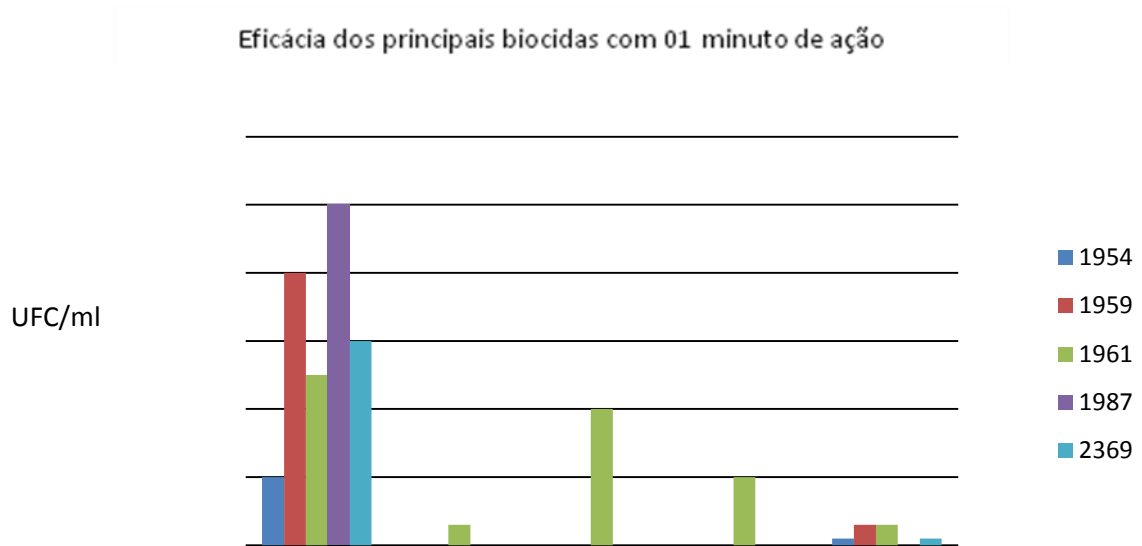
Figura 9 - Resultado do teste *Time kill*. Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de *Corynebacterium striatum* na presença de solução de Vircom 1%



Legenda: (A e B) recém-diluído e (C e D) pós-diluído na (A e C) ausência e na (B e D) presença de soroalbumina bovina 2%. Amostras pertencentes aos pulstotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954

Nota: Inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL, e em todos os experimentos, Médias de 2 experimentos independentes.

Figura 10 - Resultado do teste *Time kill*. Análise comparativa da eficácia dos desinfetantes no tempo de 1 min de amostras de *Corynebacterium striatum*



Notas : Foram testados os pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III – 1961; IV – 1954, inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL e em todos os experimentos, médias de 2 experimentos independentes.

A presença de matéria orgânica favoreceu a tolerância de *C. striatum* a todos os biocidas testados, inclusive ao álcool a 70% (**Figuras 6-9, 11**). Conforme demonstrado na **Figura 11** amostra 1961/III, tolerou o álcool a 70% por um período de 30 minutos na presença de matéria orgânica, evento que não ocorreu quando o álcool 70% foi testado sozinho, sendo eficaz após um minuto de ação.

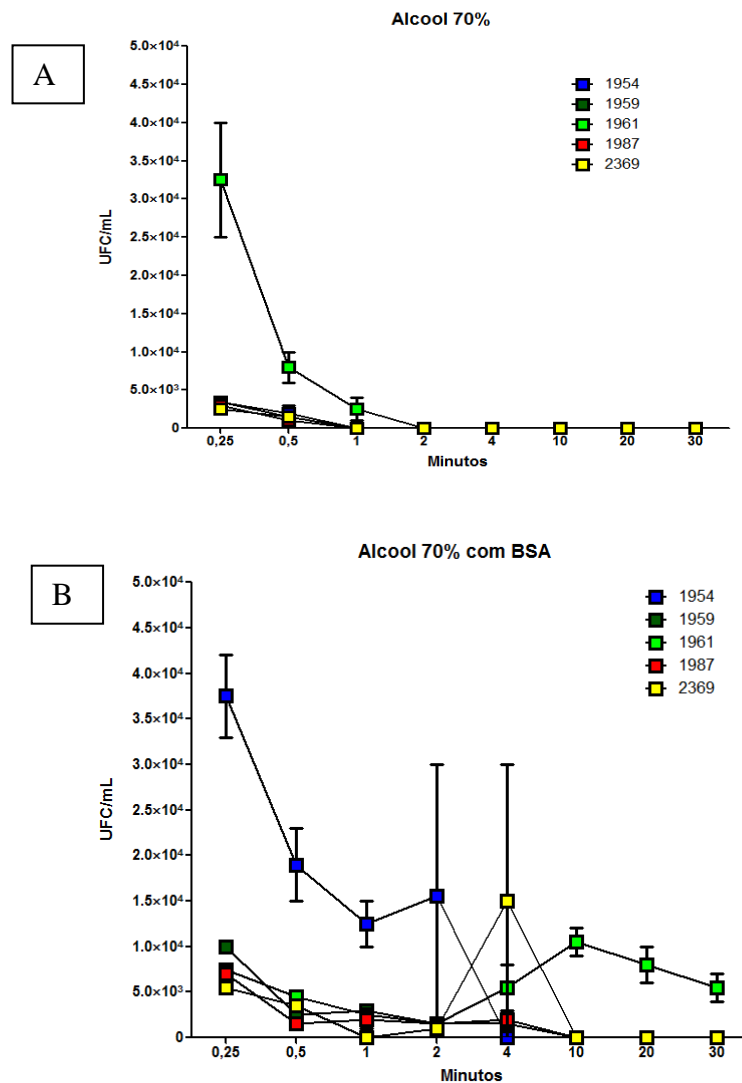
O aumento das propriedades autoaglutinantes dos microrganismos na presença de biocidas e de matéria orgânica podem ter exercido influência na contagem de bactérias viáveis, de modo a causar oscilações nos números de bactérias obtidos nos tempos intermediários das curvas de crescimento.

4.5 Pesquisa da capacidade de aderência em superfície abiótica hidrofílica (vidro)

A **Figura 12** ilustra a aderência das amostras de *C. striatum* na superfície do vidro. A maioria das amostras pertencentes aos pulsotipos I, II e III foi capaz de aderir nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar (padrão I) (**Tabela 8**). Apenas a amostra 1954/IV MDS, interagiu com a superfície do vidro, produzindo crescimento bacteriano em forma de anel na interface do meio de cultura e do ar (Padrão III).

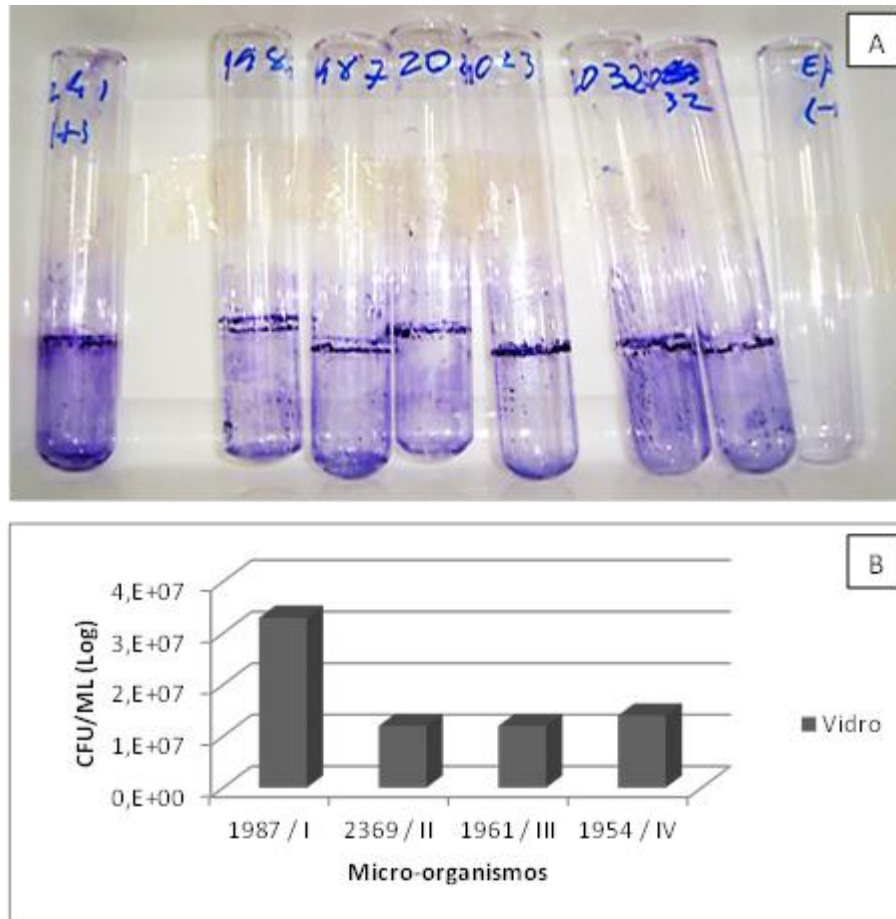
Apesar de cepas dos diferentes pulsotipos terem sido capazes de se manterem viáveis quando aderidas a superfície do vidro, os resultados da análise quantitativa de interação de *C. striatum* com o vidro demonstraram maior número de formas sésses viáveis aderidas ao substrato abiótico para a cepa 1987 representativa do pulsotipo I, predominantemente observado durante o surto hospitalar. Cepas pertencentes ao padrão I de aderência ao vidro (1987/I; 1961/II; 2369/II) exibiram diferenças nos números de bactérias sésses viáveis aderidas ao substrato. Por outro lado, a cepa 1954/IV com perfil III de aderência, apresentou números similares de bactérias viáveis aderidas observadas para as amostras 1961/III e 2369/II com perfil de aderência ao vidro tipo I. Deste modo, diferenças qualitativas e quantitativas na capacidade de aderir ao vidro foram observadas entre as amostras estudadas de *C. striatum*.

Figura 11 - Resultado do teste *Time kill*. Gráficos demonstrativos de sobrevivência em diferentes tempos de incubação (min) de amostras de *Corynebacterium striatum* na presença do anti-séptico álcool etílico 70%



Legenda: (A) ausência e na (B) presença de soroalbumina bovina 2%. Amostras pertencentes aos pulsotipos: I - 1959 e 1987; II - 2369; III - 1961; IV - 1954.
Notas: Inóculo constante de aproximadamente 10^8 UFC/mL em todos os experimentos e Médias de 2 experimentos independentes.

Figura 12 - Interação com superfície hidrofílica do vidro de amostras de *Corynebacterium striatum*



Legenda: (A) As amostras pertencentes aos pulsotipos I e II foram predominantemente capazes de aderir nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar (padrão I); (+), Controle positivo - *Corynebacterium* CAT5003/BR; (-) Controle negativo - meio TSB (B).

Tabela 8 - Resultados dos ensaios de interação com superfícies abióticas diversas e de produção de biofilme em cateter de poliuretano de 14 amostras parcialmente estudadas de *Conochoacterium striatum* isoladas de hospital universitário da região metropolitana do Rio de Janeiro*

Amostras/ Pulsotipos	Setor hospitalar	Sítio de isolamento	Evolução	Multiresistência aos antimicrobianos	Aderência bacteriana a superfícies abióticas			Biofilme em fragmentos de cateter de poliuretano
					Vidro	Poliestireno	Metal (pinça)	
2063/I	UTI Geral	AT	Óbito	MDR	I	*	+++	*
1987/I	Enf. 18	BAL	Óbito	MDR	I/++	+++	+++	+
2023/I	UTI Geral	Sangue	Óbito	MDR	I	*	*	*
2032/I	UTI Geral	Urina	Cura	MDR	I	+++	*	*
2083/I	UTI II	AT	Óbito	MDR	I	+++	+++	*
2061/I	Cirurgia torácica	AT	Cura	MDR	*	*	*	*
2539/I	Enf. 18	AT	Óbito	MDR	I	+++	*	*
1958/I	Cirurgia torácica	AT	*	MDR	I	*	*	*
1974/I	Urologia	AT	Óbito	MDR	I	*	*	*
1959/I	Cirurgia torácica	AT	*	MDR	I	+++	*	*
2369/II	UTI Geral	AT	Cura	MDR	I/+	++	++	+
2038/II	DIP	Sangue	Óbito	MDR	I	+++	*	*
1961/III	DIP	Urina	*	MDS	I/+	++	+++	+
1954/IV	Cirurgia torácica	Ferida cirúrgica	*	MDS	III/+	+	++	+

Legenda : *, Não determinado; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; Enf, Enfermaria; AT, Aspirado traqueal; BAL, Lavado bronco-alveolar; MDR, multiresistente (três ou mais tipos de antibióticos); *, Baio et al. 2013.

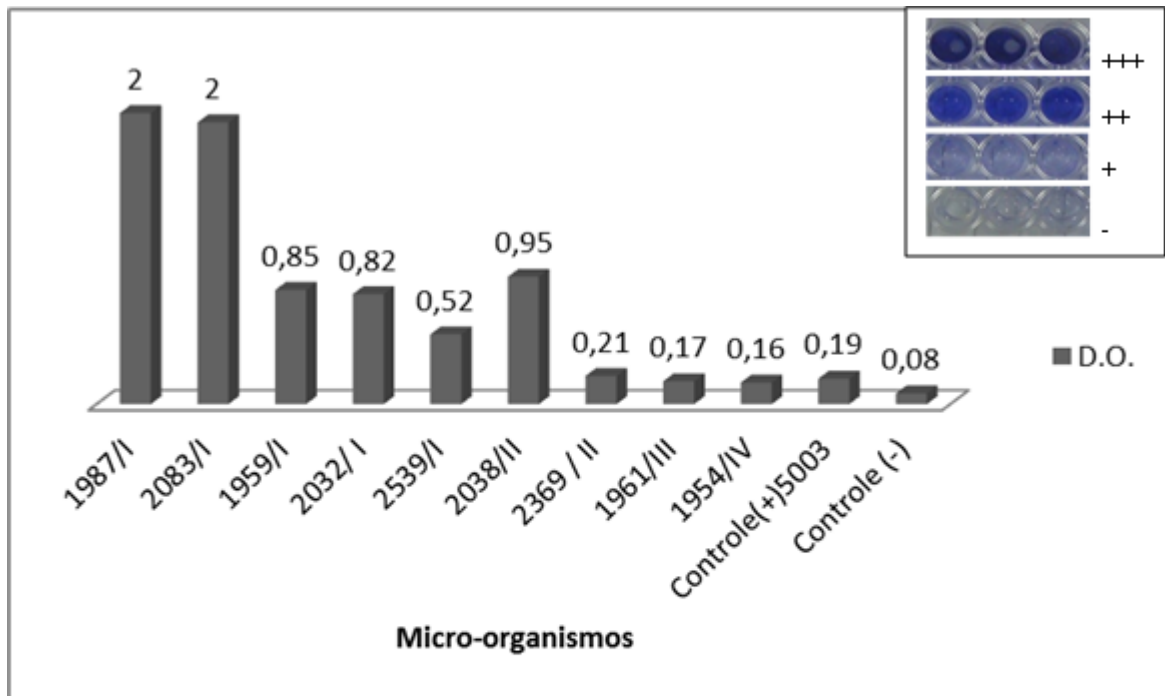
4.6 Pesquisa da capacidade de aderência em superfície abiótica hidrofóbica (poliestireno)

Na **Figura 13** e **Tabela 8** estão apresentados os dados relativos a análise semi-quantitativa da capacidade interação com superfície abiótica hidrofóbica em microplacas de poliestireno de amostras de pulsotipos I a IV de *C. striatum* utilizando como controle-positivo *C. diphtheriae* CAT5003/BR. Além de serem capazes de aderir ao vidro, todas as amostras testadas de *C. striatum* foram capazes de aderir ao poliestireno, porém em diferentes intensidades. Todas as amostras testadas pertencentes aos pulsotipo I e uma amostra do pulsotipo II foram fortemente aderentes ao plástico ($D.O > 0,32$; +++); uma amostra do pulsotipo II e uma do pulsotipo III aderiram ao plástico em intensidade intermediária ($0,32 > D.O > 0,16$; ++). A amostra 1954 - MDS, pertencente ao pulsotipo IV incapaz de aderir às laterais dos tubos de vidro, também mostrou-se fracamente aderente a superfície hidrofóbica do poliestireno ($0,08 < D.O < 0,16$; +).

4.7 Pesquisa da capacidade de aderência em superfícies inertes sólidas de natureza metálica (material empregado na produção de pinças)

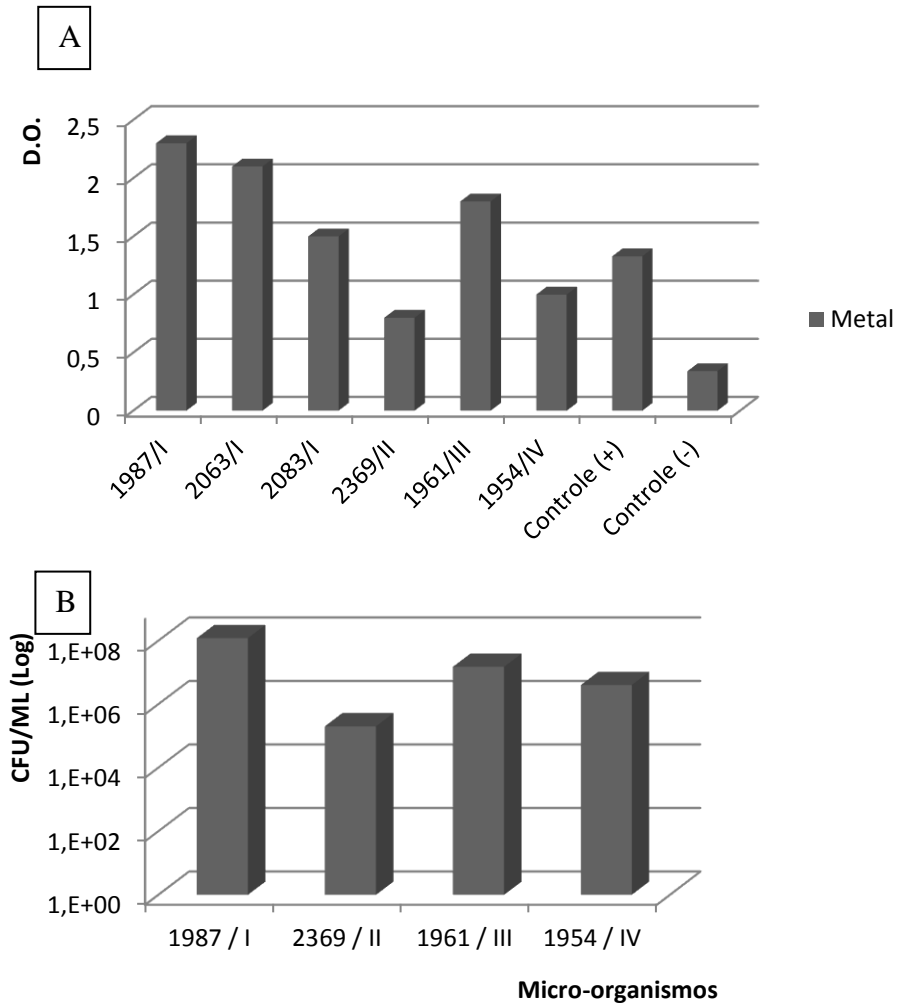
Na **Figura 14** e **Tabela 8** estão apresentados os dados relativos as análises semi-quantitativa e quantitativa da capacidade de interação com superfície abiótica metálica (pinças) de 6 amostras de pulsotipos I a IV de *C. striatum* utilizando como controle-positivo uma amostra clínica de *S. aureus*. Todas as amostras testadas de *C. striatum* foram capazes de aderir ao metal, porém em diferentes intensidades. Baseados na interpretação do teste de aderência ao plástico preconizado por Stepanovic e colaboradores (2009) as amostras testadas pertencentes aos pulsotipo I (1987, 2063 e 2083) e pulsotipo III (1961) foram consideradas como fortemente aderentes ao metal ($D.O > 1,36$; +++), enquanto as demais amostras aderiram ao metal mais fracamente. As amostras 2369/II e 1954/IV apresentaram intensidade de aderência intermediária ($1,36 > DO > 0,68$; ++). Embora todas as amostras tivessem apresentado formas sésseis viáveis aderidas a superfície metálica em intensidade $\geq 2 \times 10^6$ UFC/ML, a amostra 2369/II apresentou o menor número de microrganismos viáveis aderidos a este tipo de material inerte.

Figura 13 - Análise semi-quantitativa da capacidade de interação com superfície abiótica hidrofílica em micro placas de poliestireno de amostras de pulsotipos I a IV de *C. striatum*



Legenda: (+), Controle positivo - *Corynebacterium* CAT5003/BR; (-) Controle negativo - meio TSB
 Nota: Formas sésseis de *C. striatum* aderidas ao poliestireno em diferentes intensidades.

Figura 14 - Análise semi-quantitativa e quantitativa da capacidade de interação com superfície abiótica metálica (pinças) de amostras de pulsotipos I a IV de *Corynebacterium striatum*



Legenda: (A) análise semi-quantitativa da capacidade de interação com superfície abiótica metálica (pinças), de amostras de pulsotipos I a IV de *Corynebacterium striatum*.

(B) Análise quantitativa da capacidade de interação com superfície abiótica metálica (pinças), de amostras de pulsotipos I a IV de *Corynebacterium striatum*.

Nota: Controle-positivo: *Staphylococcus aureus*. Controle-negativo: meio Trypticase Soy Broth – TSB (D.O.= 0,34).

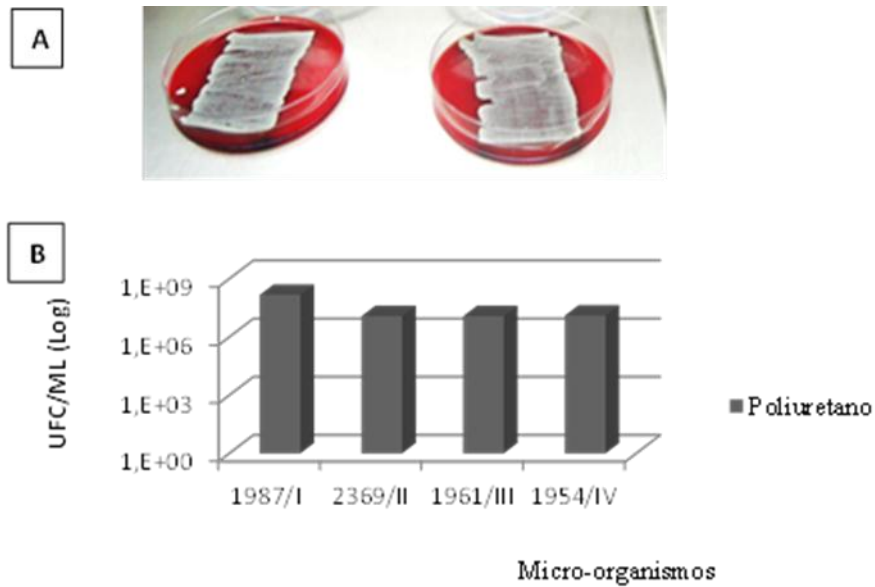
4.8 Pesquisa da capacidade de aderência e de produção de biofilme na superfície de catéter de poliuretano

Na **Figure 15** estão apresentados resultados dos ensaios de interação com a superfície de catéter de poliuretano de amostras de diferentes pulsotipos de *C. striatum*. A **Figure 15A** ilustra a formação de tapetes de bactérias sésseis viáveis que estavam aderidas a segmentos de catéteres (5cm) infectados *in vitro* nos ensaios realizados pela técnica de rolamento (Teste de Maki) observados para as amostras 1987/I, 2369/II, 1961/III e 1954/IV de *C. striatum*. Na **Figure 15B**, os resultados da análise quantitativa dos experimentos demonstram que todas as amostras, representativas de cada pulsotipo, foram capazes de interagir e se manterem viáveis em proporções muito similares $\sim 10^7$ UFC/ML na superfície de catéter de poliuretano. O maior número de formas bacterianas sésseis viáveis foi observado para a amostra 1987/I.

4.9 Análise morfológica da composição estrutural do biofilme pela técnica de microscopia eletrônica de varredura – MEV

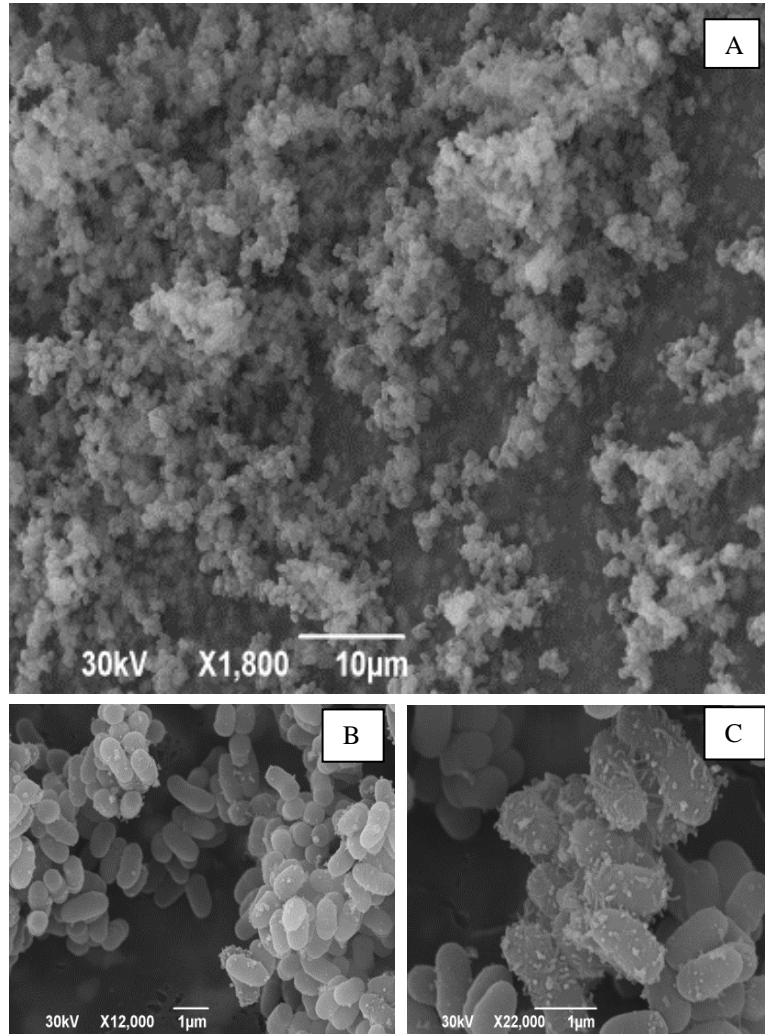
Para o desenvolvimento do biofilme maduro, é necessário que a adesão bacteriana se torne irreversível. Após a aderência inicial fraca e reversível as bactérias devem manter contato com a superfície. Porém, para tal, as bactérias precisam se multiplicar, ancorar seus apêndices, produzir exopolímeros e formar microcolônias (STOODLEY et al., 2002). As micrografias apresentadas nas **Figuras 16 a 19** demonstraram as características estruturais dos biofilmes maduros produzidos pelas amostras de *C. striatum* representantes dos quatro pulsotipos. Semelhante ao observado com a amostra de *C. diphtheriae* utilizada como controle-positivo (**Figura 20**), os microrganismos foram capazes de produzir biofilme na superfície de catéter de poliuretano, independentemente da origem das amostras, pulsotipos, perfis de resistência aos agentes antimicrobianos e capacidade de aderência ao vidro, plástico ou metal. Para as diferentes amostras foi observada a característica indicativa de habilidade de produção de biofilme maduro: formação de microcolônias.

Figura 15 - Interação com a superfície do cateter de poliuretano de amostras de diferentes pulsotipos de *C.striatum*



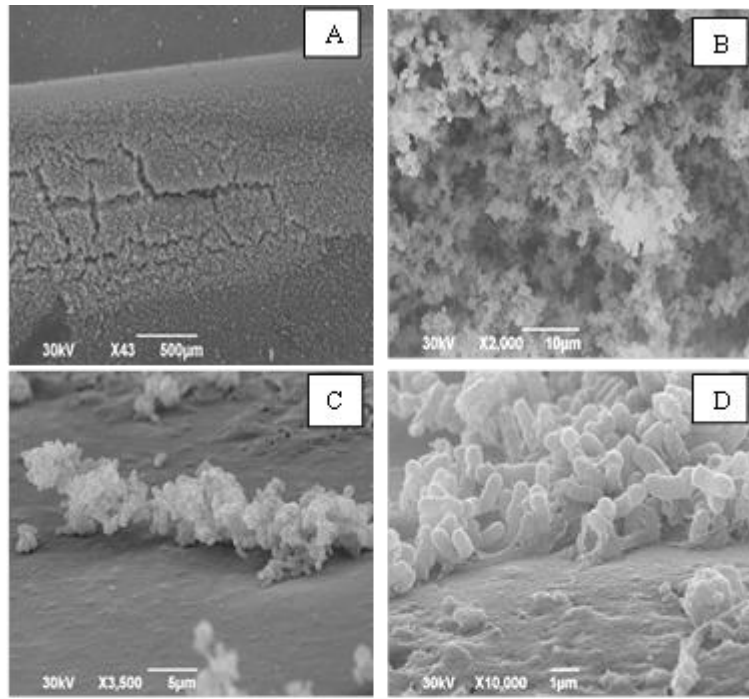
Legenda: (A) A fotografia ilustra a formação de tapete de bactéria sésseis viáveis que estavam aderidas a segmentos de cateter (5cm) contaminados *in vitro*, Técnica de Maki. (B) Resultado da análise quantitativa demonstrando que todas as amostras testadas foram capazes de interagir e manterem-se viáveis na superfície de cateter de poliuretano.

Figura 16 - Micrografia de ensaio microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrando (A) a formação de biofilme na superfície de catéter de poliuretano



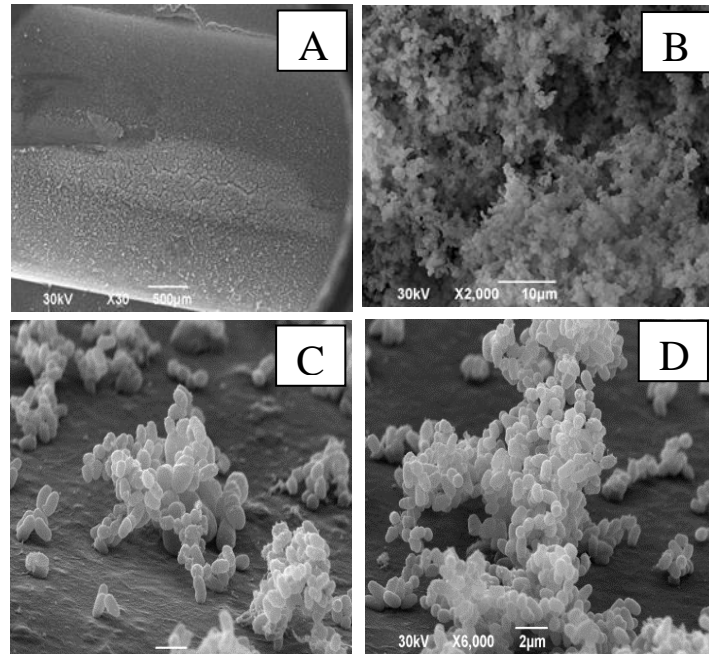
Legenda:(A) a formação de biofilme na superfície de catéter de poliuretano (48 h de incubação) pela amostra *Corynebacterium striatum* 1959/pulsotipo I (isolada de aspirado traqueal), multiresistente aos antibióticos (MDR) e fortemente aderente ao vidro (Padrão I); (B, C) Células sésseis multiplicadas, autoagregadas, expressando exopolímeros e mantendo contato com a superfície abiótica.

Figura 17 - Micrografia de ensaio microscopia eletrônica de Varredura (MEV)



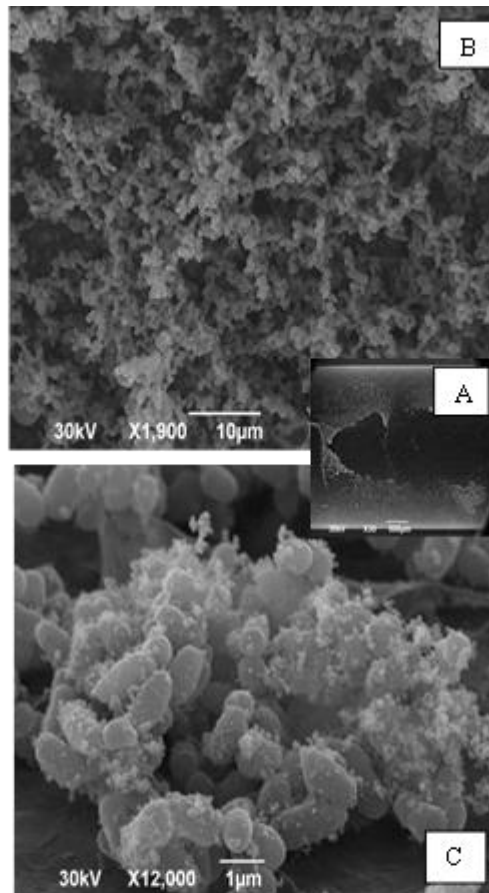
Legenda: (A e B) a formação de biofilme maduro na superfície de cateter de poliuretano (48h de incubação), pela amostras 2369/pulsotipo II (isolada de aspirado traqueal), multirresistente aos antibióticos (MDR), e fortemente aderente ao vidro (padrão I); (C) Para manterem contato com a superfície abiótica, as células sésseis precisaram multiplicar, e formar microcolônias e (D) produzir exopolímeros (seta).

Figura 18 - Micrografia de ensaio microscopia eletrônica de varredura (MEV)



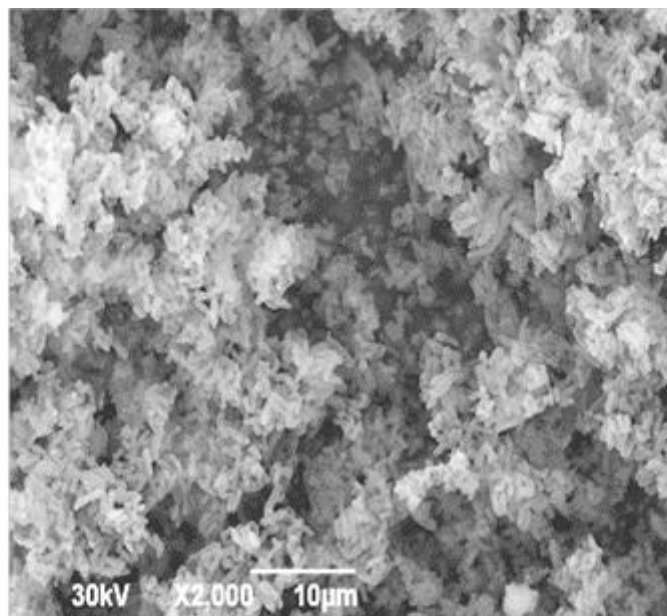
Legenda: (A) a formação de biofilme na superfície de catéter de poliuretano (48 h de incubação) pela amostra *Corynebacterium striatum* 1961/ pulso tipo III (isolada de urina), multiresistente aos antibióticos (MDR) e fortemente aderente ao vidro (Padrão I); (B) Fase de maturação do biofilme que resultou na geração de uma arquitetura complexa com canais e poros que formaram sua estrutura tridimensional e espessa; (C e D) Formação de microcolônias: característica indicativa de habilidade de produzir biofilm e maduro, uma vez que é necessário que a adesão se torne irreversível para as bactérias manterem contato com a superfície abiótica.

Figura 19 - Micrografia de ensaio de micrografia eletrônica de varredura (MEV)



Legenda: (A e B) A formação de biofilme maduro na superfície de cateter de poliureta 48 h de incubação pela a mostra de *C. striatum* 1954/ pulsotipo IV (Isolada de ferida cirúrgica), sensível aos antibióticos (MDS), fracamente aderente ao vidro (padrão III); (C) Para manterem contato com a superfície abiótica, as células sésseis precisaram multiplicar, produzir exopolímeros e formar microcolônias.

Figura 20 - Micrografia de ensaio de microscopia eletrônica de Varreura (MEV)



Legenda: Demonstração da formação de biofilme maduro na superfície de Cateter de poliuretano (48 horas de incubação) pela amostra utilizada como controle Positivo: *Corynebacterium diphtheriae* CAT 5003/BR (isolada de catéter de nefrostomia) e fortemente aderente ao vidro (padrão I).

4.10 Pesquisa da influência da presença de biocidas na produção de biofilme pelo *C. striatum*

Os resultados dos ensaios de avaliação da produção de biofilme em diferentes substratos abióticos na presença do desinfetante glutaraldeído 2% (30 min) por formas sésseis de amostras de *C. striatum* (pulso tipos I, II, III e IV) estão apresentados na **Figura 21**. Todas as amostras de *C. striatum* utilizadas nesta etapa de investigação foram capazes de produzir biofilme em superfícies abióticas do vidro, metal e poliuretano. Apenas as formas planctônicas da amostra 1961/III apresentaram resistência ao glutaraldeído quando avaliada pela técnica *Time Kill*. Quando submetidas ao tratamento com glutaraldeído, foi observada a uma redução da produção de biofilme para todas as amostras, independente dos pulso tipos, entretanto, o glutaraldeído mesmo neste tempo de ação de 30 minutos, não foi capaz de inibir totalmente a produção do biofilme, tendo as amostras se mantido viáveis em quantidade variada, ao contrário da amostra controle-positivo de *C. diphtheriae* que após o tratamento com glutaraldeído perdeu a viabilidade e foi incapaz de produzir biofilme na superfície do vidro, metal ou poliuretano. Deste modo, para *C. striatum* as formas sésseis apresentaram tolerância ao tratamento com desinfetante glutaraldeído 2% quando comparadas com as formas planctônicas. A tolerância ao glutaraldeído foi observada para as formas sésseis pertencentes ao quatro pulso tipos aderidas as diferentes substratos abióticos.

A influência da presença de clorexidina na aderência em superfície de metal pelo *C. striatum*, das amostras representantes de todos os pulso tipos, apenas a amostra 1954/IV, foi a única que apresentou resistência a clorexidina no teste de disco de fusão em agar, foi capaz de sobreviver por até 30 min na superfície de carreador metálico quando submetida ao tratamento pela clorexidina a 2%.

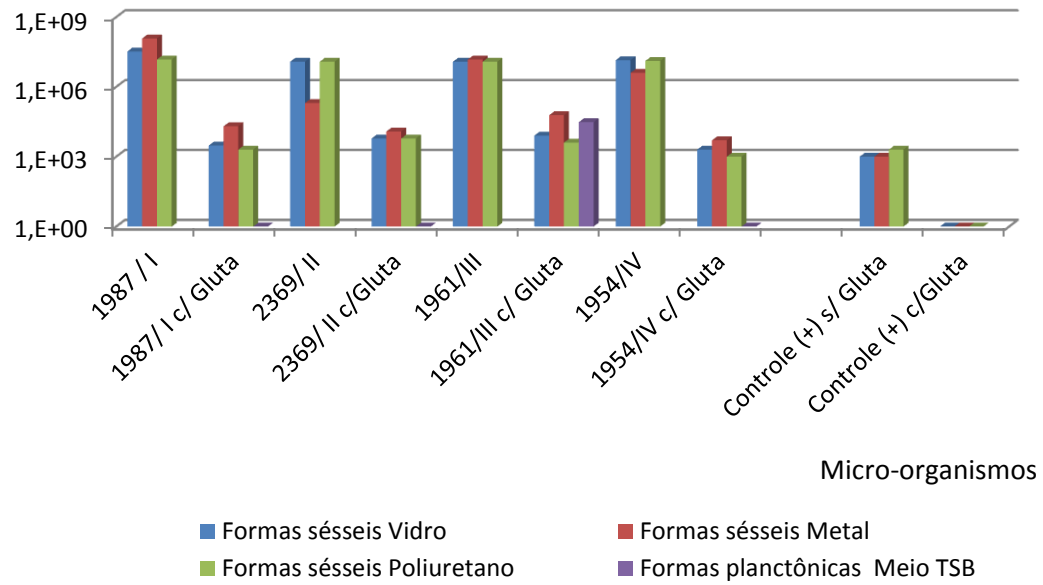
4.11 Pesquisa da influência de matéria orgânica na produção de biofilme de *C. striatum* na presença de glutaraldeído 1% e de álcool etílico 70%

Os resultados dos ensaios que demonstraram a influência de matéria orgânica – soro albumina bovina (BSA) 2% - na tolerância ao tratamento com o desinfetante glutaraldeído 2% e com o anti-séptico álcool etílico 70% (30 min) de formas sésseis aderidas a substratos abióticos de amostras de *C. striatum* (pulso tipos I, II, III e IV) estão apresentados nas **Figuras 22 e 23**. A presença de BSA 2% no meio de cultura contendo o desinfetante

glutaraldeído favoreceu a produção de biofilme de todas as amostras na superfície do vidro, metal (fragmentos de pinças) e poliuretano (fragmentos de catéter).

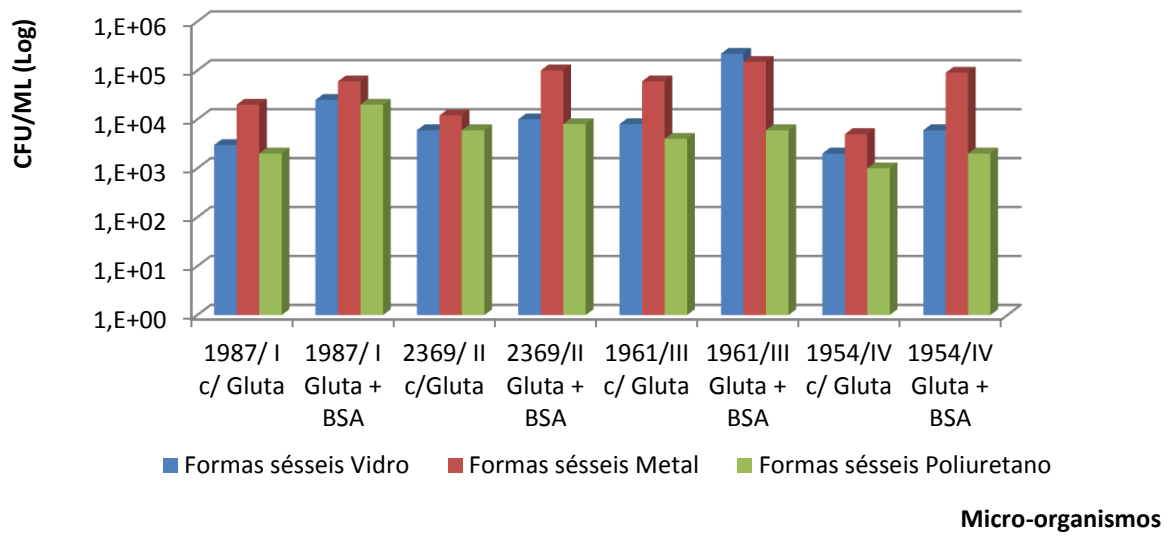
A análise semi-quantitativa pela técnica realizada em microplacas de poliestireno demonstrou que a presença de BSA 2% no meio de cultura contendo o anti-séptico álcool etílico 70% favoreceu a produção de biofilme de todas as amostras na superfície poliestireno, principalmente da amostra MDS 1961/III de *C. striatum*

Figura 21 - Tolerância ao tratamento com desinfetante glutaraldeído 2% (Gluta) (30 min)



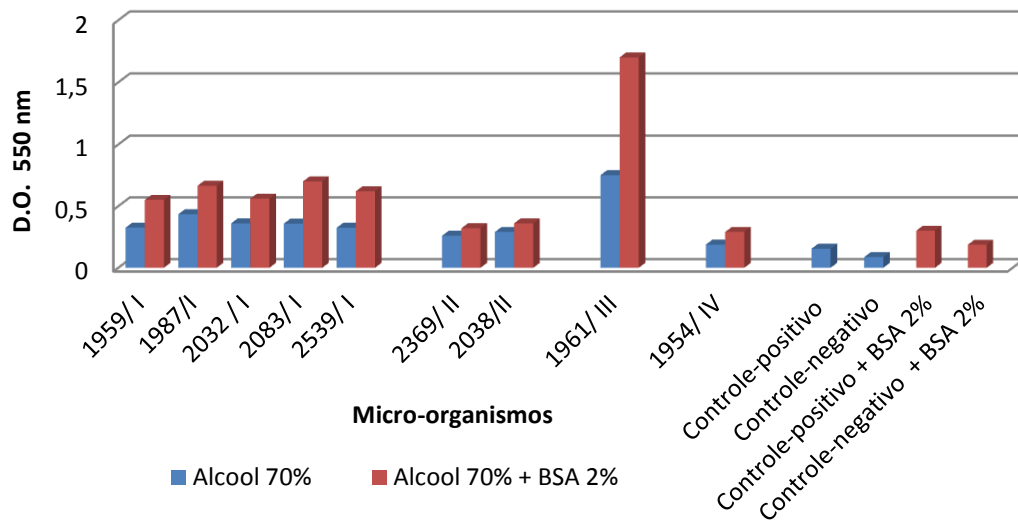
Legenda: formas sésseis aderidas a diferentes substratos abióticos e de formas planctônicas de amostras de *Corynebacterium striatum* (pulsotipos I, II, III e IV). Amostra utilizada como controle-positivo de produção de biofilme: *Corynebacterium diphtheriae* CAT5003/BR (isolada de catéter de nefrostomia).

Figura 22 - Influência de matéria orgânica – soroalbumina bovina (BSA) 2%



Legenda: Demonstração da tolerância ao tratamento com desinfetante glutaraldeído 2% (Gluta) (30 min) de formas sésseis aderidas a diferentes substratos abióticos de amostras de *Corynebacterium striatum* (pulsotipos I, II, III e IV).

Figura 23 - Influência de matéria orgânica – soroalbumina bovina (BSA) 2% - na tolerância ao tratamento com anti-séptico álcool etílico 70%



Legenda: Demonstração da Influência de matéria orgânica – soroalbumina bovina bsa 2% - na tolerância ao tratamento com anti-séptico álcool etílico 70% (30 min) de formas sésseis aderidas ao poliestireno de amostras de *Corynebacterium striatum* (pulso tipos I, II, III e IV). Controle-positivo: amostra *Corynebacterium diphtheriae* CAT5003/BR cultivadas em meio TSB contendo álcool etílico 70%, acrescido ou não de BSA 2%. Controles-negativos: Meio de TSB não infectado contendo álcool etílico 70% acrescido ou não de BSA 2%.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, mais da metade das doenças infecciosas que afetam os pacientes imunocomprometidos, estão relacionadas a espécies bacterianas normalmente encontradas no meio ambiente e na microbiota normal do corpo humano. Patógenos oportunistas, incluindo a espécie *C. striatum*, podem ser resistentes aos agentes antimicrobianos empregados no tratamento das infecções. A gravidade desse fato torna-se mais complicada uma vez que não se tem uma vacina eficaz contra a maioria desses patógenos.

Espécies de *Corynebacterium* são encontrados colonizando a pele e outros tecidos humanos. O isolamento de *Corynebacterium spp.* a partir de amostras clínicas de pacientes, sendo a maioria com diferentes graus de imunocomprometimento e infecções graves, vem aumentando tanto em países industrializados quanto nos países em desenvolvimento (CAMPANILE et al., 2009). Portanto, os clínicos e os laboratoristas devem estar atentos para a colheita adequada do material clínico, procedimentos de cultivo e de identificação das espécies de corinebactérias, particularmente devido ao fato desses patógenos poderem ser encontrados em associação com outros microrganismos nas culturas bacterianas (RIEGEL, 1998).

Cada vez mais, a atenção está sendo direcionada para as respostas dos vários tipos de tolerância aos biocidas (desinfetantes e anti-sépticos). Diferentes grupos de bactérias variam na sua susceptibilidade aos biocidas, como as espécies formadoras de esporos, seguidas das micobactérias, bactérias Gram-negativas. Entretanto, na literatura tem sido descritas estirpes de *Mycobacterium chelonae* apresentando alta resistência ao glutaraldeído. *M. aviumintracellular* tem apresentado maior resistência aos biocidas do que as estirpes de *M. tuberculosis*. Bactérias Gram-negativas tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, também podem ter difícil eliminação pelos biocidas. As espécies de cocos Gram-positivos geralmente são as mais sensíveis aos diversos agentes antimicrobianos. Os enterococos são menos sensíveis do que os estafilococos aos biocidas enquanto cepas multiresistentes de *S. aureus* podem também apresentar tolerância a biocidas de baixo nível (HAWKEY, 1988; RUSSELL, 1990; DUARTE, et al., 2009)

Corynebacterium striatum tem sido relacionado com quadros de infecciosos, por vezes fatais, em indivíduos imunocomprometidos e/ou imunocompetentes, apesar de poderem ser encontrados na pele e trato respiratório superior de indivíduos saudáveis. É um microrganismo emergente multirresistente, potencialmente patogênico, que é capaz de causar infecções

hospitalares e provocar colonização respiratória em pacientes com doenças pulmonares avançadas e graves (RENOM et al, 2007; CAMELLO et al., 2003). *C. striatum* também tem sido associado com um aumento do número de casos de septicemia, endocardite (OLIVA et al., 2010), meningite (WEISS et al., 1996), osteomielite (FERNÁNDEZ - AYALA et al., 2001), artrite (SCHOLLE, 2007), sinusite, ceratite (HEIDEMANN et al., 1991), feridas na pele (MOORE et al., 2010) e infecções intra-uterinas (BOLTIN et al., 2009), a SIDA, câncer e em pacientes transplantados (RUFANEL; COHN, 1994 ; CREAGH, et al, 2000; TARR, et al., 2003; MARTINS et al., 2009).

Otsuka e colaboradores (2006) relataram que amostras de *C. striatum* de origem respiratória foram obtidas de pacientes que tiveram internações longas e que receberam vários tratamentos com antibióticos. Diversos pulsotipos têm sido associados a surtos nosocomiais de origem respiratória e aos fenótipos MDR. Na Itália, amostras MDR de *C. striatum* foram isoladas de pacientes hospitalizados submetidos à cirurgia ou admitidos em unidades de terapia intensiva. Amostras de *C. striatum* foram responsáveis por casos de pneumonia associada à ventilação mecânica, sepse relacionada ao uso de cateter, traqueobronquite associada à ventilação mecânica e infecções de feridas. Infecções causadas por *C. striatum* foram associadas com o uso de dispositivos de uso hospitalar, não apenas tubos ou cateteres, mas também em outros materiais presentes em ambientes hospitalar (CAMPANILE et al., 2009). *C. striatum* também foi isolado a partir de materiais de uso hospitalar, como por exemplo, tubos endotraqueais (MARTINEZ - MARTINEZ et al., 1995). Estudos anteriores também confirmaram que o genótipo de *C. striatum* pode ser transmitido entre os pacientes e através dos profissionais de saúde (LEONARD et al., 1994; BRANDENBURG et al., 1996).

Recentemente foi documentado por Baio e colaboradores (2013) um surto nosocomial causado por *C. striatum* no Rio de Janeiro, Brasil. A análise por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) indicou a presença de quatro perfis moleculares, incluindo dois clones relacionados com estirpes MDR (PFGE I e II). Os dados demonstraram a predominância de isolados tipo I MDR isolados que eram em sua maioria de unidades de terapia intensiva e de enfermarias cirúrgicas. Linhagens de *C. striatum* foram em sua maioria isolados em cultura pura e a partir de secreção traqueal de pacientes submetidos a procedimentos de entubação endotraqueal. Campanile e colaboradores (2009) alertaram que quando *C. striatum* é identificado, deve-se observar as medidas de higiene universais para evitar a propagação e surtos.

Estirpes MDR, vem preocupando cada vez mais as equipes de epidemiologistas e toda a comunidade médica, uma vez que têm sido encontradas tanto nos ambientes hospitalares, quanto na comunidade. A busca por estratégias, e soluções para diminuir a disseminação das IRAS, hoje é uma preocupação mundial. Muitas medidas estão sendo tomadas no Brasil para tentar controlar o aparecimento de estirpes MDR de diferentes espécies. O uso racional de medicamentos é uma medida fomentada pelos nossos representantes governamentais, estimulando através da mídia e de leis de responsabilidades profissionais, a diminuição da compra e utilização irresponsáveis de medicamentos antibacterianos (BOYCE, 1990; SOARES, 2001; QUEIROZ, 2004; Anvisa 2007). Além disso, outras medidas devem ser tomadas com a finalidade de diminuir o aparecimento de microorganismos MDR.

No presente estudo em que foi realizada a avaliação do perfil de resistência/tolerância frente a diferentes biocidas de formas planctônicas de amostras de *C. striatum* isoladas do surto nosocomial no Rio de Janeiro, descrito por Baio et al (2013), as cepas testadas apresentaram resistência a quase todos os 21 antibióticos testados, enfatizando o aumento do aparecimento de patógenos MDR, além dos classicamente descritos, em nosso ambiente (HAWKEY, 1988; RUSSELL, 1990). Clones MDR de *C. striatum* têm sido cada vez mais isolados em pacientes hospitalizados (DICKINSON et al., 2001). Estudos adicionais permanecem necessários para determinar possíveis fatores extrínsecos e/ou intrínsecos envolvidos no desenvolvimento de multirresistência em amostras de corinebactérias, incluindo *C. striatum*. A investigação da presença dos genes de resistência *erm(X)*, que codifica resistência à eritromicina e clindamicina; *TetA*, e *tetB*, que codifica para a resistência à tetraciclina, oxitetraciclina, e oxacilina, e *cmx* e *aphA1*, responsável pela resistência a aminoglicosídeos e cloranfenicol (CAMPANILE et al., 2009), destas amostras de *C. striatum* multiresistente, já encontram-se em andamento em nosso laboratório.

Os mecanismos envolvidos na resistência a biocidas são cada vez mais bem compreendidos, progressos consideráveis estão sendo feitos para entender as respostas de diferentes tipos de bactérias aos agentes antibacterianos. A resistência pode ser uma propriedade natural de um organismo (intrínseca), adquirida por mutação, pela aquisição de plasmídeos ou por transposons (cromossômicas ou plasmídeos integrados, cassetes de DNA transmissíveis).

As micobactérias podem apresentar resistência (inata ou intrínseca) sendo uma propriedade natural, cromossomicamente controlada e que permite contornar a ação de um desinfetante, anti-séptico e/ou antibiótico. Com relação a uma molécula de anti-séptico ou

desinfetante e para atingir o seu local de destino, as camadas exteriores de uma célula devem ser atravessadas. A natureza e a composição destas camadas, que dependem do tipo de microrganismo, podem atuar como uma barreira de permeabilidade e de absorção reduzida. Alternativamente, enzimas sintetizadas constitutivamente podem provocar a degradação de biocidas (BROWN; WILLIAMS,1985; BROWN; GILBERT, 1993; RUSSELL, 1994; RUSSEL, 1995; MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

A resistência inata pode, em alguns casos, estar associada a presença de enzimas degradativas. O córtex de esporos, arabinogalactana e, possivelmente, outros componentes da parede celular e da membrana externa das bactérias Gram-negativas podem limitar a concentração de biocida ativo que poderiam atingir o alvo de ação nestas células bacterianas. Uma situação específica encontra-se com as bactérias presentes em biofilmes, que também podem ser considerados como sendo um mecanismo de resistência intrínseco, resultado da fisiologia e da adaptação das células. Deste modo, a presença de arabinogalactana e de capacidade de produção de biofilme podem estar incluídos entre os fatores que possibilitam a tolerância aos biocidas pelas amostras de *C. striatum*.

A resistência adquirida aos biocidas pode ocorrer por mutação celular ou pela aquisição de elementos genéticos por plasmídeos e ou por transposons. A resistência a compostos de mercúrio inorgânicos, orgânicos por hidrólise, e redutases têm sido extensivamente estudada. Ainda não ficou completamente esclarecida a relação entre os mecanismos de multiresistência aos antibióticos e de tolerância aos biocidas para as bactérias não esporuladas. Além disso, respostas de patógenos emergentes para os biocidas também devem ser futuramente avaliadas (RUSSEL et al., 1999). Novos estudos têm procurado investigar novas alternativas terapêuticas como: as combinações sinérgicas de dois ou mais antibióticos para fomentar a eficácia e diminuir toxicidade do medicamento, utilização e desenvolvimento de drogas antibacteriana dentre outras (SOARES, 2001; SAORI et al., 2008).

Desinfetantes e anti-sépticos são usados extensivamente em hospitais e outras instituições de saúde para uma variedade de aplicações tópicas em diversas superfícies. Em particular, eles são uma parte essencial das práticas de controle de infecção e ajuda na prevenção de infecções nosocomiais. O uso disseminado de produtos anti-sépticos e desinfetantes levou a algumas investigações sobre o desenvolvimento de resistência microbiana, em especial uma resistência cruzada aos antibióticos. Em geral, os biocidas têm um espectro mais amplo de atividade quando comparados aos dos antibióticos, e, como os

antibióticos tendem a ter alvos intracelulares específicos, os biocidas podem ter vários objetivos. A atividade antimicrobiana pode ser influenciada por muitos fatores, tais como efeitos de formulação, a presença de uma carga orgânica, a sinergia, a temperatura, a diluição, e método do teste. (VERMELHO et al., 2007; RUTALA et al., 2008).

Os biocidas quando adequadamente utilizados se aliados a outros procedimentos envolvidos no controle de infecções, são essenciais no combate as IRAS e na erradicação de organismos MDRs. Dentro de uma gestão ineficiente, o uso inadequado dos biocidas durante os processos de limpeza no ambiente hospitalar pode contribuir para a persistência e disseminação de patógenos oportunista em ambientes, tanto hospitalares, quanto na comunidade (MCDONNELL; RUSSELL, 1999), inclusive de cepas MDR de *C. striatum*.

Muitos estudos alertam sobre a necessidade de um sistema adequado de desinfecção (VERMELHO et al., 2007; RUTALA et al., 2008). Apesar de correta padronização de procedimentos relacionado as limpezas, escolhas de agentes antimicrobianos mais eficazes, supervisão e treinamento das equipes, ainda podem ser encontrados microrganismos tolerantes a diferentes agentes de desinfecção, como recentemente relatado por Duarte et al., (2009) sobre o clone BRA100 de *Mycobacterium massiliense*, que foi isolado em um surto de infecção pós-cirúrgica, após ser avaliado seu perfil de susceptibilidade aos biocidas foi constatado seu caracter de tolerância ao glutaraldeído a 2% por até 10 horas de exposição a este agente.

Assim como as micobactérias, também temos observado um crescente número de notificações de multirresistencia a antibióticos e de surtos nosocomias pelo *C. striatum* (SAVINI, 2013; CAMPANILE, 2009; ADDERSON, 2008), motivando, portanto, a nossa equipe a avaliar a susceptibilidade desse patógeno frente a alguns dos principais biocidas utilizados em ambientes hospitalar (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O glutaraldeído é um importante dialdeído alifático que tem um amplo espectro de atividade contra as bactérias e os seus esporos causadores de infecção hospitalar . Este biocida tem encontrado utilização como desinfetante e esterilizante, em particular, para a desinfecção de baixa temperatura e de esterilização de endoscópios e equipamento cirúrgico. O mecanismo de ação do glutaraldeído envolve uma forte associação com as camadas externas das células bacterianas, especialmente com aminas não protonadas, na superfície da célula, possivelmente representando os locais reativos. Tal efeito poderia explicar a sua ação inibitória sobre o transporte e em sistemas enzimáticos, onde o acesso do substrato à enzima é proibida (EMMANUEL et al., 2005). O glutaraldeído é eficaz contra bactérias de um

biofilme, foi previamente investigado usando uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, no sistema modelo aprisionado em talão de gel hidratado em biofilmes artificiais. Bactérias em biofilmes foram claramente menos susceptíveis ao glutaraldeído do que quando os mesmos microorganismos foram cultivados em cultura em suspensão convencional (GROBE; STEWART, 2000). Além disso, os bacteriófagos foram recentemente estudados para se obter informação sobre os mecanismos de ação virucida. Muitas amostras de *P. aeruginosa* tratadas com glutaraldeído tinham cabeças vazias, o que implica que o genoma do fago foi ejetado (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

O género *Corynebacterium* pertence a um grupo supra genérico de actinomicetales que também inclui o gêneros *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* . Estas bactérias Gram-positivas denominado o grupo CMN, constituem um grupo muito heterogêneo. A maioria das espécies partilham características particulares, tais como: (i) um organismo específico que possui parede celular, caracterizadas principalmente pela presença de um complexo de polímero enorme composto de peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, (ii) Para algumas espécies de *Mycobacterium*, a cera presente na parede celular impede a entrada de biocidas específicos, como o glutaraldeído, clorexidina e quaternário de amônia. Esta é uma razão para a alta resistência de algumas cepas de micobactérias de crescimento rápido (MCR) a esses desinfetantes (JARLIER & NIKAIDO, 1990; NIKAIDO, KIM, ROSENBERG 1993; MCDONNELL & RUSSELL, 1999). As MCR são amplamente distribuídos no ambiente, especialmente em água (rios, lagos, água potável), e podem contaminar os reagentes e equipamentos médicos. Muitas espécies de micobactérias formam comunidades, biofilmes estruturados nas interfaces líquido - ar e em superfícies sólidas. O total desenvolvimento de biofilmes de *Mycobacterium smegmatis* possui adição necessária de ferro suplementar acima de de sulfato ferroso 1 mM, apesar da adição de ferro não ser necessária para o crescimento planctônico, a estreita relação entre a disponibilidade de ferro e ácidos graxos associada à matriz implícita é um possível papel metabólico nos estágios finais de maturação do biofilme (OJHA; HATFULL 2007).

Estudos anteriores demonstraram que *C. diphtheriae* e espécies relacionadas, foram inibidas pela clorexidina (MIC de 5 mg / l). A maioria das bactérias vegetativas também eram susceptíveis ao hipoclorito de sódio a 1 %, etanol a 70 %, glutaraldeído a 2%, formaldeído, iodios, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e compostos de amônio quaternário (LARSSON et al., 1987; RUTALA, 1996). A atividade de desinfetantes e a produção de biofilme também foi investigada em *C. pseudotuberculosis*, um patógeno zoonótico que está

relacionado a causa de linfadenite caseosa em ovinos e caprinos. A maioria (75%) das cepas isoladas de abscessos linfonodo de animais eram produtores fracos ou não produtores de biofilme. Nestes casos, a eficiência de clorexidina a 2% foi de (100 %), e (97,20%) de amônio quaternário, (87,40%) de cloro e (84,40 %) para o iodo.

Para os isolados clínicos com maior capacidade de produção de biofilme, a inibição da formação de biofilme foi observado para o iodo e quaternário amônio em 33 % e 28 % dos casos, respectivamente. Os dados indicaram que a produção de biofilme e tolerância aos desinfetantes por uma alta porcentagem das cepas produtores de biofilme torna mais difícil o estabelecimento de medidas para prevenir e controlar as doenças em animais causadas por *C. pseudotuberculosis* (SÁ et al., 2013). A susceptibilidade da planta patogênica *Corynebacterium sepeidonicum* para vinte e oito desinfetantes in vitro foram também investigados. O microrganismo não sobreviveu após a maioria dos tratamentos, mas não havia um controle mais consistente em 10 minutos de exposição do que em 5 min. A eficácia dos cloretos e iodios foi reduzida pela matéria orgânica (SECOR et al., 1988).

Em contraste com alguns autores citados acima sobre a baixa resistência das corinebectérias frente a alguns desinfetantes inclusive ao glutaraldeído a 2%, as 14 amostras de *C. striatum* isoladas de pacientes internados no HUPE apresentaram diferentes perfis de tolerância aos desinfetantes a todos os desinfetantes e anti-sépticos testados. A maioria das amostras apresentou tolerância a ação de diversos desinfetantes e anti-sépticos em períodos de incubação menores que 30 minutos. Toda via, a amostras 1961 (pulso tipo III) apresentou tolerância ao glutaraldeído a 2% e ao álcool etílico 70% por até 30 minutos de ação destes agentes químicos.

A clorexidina assim como relatado por alguns autores citados como Secor et al., (1988); Larsson et al., (1987); Rutala, (1996); Sá et al., (2013), acima foi bem eficaz frente a maioria dos pulso tipos testados. Entretanto, a amostra 1954 representante do pulso tipo IV, tolerou a clorexidina á 2% por até 30 minutos quando testados com carreadores metálicos (pinças).

O ácido peracético foi muito mais eficaz que o glutaraldeído, mais peculiaridades também não o deixam, numa zona conforto, como por exemplo, seu tempo de eficiência pós diluição, assim como, suas complicações para a preparação da solução, a necessidade de pessoal qualificado, podem diminuir a compra deste agente para os ambientes hospitalares, sem contar que a mesma amostra que tolerou o glutaraldeído por 30 minutos, também resistiu ao ácido peracético, por um período bem inferior que não passou de 4 minutos na presença de

matéria orgânica. O problema que em ambientes mais favoráveis, na presença de outros fatores que possam ajudar a aumentar a tolerância de *C. striatum*, como: proteínas de matriz, sangue e ou outros fatores extrínsecos como a intensidade de matéria orgânica presente em um determinado local, ou até mesmo a concentração de *C. striatum* mais elevada.

Outro resultado que despertou nossa atenção foi a perda de eficácia de alguns desinfetantes alguns dias após a sua diluição, como foi o caso do monopersulfato de potássio, que apresentou diminuição significativa após três dias de diluído, assim também ocorreu com o ácido peracético, tais dificuldades quanto a aos processos inadequados de limpeza e desinfecção também foi relatado por Howie et al., (2008).

Com relação a ação dos desinfetantes frente a este microrganismo em sua forma séssil, contrariando os resultado expostos por Secor et al., (1988); Larsson et al., (1987); Sá et al. , (2013), o *C. striatum*, apresentou tolerância as agentes glutaraldeído e álcool a 70%, mesmo depois da presença destes biocidas por um período de 30 minutos, o que impressionou foi o quanto a presença de matéria orgânica favoreceu o aumento da quantidade de células bacterianas viáveis após a exposição aos agentes de desinfecção. O preocupante é que se uma bactéria resiste a estes tempos, em uma ambiente mais favorável ela pode muito bem transportar -se usando os agentes antimicrobianos como transporte.

O Dr. Gerard Fleming (2010), revelou em um estudo que usar desinfetantes inadequadamente pode fazer com que a bactéria se torne resistente a antibióticos bem como ao próprio desinfetante. Os resultados da pesquisa da sua equipe, podem ter importantes implicações para o controle de infecções em instalações hospitalares. Ele e seus colaboradores da National University of Ireland, em Galway, descobriram que acrescentar quantidades crescentes de desinfetante em culturas de *Pseudomonas aeruginosa*, faz com que a bactéria adapte-se para sobreviver não apenas ao desinfetante mas também à ciprofloxacina, um antimicrobiano normalmente receitado em infecções urinárias, mesmo sem ter sido exposta a ele. A bactéria adaptada também apresentou uma mutação no seu DNA que a permitiu resistir a antimicrobianos da classe dos quinolonas como ciprofloxacina. Os desinfetantes são usados para eliminar as bactérias nas superfícies e prevenir a sua propagação e se a bactéria consegue sobreviver e infectar um paciente. As bactérias podem ser uma séria ameaça ao paciente internado no hospital. O autor ainda sugeriu que resíduos de desinfetantes diluídos de forma incorreta deixados nas superfícies hospitalares podem promover o crescimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Adicionalmente foi ressaltada a importância de estudar fatores ambientais que podem promover a resistência a antibióticos. Onde paramos no mesmo

problema de uma má gestão e aliada a uma equipe despreparada, fica mais fácil do insucesso do processo de desinfecção.

Devemos nos preocupar, a medida em que os anos passam e vão aparecendo na literatura científica novos relatos de microrganismos resistente a desinfetantes. Se refletirmos quantos MDRs, já foram relatados somados aos que ainda não foram descritos é realmente muito preocupante. Como já mencionamos o clone de *Mycobacterium massilienses*, descrito por Duarte et al., (2010), o qual tolerou o glutaraldeído por até 10 horas, nossos clones de *C. striatum* foram capazes de tolerar o glutaraldeído, a uma concentração correspondente ao tubo 0.5 da escala nefelométrica, ou seja, dependendo de outros fatores externos, como formação de biofilme a presença de matéria orgânica, associada a desinfecção inadequada se imagina que essa tolerância e ou resistência possa perdurar por outros períodos.

Os biofilmes podem ser resistentes aos desinfetantes por vários mecanismos, incluindo as características físicas de biofilmes mais velhos, como: a variação genotípica das bactérias, a produção microbiana de neutralizantes as enzimas, e os gradientes fisiológicas dentro do biofilme. Os biofilmes foram encontrados em inúmeros dispositivos médicos (por exemplo, lentes de contato, marca-passos, sistemas de hemodiálise, cateteres urinários, cateteres venosos centrais, endoscópios). Sua presença pode ter sérias implicações para pacientes imunocomprometidos e pacientes que têm dispositivos médicos de longa permanência (RUTALA et al., 2008). A capacidade de formar biofilmes pode ser um pré-requisito para a patogênese de doenças nosocomiais. As bactérias que aderem a dispositivos médicos implantados ou tecido danificado pode envolver -se numa matriz hidratada de polissacarídeo e proteína e formar uma camada viscosa conhecido como um biofilme . Os biofilmes foram previamente descritos em *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale* e *C. diphtheriae* (OLSON et al., 2002; GOMES et al., 2009; SORIANO et al., 2009).

Quando os microrganismos se agregam em um biofilme, tornam-se mais protegidos dos agentes antimicrobianos. As bactérias que crescem em biofilmes são mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias que crescem em condições planctônicas. A resistência aos antibióticos de bactérias em biofilme contribui para a cronicidade da infecção, tais como aquelas associadas com dispositivos médicos implantados. Em biofilmes, a resistência parece depender de estratégias multicelulares (STEWART; COSTERTON, 2001). Semelhante a observações para outros patógenos humanos (KAPLAN, 2011), os antibióticos de baixa dose favoreceu a formação de biofilme por *C. diphtheriae*. As modificações nos mecanismos de adesão exibida pelas concentrações sub-inibitórias de antibióticos penicilina e eritromicina

pareceu alterar as propriedades de superfície de bactérias e também a fisiologia microbiana. Portanto, sub CIMs desses antimicrobianos pode tornar bacilos difteria mais propensos a aderir e se manter na superfície do hospedeiro, favorecendo o estado de portador e da propagação de clones epidêmicos na população. Além da difteria, esses recursos também podem fornecer vantagens em vivo, permitindo a colonização de mucosa ou tecido conjuntivo em feridas, endocardite e infecções relacionadas ao cateter. Diversos estudos vem sendo publicado sobre o perfil de aderência, a diversas superfícies inertes, de corinebactérias como: as *C. pseudotuberculosis*, que em um estudo recente demonstrou a capacidade de aderir e formar biofilme em poliestireno, poliuretano e vidro (GOMES, et al., 2009; SOUZA et al., 2011).

C. striatum não foi diferente em todos os teste de avaliação de aderência a diversos substratos independente da carga, foi verificado a capacidade de produzir biofilme. Assim como relatados com as corinebactérias: *C. pseudotuberculosis*, *C. renalis* e *C. diphtheriae* (OLSON et al., 2002; SORIANO et al., 2009; GOMES et al., 2009; e SOUZA et al., 2011), nos deixando bastante preocupados quanto ao perfil de aderência de todas as corinebactérias.

Biofilmes formados em superfícies e substratos inertes como laparoscópicos, cateteres e equipamentos de reanimação e outros utilizados nesses ambientes, pode favorecer a resistência e a tolerância aos processos de desinfecção por agentes químicos antimicrobianos, sobre tudo a disseminação deste microrganismo no ambiente hospitalar e favorecendo assim sua sobrevivência. Graças a sua alta característica de resistência aos antibióticos e de tolerância aos desinfetantes e anti-sépticos, o *C. striatum* se mantém persistente em ambientes nosocomiais, pois dependendo da situação e dos fatores que favoreçam ou possibilite seu isolamento, podem aumentar a quantidade e aliados a outros percussores que não investigamos, o resultado será possivelmente que *C. striatum* possa resistir a ação de agentes químicos de desinfecção por tempos maiores que 30 minutos. possibilitando também a hipótese de aumento na sua capacidade de multiplicação.

Outro resultado obtido neste estudo que gostaríamos de enfatizar, está relacionado com a capacidade de *C. striatum* em produzir biofilme, uma vez, que diversos autores (ELASRI; MILLER, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; SIMÕES et al., 2003; MOHAMED et al., 2004; FUX et al., (2005), alertaram quanto ao grau de resistência a agentes antimicrobianos, e até mesmo a radiação ultravioleta de alguns microrganismos, quando estes estão em suas formas sésseis, ou seja, em biofilme.

O problema maior que além da produção de biofilme, a matéria orgânica e o glutaraldeído em alguns casos intensificaram este fator de resistência. Os resultados de biofilme mostrados no estudo direcionam a atenção das equipes de saúde, pois todas as amostras representativas de cada pulso tipos mantêm formas sésseis viáveis mesmo depois a exposição do agente de desinfecção por 30 minutos tempos este determinado pela ANVISA como tempo suficiente para uma desinfecção de alto nível.

No Brasil tem sido sugerida a limitação da utilização do glutaraldeído 2% como desinfetante de primeira escolha para desinfecção de alto nível (DUARTE et al., 2009; ANVISA, 2010). Quanto ao glutaraldeído neste estudo podemos concordar com esses autores uma vez que o glutaraldeído vem se mostrando cada vez menos eficaz contra microrganismos multirresistentes além de fomentar a produção de biofilme de *C. striatum* como mostram os resultados.

Milhões de procedimentos cirúrgicos e procedimentos médicos invasivos são realizados a cada ano no mundo. Cada procedimento envolve o contato por um dispositivo médico ou instrumento cirúrgico com tecido estéril de um paciente ou membranas mucosas. Um grande risco de todos estes procedimentos é a introdução de agentes patogênicos que podem levar a uma infecção. A desinfecção ou esterilização de equipamentos inadequados, possui não só o risco associado à quebra de barreiras de acolhimento, mas também o risco de transmissão de patógenos ambientais de pessoa para pessoa. A desinfecção e a esterilização são essenciais para assegurar que os instrumentos médicos e cirúrgicos não transmitam patógenos infecciosos aos pacientes. Porque a esterilização de todos os itens de assistência ao paciente não é necessária. As políticas de saúde devem identificar, principalmente em função da utilização prevista dos itens, se a limpeza, desinfecção, ou esterilização é indicado. Vários estudos realizados em vários países documentaram a falta de conformidade com as diretrizes estabelecidas para a desinfecção e esterilização. O não cumprimento das orientações com base científica tem levado a inúmeros surtos. O uso adequado da desinfecção é baseada em estudos bem desenhados, avaliando a eficácia por meio de exames laboratoriais e efetividade através de estudos clínicos de processos de desinfecção (MCGEE; GOULD, 2003).

Os cateteres intravasculares são indispensáveis na prática da medicina moderna, particularmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) sendo, no entanto, importante fonte de infecção da corrente sanguínea primária. Aproximadamente 150 milhões de cateteres são puncionados cada ano nos hospitais e clínicas dos Estados Unidos, sendo mais de 5 milhões de cateteres venosos centrais. Os avanços tecnológicos favoreceram a manutenção de acesso

vascular por tempo mais prolongado e com maior frequência de uso, acarretando, por conseguinte, o aumento de infecções relacionadas a esse procedimento (APECIH; 2005). Os hospitais do Sistema Nacional de Vigilância das Infecções nosocomiais, relatam que muitas infecções hospitalares são relacionados ao uso de equipamentos invasivos, como cateter (ENI; EDGAR, 2007; MCGEE; GOULD, 2003).

O risco de infecção, devido ao acesso vascular, está associado a diversos procedimentos e fatores, tais como: à localização do acesso, solução infundida, experiência do profissional que realiza o procedimento, tempo de permanência, tipo e manipulação do cateter, entre outros. Esses fatores constituem pontos estratégicos importantes para ações preventivas dessas infecções. Embora a incidência de infecção da corrente sanguínea seja mais baixa que as outras infecções hospitalares (IH) como as pneumonias, infecções do trato urinário e aqueles do sítio cirúrgico, a infecção da corrente sanguínea tem sua importância por ser causa de substancial morbidade, mortalidade e elevação dos custos hospitalares (ROSENTHAL et al., 2003; FERNANDES, et. al., 2000). Dados norte americanos registram aumento no período de internação, variando entre 6,5 e 22 dias (APECIH; 2005). Trabalho realizado na Argentina encontrou excesso de custo de \$ 4.888,00 de aumento em razão da duração de internação de 11,9 dias por episódio de infecção da corrente sanguínea (ROSENTHAL et al., 2003).

Nossos resultados apontaram, para uma grau muito elevado na produção de biofilme em cateter de poliuretano, todas as amostras de *C. striatum* testadas revelaram capacidade significativa de produção de biofilme nesta superfície, fato que foi registrado tanto através da quantificação de bactérias viáveis, na presença e na ausência de biocidas, e na análise semi-quantitativa de rolamento de fragmento de cateter em ágar sangue proposta por Maki, (1997), quanto através de imagens de microscópio eletrônico de varredura, foi utilizado para observar a formação de biofilme de *C. striatum* sobre fragmentos de cateter de poliuretano, sendo observado que uma das características do biofilme e a presença de polissacarídeo, extra celular. Essa substância pode ser observada por microscopia de varredura, se parece com fios que conectam as células a superfície e entre si (DONLAN, 2001; COSTERTON, 2002; STORI, 2005).

Os fatores que afetam a eficácia de desinfecção um deles a matéria orgânica onde estão presentes cargas orgânicas e inorgânicas, tipo e nível de contaminação microbiana, concentração de e o tempo de exposição ao germicida, a natureza física do objeto, por exemplo: fendas , dobradiças, lumens, a presença de biofilmes, a temperatura e o pH do

processo de desinfecção dentre outros. Alguns desinfetantes só vão matar os esporos com tempos de exposição prolongados, estes são chamados de esterilizantes químicos. Em concentrações semelhantes, mas com períodos mais curtos de exposição (por exemplo, 30 minutos para glutaraldeído 2%), esses mesmos desinfetantes vão matar todos os microorganismos exceto grande número de esporos bacterianos, eles são chamados desinfetantes de alto nível. Desinfetantes de baixo nível pode matar a maioria das bactérias vegetativas, alguns fungos e alguns vírus em um período de prática de tempo (<10 minutos). Desinfetantes de nível intermediário é eficaz contra bactérias, a maioria dos vírus, e a maioria dos fungos, mas não necessariamente mata os esporos bacterianos. Germicidas diferem acentuadamente, principalmente em seu espectro antimicrobiano e rapidez de ação (RUTALA et al., 2008).

Concordando com Rutala et al., (2008), através dos resultados obtidos, pois a matéria orgânica foi sempre um fator de fomento tanto para tolerância aos desinfetantes e anti-sépticos quando para formação de biofilme confirmando também as conclusões de Lewis; Arens et al., (1995).

Os autores Bower et al., (1996); Chmielewski e Frank, (2003) observaram em estudos, que as propriedades fenotípicas e características de composição da membrana, fatores de virulência podem favorecer a persistência dos microorganismos em ambientes hospitalares e na comunidade. Assim como, propriedades auto-aglutinantes dos microorganismos também podem ter influência na capacidade de produzir biofilme.

Vários outros fatores influenciam a fixação inicial às superfícies, como o tipo e as propriedades do material da superfície, carga e microtopografia, características intrínsecas do microorganismo, como a carga, hidrofobicidade, presença de apêndices superficiais como pilinas, fímbrias, flagelos e cápsula, além da capacidade de produzir substâncias exopoliméricas (CERI, 1999).

A limpeza prévia é sobre tudo, um procedimento, indispensável no processo de desinfecção, muitos estudos relatam a importância, da limpeza antes da exposição aos agentes químicos. Isso se dá em razão da influencia da matéria orgânica nos processos de desinfecção, ela diminui significativamente a ação dos desinfetantes e anti-sépticos (Figuras 21)(Souza, et al., 1998).

Vale destacar aqui a atuação de Semmelweis, em 1847, que tornou compulsória a lavagem das mãos com água clorada, para todos os médicos, estudantes de medicina e pessoal

de enfermagem, reduzindo a mortalidade materna por febre puerperal de 12,2% para 2,4%, logo no primeiro mês de intervenção (THORWARD; 1970).

Em nosso estudo foi confirmada a importância da limpeza prévia com a remoção de toda a matéria orgânica, também foi significativamente negativa quando associada ao álcool a 70%, possibilitando a perda de eficácia do álcool, sensivelmente, fazendo com que a amostras *C. striatum* 1961/III, o tolera-se por até 30 minutos, isso nos choca pois levando em consideração os diversos estudos inclusive o de Mendes e Silva, (2009), demonstra a importância da lavagens das mãos, no controle de IRAS, entretanto, profissionais da saúde em uma grande parte, bem como a sociedade, faz a assepsia das mão sem antes lavá-las, o que neste contexto não é uma atitude muito sensata.

Nossos estudos pretendem estimular medidas que visem o correto isolamento, identificação deste microrganismo, assim como, o uso de desinfetantes mais eficazes, imprescindíveis para redução da incidência do *C. striatum* em ambiente hospitalar. Concordando com Howie; Alfa; Coombs (2008), através dos resultados obtidos percebe-se que a limpeza, bem como, os processos de desinfecção inadequados, sobre tudo, os de materiais de uso invasivos, favorecem a incidência de infecções hospitalares estabelecendo a existência de micro-organismos oportunistas multirresistente. A presença de matéria orgânica além de influenciar diretamente a ação dos agentes químicos ainda favorece a formação de biofilme. Consoante, o processo de desinfecção vai além de um simples procedimentos de limpeza, se trata de uma forte ferramenta no combate as IRAS, nesse contexto, então fica bem evidente que a limpeza previa do ambiente, bem como, os diversos dispositivos e de diversos tipos de superfícies. Há também necessidade de uma equipe atualizada e bem treinada, para essa execução, bem como, supervisores que testam a qualidade a todo momento, gestores disponíveis e comprometidos, investimento e uma mão de obra qualificada, além de recursos financeiros específicos para compra e pesquisa de novos agentes químicos antimicrobianos. Fica a certeza que esse investimento irá reduzir futuros gastos com tratamentos longos contra doenças oriundas de infecções de origem hospitalar.

Um outro movimento interessante na busca por um controle efetivo de infecções é uma criação de uma equipe de estímulo e cobrança de responsabilidade individual, onde existe toda uma estrutura no que tange a notificações, lembretes, comunicação, organização de palestras e cursos que estimulam práticas e atitudes voltadas a atividades que possam contribuir com a diminuição de infecções em ambientes hospitalar.

Esses dados nos deixam em alerta com as equipes que fazem essas diluições, e serviços será que esta equipe é bem treinada periodicamente? Ou até mesmo supervisionada? Tudo isso deve ser muito bem avaliado, em nossos resultados percebemos que alguns agentes de desinfecção, são mais eficazes quando são recém diluído como o monopersulfato de potássio, e o ácido peracético. Alguns Ambientes hospitalares infelizmente, não dispõe de muito recurso econômico e acaba optando por manter sempre o processo mais barato e que nem sempre é mais eficaz, uma alternativa é tentar utilizar agentes que não perdem eficácia tão rápido como Hipoclorito de sódio, alguns compostos de quaternário de amônio, e até mesmo o ácido peracético em uma composição composta por equipamentos permanentes disponíveis em alguns fabricantes de desinfetantes.

Outro alternativa que também pode otimizar os custos é a realização de estudos epidemiológicos com frequência para saber os patógenos mais prevalentes em determinados ambiente, assim direcionar suas compras, em produtos mais específicos os quais mais microorganismos são mais sensíveis .

O controle de Infecções deveria ser uma realidade para todos inclusive para as pessoas fora do ambiente hospitalar, pois, as bactérias multirresistente estão se multiplicando rapidamente e ficando cada vez mais resistente, estando presente em todos os lugares, incluindo na sociedade. As equipes epidemiológicas, assim como toda a sociedade devem estar unidas na busca de um ambiente limpo e livre das IRAS.

CONCLUSÕES

- a) Os ensaios de avaliação da susceptibilidade a soluções dos desinfetantes glutaraldeído 2%, ácido peracético 2%, hipoclorito de sódio 2,5%, alquil benzeno sulfonato de sódio 2% e Virkon 1% e dos anti-sépticos álcool 70%, álcool iodado e clorexidina 2% demonstraram que formas planctônicas e sésseis de amostras de *C. striatum* dos pulsotipos I, II, III e IV foram capazes de sobreviver aos tratamentos com biocidas diversos entretanto, em períodos variados e apresentaram tolerância aos biocidas favorecida pela presença de matéria orgânica;
- b) A amostras 1961/III, foi capaz de tolerar em sua forma planctônica e sésil, por período de até 30 minutos de ação tanto glutaraldeído quando o álcool á 70%.
- c) Houve uma correlação parcial entre os resultados de tolerância aos biocidas das amostras de *C. striatum* testadas pelos testes de susceptibilidade *Time Kill* e de disco-difusão;
- d) À semelhança do observado nos ensaios de *Time kill* na presença de BSA 2%, a maioria das amostras de *C. striatum* apresentou resistência ao glutaraldeído (halos de inibição de diâmetro <10 mm) álcool 70% (sem halos de inibição) nos ensaios de disco difusão, provavelmente em decorrência da presença de matéria orgânica;
- e) As amostras de *C. striatum*, independente da origem e dos pulsotipos, foram capazes de aderir em superfícies inertes sólidas de natureza hidrofílica (vidro), hidrofóbica (poliestireno) e metálica (material empregado na produção de pinças);
- f) Amostras dos pulsotipos I, II, III e IV, independente dos perfis de susceptibilidade aos antibióticos, também foram capazes de produzir biofilme na superfície de catéter de poliuretano além de exibir tolerância aos diversos biocidas;
- g) Amostras de *C. striatum* representativas dos pulsotipos I a IV que circularam em diferentes setores da unidade hospitalar, predominantemente as unidades de cirurgia e/ou de terapia intensiva e que levaram a óbito pacientes com infecção em sítios diversos e que foram na maioria submetidos a procedimentos de entubação endotraqueal, foram capazes de aderir a superfícies abióticas e produzir biofilme na superfície de cateter de poliuretano;
- h) A presença de biocidas (glutaraldeído e álcool etílico 70%) inibiu parcialmente a produção de biofilme de *C. striatum*. Todas as amostras testadas foram capazes de sobreviver em formas sésseis aos tratamentos por até 30 minutos;

- i) Formas sésseis da amostra representativa do clone predominantemente observado naquele hospital (1987/I) e multirresistente aos antimicrobianos exibiram maior habilidade de produzir biofilme em superfícies abióticas de tipos os diversos substratos e de sobreviver por maior tempo quando exposta ao tratamento com glutaraldeído;
- j) A amostra 1954/IV (MDS), que exibiu menor capacidade de aderência ao vidro, poliestireno e metal, apresentou tolerância parcial para todos os desinfetantes e anti-sépticos testados, entretanto foi a única capaz de tolerar o clorexidina a 2%, por até 30 minutos quando em formas sésseis, na presença de carreadores metálicos (pinças), além de ter sido capaz de produzir biofilme na superfície de catéter de poliuretano.
- k) O ácido peracético embora tenha sido tolerado por um período não superior a 4 minutos na presença de matéria orgânica pela amostra 1961/III mostrou-se mais eficaz para procedimentos de desinfecção de alto nível contra o *C. striatum*, em materiais de uso hospitalar, quando comparados com os outros biocidas testados;
- l) O álcool a 70%, quando não esteve associado a matéria orgânica foi eficaz as amostras de *C. striatum* após 1 minuto de ação, entretanto, perdeu sua eficácia significativamente, quando na presença de matéria orgânica, resultado confirmou a necessidade da lavagem das mãos antes de realizar assepsia com este anti-séptico.

REFERÊNCIAS

- ADDERSON, E. E.; BOUDREAUX, J. W.; HAYDEN, R.T. *Infections caused by coryneform bacteria in pediatric oncology patients*. Ped. Infec. Dis J.;27:136-41.2008.
- ÁLVAREZ, G.P.; DE MIGUEL CASAS, J.M.; RAMÍREZ, M.C.; BARTOLOMÉ, J. *Eficacia biodescontaminante obtenida mediante la aplicación de virkon®, perasafe® e hidróxido sódico sobre superficies de Alto riesgo microbiológico*. Rev.Comp.de Cien.Vet.;5(1):132-144.2011.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. *Adesão e formação de biofilmes microbianos*. In: ANDRADE, N. J. *O uso de compostos clorados na indústria de laticínios*. Inf. Agropec.; 155: 48-52 .1988.
- ANVISA. Disponível em:
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/reniss/manual%20_controle_bacterias.pdf.
 2007. Acesso em: 15 fev. 2013.
- ANVISA. *Controle de Infecção em Serviços da Saúde*. ANVISA, 2014. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/legis.htm>>. Acesso em 04 jan. 2014.
- ANVISA. *Curso Básico de Controle de Infecção Hospitalar*. In: Caderno C Métodos de Proteção Anti-infecciosa. Brasil, 2000. 84 p. Disponível em:
<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/pdf/CIHCadernoC.pdf>>. Acesso em 02 dez. 2013.
- ARCIOLA, C.R. et al. *Etiology of implant orthopedic infections: A survey on 1027 clinical isolates*. Int. J Artif Organs.; 28:1091-1100.2005.
- Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar. *Infecção Relacionada ao uso de Cateteres Vasculares*. São Paulo (SP). Disponível em: www.apecih.org.br/informe-tecnico/125. Acesso em: 15/04/2002
- BAIO, P. V.; et al. *Clonal multidrug-resistantCorynebacteriumstriatumwithin a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil*. Mem.Inst.Oswaldo Cruz.;108: 63-98.2013.
- BARON, E. J.; PETERSON L. R.; FINEGOLD, S. M. *Methods for testing antimicrobial effectiveness* In: *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed. stLowis- Mosby - year. book, ink.; 70: 168-193. 1994.
- BAUER, W.; KIRBY, W. M.; TURCCK, M. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Americ. J. Clinic. Pat.; 45: 493-496. 1966.
- BELMARES, R.; et al. *Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry*. LWT F. Sci.Technol.; 37: 857-864. 2004.
- BELMARES, J. *Corynebacterium endocarditis species-specific risk factors and outcomes*. BMC Infectious Diseases, USA.; 7, 2: 1-8. 2007.

BERNARD, K. *Emendation of the description of the species Corynebacterium propinquum to include strains which produce urease*. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology.; 63, 6: 2146-2154. 2013.

BIBERSTEIN, E. L.; ZEE, Y. C. *Tratado de microbiologia veterinaria*. Zaragoza: Acriba.; 157-161.1994.

BIOMÉRIEUX. APIWEB.; Disponível em: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>>. Acesso em: 22 de abril de 2011.

BIOMÉRIEUX. Brochura técnica: Informações biológicas para programas de identificação. França.; Ref.; 41207.2005.

BLOCK, S. S. *Disinfection, sterilization, and preservation*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, Perox. comp.; 167-81.1991.

BLOCK, S. S. Peroxygen compounds. In: *Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lipp. Wil. & Wil.; 185-204.2001.

BOLTIN, D.; et al. *Corynebacterium striatum--a classic pathogen eluding diagnosis*. Eur.J.Intern.Med.; 20: 49-52.2009.

BONIFAIT, L.; GRIGNON, L.; GRENIER, D. *Fibrinogen induces biofilm formation by Streptococcus suis and enhances its antibiotic resistance*. Appl Env. Microbiol.; 74: 4969-4972.2008.

BOYCE, J. M. *Increasing prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in the United States*. Infect. Control. Hosp. Epid.; 11: 42-639.1990.

BRANDENBURG, A. H. A.; et al. *Patient-to-patient spread of a single strain of Corynebacterium striatum causing infections in a surgical intensive care unit*. J. Clin. Microb.; 34: 2089-2094.1996.

BROWN, M. R. W.; GILBERT. P. *Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents*. J. Appl. bacteriol. Symp. Suppl.; 74: 87S-97S.1993.

BROWN, M. R. W.; WILLIAMS, P. *The influence of environment on envelope properties effecting survival of bacteria in infections*. Annu. Rev. Microbial.; 39: 527-556.1985.

BRUN-BRUISSON, C.; et al. *Estrutura de biofilme*. Bol. de Biotec. 2005.

CAMPANILE, F.; et al. *Clonal multidrug-resistant Corynebacterium striatum strains, Italy*. Emerg Infec Dis.; 15: 75-78.2009.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. *National Nosocomial Infections Surveillance (NNISS) System report, data summary from January*, Centers For Disease Control And Prevention, hybe. Am J Infect Control.; 32: 470-85.2004.

- CERI, H.; OSLAN et al. *The MBEC assay system: Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocid susceptibility testing*. *Grow.in Biof.*; 337-385.2001.
- CHIN, H. J.; JAMES, T. D. *Control of Communicable Disease Manual*. Amer. Pub. H. Assoc., Washington . D.C.2000.
- CLSI. *Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria.*; 45: 1-56238-607-7. 2007.
- COSTERTON, J.; STEWART, P.; GREENBERG, E. *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. *Science.*; 284: 1318-1322.1999.
- COSTERTON, J. W.; et al. *Microbial biofilms*. *Annual Rev. Microb.*; 49: 711-745.1995.
- COSTERTON, J. W.; VEEH, R.; SHIRTLIFF, M. *The application of biofilm science to the study of and control of chronic bacterial infections*. *J Clin. Inv.*; 112: 1446-1477.2003.
- COSTERTON, J.W. *Higiene na Indústria de Alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. *An. Rev Microb*. 2009.
- DAVIS, L. S. *Shape matching using relaxation techniques*. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*. the mac.; 1: 60-72.1979.
- DICKSON, M. M. W.; SMITH, M. C.; GROJEAN, M. W. *An Organizational Climate Regarding Ethics: The Outcome of Leader Values and the Practices that Reflect Them*, *Lead. Quart.*; 12: 197-214.2001.
- DIEZ-AGUILAR, M.; et al. *Non- diphtheriae Corynebacterium species: an emerging respiratory pathogen*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*.2012.
- DOOLEY, D. P.; et al. *Validation of catheter semiquantitative culture technique for non staphylococcal organisms*. *J Clin. Microb.*; 34: 409-412.1996.
- DOOLEY, M. P.; FERNANDEZ-ARIAS, E.; KLETZER, K. *Is the debt crisis history? Diagnosis Of Central Venous Catheter-Related Sepsis: Critical Level Of Quantitative Tip Cultures*, *Arch. Intern. Med.*; 147: 873-877.1996.
- BOLTIN, D. et al. *Corynebacterium striatum*, A classic pathogen eluding diagnosis. Recent capital inflows to developing countries. *Wor.Ban. Econ. Rev.*; 10: 27-50.2009.
- DUARTE, R. S.; LOURENÇO, M. C.; FONSECA, L. S.; LEÃO, S. C.; AMORIM, E.; ROCHA I. L.; *Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense*. *J Clin Microb.*; 47: 2149-55.2009.
- EDWIN TAMASHIRO, et al. *Bacterial biofilms in chronicrhinosinusitis: what does this concept change in therapeutical approach?eficacia biodescontaminante obtenida mediante laaplicación de virkon®, perasafe® e hidróxido sódico sobre superficies de alto riesgo microbiológico*, *Rev. Comp. de Cien.Veter.*; 5: 132-144.2011.

ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. *Study of the response of the biofilm bacterial community to UV radiation*. Appl. and Environ. Microb.; 65: 2025-2031.1999.

ENI, S.; et al. *Infecções da corrente sanguínea em pacientes em uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva*, Rev. Latino-am Enf.; 15: 3.2007.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature (LBSN).;1997. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/>>. Acesso em 12 dez. 2013.

FALKINHAM, J. O. *Mycobacteria aerosols and respiratory disease*. Emerg. Infect. Dis., v.9, p. 763-767. 2003.

FAVERO, M. S.; BOND, W. W. *Chemical disinfection of medical and surgical materials*. In: Block, S. S. *Disinfection, sterilization and preservation*, 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger.; 617-641.1991.

FAVERO, M. S. *Sterilization Procedures Accomplished by liquid chemical Germicides*, Chemical Germicides in the Health Care Field-Current and Evaluation of Efficacy and Reserche Needs. Amer. Soc. for Microb.; 652-674.1987.

FERGUSON, B. J.; STOLZ D. B. *Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis*. Am J Rhinol.; 19: 452-7. 2005.

MENDES F.S.; GONÇALVES V. M. S. *Lavagem das mãos no controle da infecção hospitalar: um estudo sobre a execução da técnica*, Rev.Enf. Integ. – Ipatinga: Unileste-MG.; 2: 8.1.2009.

FERNANDES A.T.; RIBEIRO N. F. *Infecção do Acesso Vascular, em Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde*. São Paulo (SP): Atheneu.; 556-79. 2000.

FERNANDEZ-AYALA, M.; NAN, D. N.; FARINAS, M. C. *Vertebral osteomyelitis due to Corynebacterium striatum*. Am.J.Med.; 111: 167. 2001.

FONTANA, R. T. *As micobacterias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública*. Rev. Bras. Enferm.; 61: 371-376. 2008.

FRANSON, T. R.; SHETH, N. K.; ROSE, H. D.; SOHNLE, P. G. *Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters*. J Clin Microb.; 20: 500–505-. 1984.

FUNKE, G.; PÜNTNER, V.; VON GRAEVENITZ, A.; *Antimicrobial susceptibility patterns of some recently established coryneform bacteria*. Agents Chem.Dec.;40: 2874-8.1996.

FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE J. E.; BERNARD K. A.; *Clinical microbiology of coryneform bacteria*. Clin. Microb.;10: 125-59.1997.

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. *Coryneform gram-positive rods*. In: Murray PR, Baron EJ, et al. eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, DC: ASM Press. 2007.

GARCIA-CRESPO, D.; et al. *Polymorphisms in Basque sheep breeds determined by PCR-restriction fragment length polymorphism and real-time PCR. Vet. Rec.*; 154: 717-722.2004.

GARCÍA-CRESPO, D.; et al. *Technical note: molecular typing of Corynebacterium bovis isolates by pulsed-field gel electrophoresis. J Dairy Sci. Wayne, PA: Clin. and Lab. Stand. Inst.*; 88: 1705-1707.2005.

GILBERT, P.; BROWN, M. R. W. *Some perspectives on preservation and disinfection in the present day. Int. Biodeterior. Biodegrad.*; 36: 219-226.1995.

GOMES D. L. R.; MARTINS C. A. S.; SANTOS L. S. *Corynebacterium diphtheriae as an emerging pathogen in nephrostomy cateter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. J. Med. Microb.*; 58: 1419-27.2009

GUVERICH, I. *The Disinfectant Dilemma Revisited. Infect Control Hosp. Epidemiol.*; 11: 96-100.1990.

HAWKEY, P.M. *The origins and molecular basis of antibiotic resistance. B. M. J.*; 317: 657-660.1988.

HEIDEMANN, D.G.; et al. *Corynebacterium striatum keratitis. Cornea.*; 10: 81-82.1991.

HIRATA, R. JR, et al, *Potential pathogenic role of aggregative adhering Corynebacterium diphtheriae of different clonal groups in endocarditis. Braz J. Med. Biol. Res.*; 41: 986–991.2008.

HIRATA, R. JR., et al. *Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains. Microb. Pathog.*; 36: 125–130. 2004.

HOWIE, R.; ALFA, M. J.; COOMBS, K. *Survive of enveloped and non-enveloped viroses on surfaces compared with other micro-organisms and impact suboptimal disinfectant exposure. J. Hosp. Infec.*; 69: 368-376-2008.

HOYLE B, COSTERTON J. *Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Prog Drug Res.*; 37: 91-105.1991.

JANDA, W. M. *Corynebacterium species and the Coryneform Bacteria: Part I: New and Emerging Species in the Genus Corynebacterium. Clin. Microb. Newles, USA.*; 20: 41-52. 1998.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. *Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonae. J. Bact.*; 172: 1418-1423.1990.

KNOX, K. L.; HOLMES, A. H. *Nosocomial endocarditis caused by Corynebacterium amycolatum and other Nondiphtheriae Corynebacteria. Emerg. Infec. Dis., London.*; 8: 97-99.2002.

KONEMAN, E. W.; et al. *Corynebacterium striatum: an underappreciated community and nosocomial pathogen. J Infect.*; 50: 338-343.2005.

LEHMANN and NEUMANN. *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik*, 1st ed., J.F. Lehmann, München, 1896. 1907.

LEONARD, R. B.; et al. *Molecular evidence of person-to-person transmission of a pigmented strain of Corynebacterium striatum in intensive care units. J.Clin. Microbiol.*32, 164-169. 1994.

LEWIS, D. L.; ARENS, M. *Resistance of microorganisms to disinfection in dental and medical devices. Nat. Med.* 1: 956-958. 1995.

LÓPEZ, A. B.; et al. *Cystitis and haematuria due to Corynebacterium striatum. A case report and review. Actas.Urol. Esp.*; 33: 909-912. 2009.

LORENA, N. S. O.; DUARTE, R. S.; PITOMBO, M. B. *Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos vídeocirúrgicos: a hipótese do glutaraldeído. Ver. Col. Bras. Cir.*; 36: 266-267. 2009.

MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SARAFIN, H. W. *A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. The New Engl. J. Med.*; 296: 1305-9. 1977.

MARTIN, M. C.; et al. *Septicaemia due to Corynebacterium striatum: molecular confirmation of entry via the skin. J. Med. Microb.*; 52: 599-602. 2003.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; ORTEGA, M. C.; AND SUAREZ, A. I. *Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. J.Clin.Microbiol.*; 33: 1318-1321. 1995.

MARTINS, C. A. S.; et al. *Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; 104: 905-913. 2009.

MATTOS-GUARALDI A.L.; et al. *Corynebacterium diphtheriae threats in cancer patients. Rev. de Microb. Argentina.*; 33 :96-100. 2001.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. *Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of Corynebacterium diphtheriae. Braz. J. Med. Biol. Res.*; 24: 399-406. 1991.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. *Bacteriological properties of a sucrose-fermenting Corynebacterium diphtheriae strain isolated from a case of endocarditis. Curr.Microb.*; 137: 156-158. 1998.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; et al. *Characterization of surface saccharides in two Corynebacterium diphtheriae strains. FEMS Microb. Lett.*; 170: 159-166. 1999.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; ANDRADE, A. F. B. *Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and non fermenting Corynebacterium diphtheriae strains evaluated by different methods. Cur. Microb.*; 38: 37-42. 1999.

- MCDONNELL, G. E.; RUSSELL, A. D. *Antisepsis and Disinfection: Action, and Resistance*. Clin. Microbiol. Rev.; 12: 147-179. 1999.
- MCDONNELL, G. E.; WASHINGTON D. C.; *Antisepsis, Disinfection, e Sterilization: Typo, Action, and Resistance*. A. S. M. Press. 2007.
- MCGEE, D. C.; GOULD, M. K. *Preventing complications of central venous catheterization*. N. Engl. J. Med.; 348: 1123-33. 2003.
- MOHAMED, E. O.; MILLER, R. O. *Study of the Response of a Biofilm Bacterial Community to UV Radiation*. Microbiol.; 65: 2025-2031. 1999.
- MOORE, K.; et al. *Surface bacteriology of venous leg ulcers and healing outcome*. J. Clin. Pathol.; 63: 830-834. 2010.
- MORAES, M. S. V.; et al. *Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos*. Ciênc. Tecnol. aliment.; 17. 1997.
- MOREIRA, L. O.; et al. *Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of Corynebacterium diphtheriae strains*. Appl. Env. Microb.; 69: 5907-5913. 2003.
- BOU-CHACRA, N. A.; MITSUKO T. O. *Validação de método para avaliação da qualidade sanitária de preparação cosmética de base lipófila*, Rev. Bras. Cienc. Farm.; 39. 2003.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. *Biofilm formation as microbial development*. Annu. Rev. Microb.; 54: 49-79. 2000.
- OLIVA, A.; et al. *Pacemaker lead endocarditis due to multidrug-resistant Corynebacterium striatum detected with sonication of the device*. 2010.
- OLIVEIRA, A. C. *Healthcare-associated infection: challenges in its prevention and control*. Rev. Min. de Enf., Brazil.; 13, 3: 445-450. 2009.
- OSBALDISTON, G. W. *Laboratory procedures in clinical veterinary bacteriology*. Baltimore: Univ. P. Press.; 265. 1973.
- OTSUKA, Y.; et al. *Emergence of multidrug-resistant Corynebacterium striatum as a nosocomial pathogen in long-term hospitalized patients with underlying diseases*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis.; 54: 109-114. 2006.
- PEREIRA, M. S. *Infecção hospitalar e seu controle: problemática e o papel do enfermeiro*. Rev. Esc. Enf. da USP, Brasil.; 27, 3: 355-361. 1993.
- QUEIROZ N. S. *A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar*. Texto contexto - Enferm. spe, Florianópolis.; 13. 2004.
- RENOM, F. *Nosocomial outbreak of Corynebacterium striatum infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin. Microb. Jun; 45, 6: 2064-7. 2007.

RENOM, F.; et al. *Nosocomial outbreak of Corynebacterium striatum infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin. Microb.; 45: 2064–2067. 2007.

ROSENTHAL V. D.; et al. *The attributable cost, length of hospital stay, and mortality of central line-associated bloodstream infection in intensive care departments in Argentina: A prospective, matched analysis*. Am. J. Infect Control; 31: 475-80. 2003.

RIEGEL, J. A.; et al. *Stimulation of fluid secretion of Malpighian tubules of Drosophila melanogaster Meig. by cyclic nucleotides of inosine, cytidine, thymidine and uridine*. J. Exp. Biol.; 201: 3411–3418. 1998.

RUSSELL, A.D.; CHOPRA, I. *In Understanding antibacterial action and resistance*, 1st ed. Ell. Hor, London. 1990.

RUSSELL, A. D.; RUSSELL, N. J. *Biocides: activity, action and resistance*. Symp. Soc. Gen. microb.; 53: 327-36. 1995.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. *Antimicrobial activity and action of silver*. Prog. Med. Chem.; 31: 351-371-1994.

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J.; WOODS, G.L. *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC), Guideline for Disinfection and sterilization in Healthcare Facilities*. Center for Diseases Control and Prevention. S.D.; Diag. Microb. Texto e atlas colorido, Rio de Janeiro.; 6. 2008.

RUTALA, W. A. *APIC guidelines for selection and use of disinfectants*. Am. J. Infect. Control.; 23: 313-342. 1995.

RUTALA, W. A.; et al. *Inactivation of mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by 14 hospital disinfectants*. Am. J. Med.; 91: 267S-271S. 1991.

SANTIAGO, L. B.; et al. *Avaliação in vitro da sensibilidade da corynebacterium pseudotuberculosis frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento*, Arq. Inst. Biol., São Paulo.; 77, 4: 593-600. 2008.

SATTAR, S.A.; SPRINGTHORPE, V.S. *New methods for efficacy testing of disinfectants and antiseptics*. In Rutala WA, ed. Disinfection, sterilization and practices in healthcare facilities. Washington. D.C: Assoc. for Prof. in Infec. Cont. and Epid.; 174: 80-86-2001.
SCHOLLE, H. *A spontaneous joint infection with Corynebacterium striatum*. J. Clin. Microb.; 2: 656–8. 2007.

SCHRODER, J. *Complete genome sequence, lifestyle, and multi-drug resistance of the human pathogen Corynebacterium resistens DSM 45100 isolated from blood samples of a leukemia patient*. B. M. C. Genomics, Germany.; 13: 141. 2012.

SCHROEDER, H.; SANCHEZ-QUINTO. *Genomic affinities of two 7,000-year-old Iberian Hunter-Gatherers. The genetic background of the European Mesolithic and the extent of population replacement during the Neolithic [1–10] is poorly understood, both due to the scarcity of human remains from that period [11–18]*. Cur. Biol.; 22: 1494-1499. 2012.

- SHI, X.; ZHU, X. *Biofilm formation and food safety in food industries*. T. in F. Scien. Tech. 2006.
- SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O; VIEIRA, M. J. *Monitoring the effects of biocide treatment of Pseudomonas Fluorencens Biofilms formed under different flow regimes*. Water Scienc. andTech.; 47, 5: 217-223. 2003.
- SOARES, M. A. *Resistência Antibiótica*. Pharm. Bras., Brasil.; 59-62.2001.
- SAORI, M. C.; et al. *Efeito antimicrobiano In Vitro da Associação de Polimixina B e Ceftazidima Em Amostras Clínicas De Pseudomonas Aeruginosa*. Cienc. Cuid. Saud.; 7: 76-81.2008.
- SOUZA, A. C. S.; PEREIRA, M. S.; RODRIGUES, M. A. V. *Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão*. Rev.latino-am.enf. Rib.Preto, Brasil.; 6, 3: 95-105. 1998.
- SOUZA, M.C. *Propriedades adesivas a substratos abióticos e bióticos, invasão e indução de apoptose Celular de Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, Defes. Dout., UERJ, Brasil. 2013.
- STEPANOVIC, S.; et al. *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. J. Microb. Meth, EUA.; 40: 175-179. 2000.
- STEPHAN, J. *Multidrug resistance of a porin deletion mutant of Mycobacterium, smegmatis*. Antimicrob. Agent. Chem.; 48, 11: 416-370. 2004.
- STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lanc.; 358: 135-138. 2001.
- SUZUKI, T.; et al. *Suture-related keratitis caused by Corynebacterium macginleyi*. J. Clin. Microb.; 45: 3833-3836. 2007.
- SVETLÍKOVÁ, Z. *Role of porins in the susceptibily of Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium chelone to aldehyde-based disinfectants and drugs*. Antimicrob. Agents Chemother.; 53, 9: 4015-18. 2009.
- THOMSON, Jr. R. B. *Specimen collection, transport and processing: bacteriology*. In: PR Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, MA Pfaller, *Manual of clinical microbiology*, ASM Press, Washington D.C.; 485-514. 2007.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*.8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- VARGAS S. S.; MARTINS, D.; CAIERÃO J, et al, . *Corynebacterium striatum infecting a malignant cutaneous lesion: the emergence of an opportunistic pathogen*. Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo.; 51: 115–6.2009.
- VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. D. *Bacteriologia Geral*. In: Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, Brasil. 2007.

VON GRAEVENITZ, A.; *Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures*. *Infect. Switzerland.*; 26, 1: 36-38. 1998.

VU, T.; ALTMAN, A.; SHOHAM, Y. *On the complexity of schedule control problems for knockout tournaments*. In *Proc. of AAMAS.*; 225–232. 2009.

WANG, C. C.; MATTSON, D.; WALD, A. *Corynebacterium jeikeium bacteremia in bone marrow transplant patients with Hickman catheters*. *Bone Marrow Transplant.*; 27: 445-449. 2001.

WATNICK, P.; KOLTER, R. *Minireview – Biofilm, city of microbes*. *J. of Bacter.*; 182: 2675-2679.1999.

WEBB, S. J.; et al. *Further evidence for an abnormality in the temporal processing of faces in autism*. Poster session presented at the Society for Research in Child Development, Tampa, FL. 2003.

WEISS, K.; LABBE, A. C.; LAVERDIERE, M. *Corynebacterium striatum meningitis: case report and review of an increasingly important Corynebacterium species*. *Clin. Infect. Dis.*; 23: 1246-1248.1996.

WONG, K. Y.; CHAN, Y. C.; WONG, C. Y. *Corynebacterium striatum as an emerging pathogen*, *J. Hosp. Infect.*; 76: 371-372. 2010.

XAVIER, J. B.; et al. *Monitorização e modelação*- ASM Press, Washington D.C. 2010.

ANEXO - Participação em eventos científicos internacionais e nacionais e publicação em livros de resumos durante o tempo de vigência do curso de Mestrado

EVENTOS INTERNACIONAIS:

SOUZA, C., MOTA, H. F., RAMOS, J. N., HIRATA JUNIOR, R., SANTOS, C., MOREIRA, L. O., MATTOS - GUARALDI, A. L. Avaliação da formação de biofilme por amostras de *Corynebacterium striatum*, isoladas em surto epidêmico nosocomial In: Congresso Latino Americano de microbiologia - Santos, São Paulo, 2012, Santos. w w w .sbmicrobiologia.org.br/latino/. São Paulo: SBHIIH, 2012. v.1. *Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/latino>.*

Souza C^{1,4}, Mota HF^{1,4}, Souza MC¹, Ramos JN¹, Martins, MSM¹, Sant'Anna LO¹, Andrade AO¹, Fátima N¹, Vieira VV³, Santos CS¹, Hirata JrR¹, Moreira LO², Mattos-Guaraldi AL¹. *Influência do desinfetante glutaraldeído e de matéria orgânica na produção de biofilme em superfícies abióticas de clones multirresistentes de Corynebacterium striatum. no III Congresso Latino Americano de Resistência Bacteriana-Gramado-RS.*

Lincoln de Oliveira Sant'Anna; Monica Cristina de Souza; Louisy Sanches dos Santos; Cintia Silva dos Santos; Leonardo Paiva de Sousa; Juliana Nunes Ramos; Higor Franceschi Motta; Cassius de Souza; Thereza Cristina Ferreira Camello; Fatima Napoleao; Raphael Hirata Junior; Ana Luiza de Mattos Guaraldi: Corynebacterium Spp. Em Infecções do Trato Urinário: Aspectos Epidemiológicos e de Resistência a Antimicrobianos, no III Congresso Latino Americano de Resistência Bacteriana-Gramado-RS.

EVENTOS NACIONAIS:

SOUZA, C., MOTA, H. F., RAMOS, J. N., SANTOS, C., VIEIRA, Y., HIRATA JUNIOR, R., MOREIRA, L. O., MATTOS-GUARALDI, A. L. *Perfis De Susceptibilidade A Agentes Antimicrobianos, Antissépticos e Desinfetantes De Amostras De Corynebacterium striatum, Isoladas De Surto Nosocomial Ocorrido No Rio De Janeiro In: Congresso Brasileiro de Controle e epidemiologia hospitalar - Santos, São Paulo, 2012, Santos.*

SOUZA, C., MOTA, H. F., RAMOS, J. N., SANTOS, C., VIEIRA, Y., HIRATA JUNIOR, R., MOREIRA, L. O., MATTOS-GUARALDI, A. L. *Avaliação da formação de biofilme por amostras de Corynebacterium striatum isoladas em surto epidêmico nosocomial. São Paulo: Versícula, 2012. v.03. p.01 - 2 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Congresso Brasileiro de Microbiologia - Foz do Iguaçu.*

RAMOS, J. N., SANTANNA, L. O., MOTA, H. F., ALMENARA, G., MIRANDA, S. W. S., SOUZA, C., PEIXOTO, R. S., NAPOLEAO, F., SANTOS, L. S., GOMES, D. L. R., CAMELLO, T. C. F., DAMASCO, P. V., HIRATA JUNIOR, R., MATTOS-

GUARALDI, A. L. Co-infecção Difteria-mononucleose Infecciosa: Importância da Difteria no Diagnóstico das Faringites In: Foz do Iguaçu. **Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. v.1. p.1 - 1.

SOUZA, C., MOTA, H. F., ANDRADE, A. O., RAMOS, J. N., VIEIRA, Y., GOMES, D. L. R., HIRATA JUNIOR, R., MOREIRA, L. O., MATTOS-GUARALDI, A. L. *Comportamento de Amostras de Corynebacterium striatum Isoladas de Surto Epidêmico Nosocomial Frente a Diferentes Agentes Antimicrobianos* In: **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu.** Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de

MOTA, H. F., GOMES, D. L. R., BAIO, P. V. P., SANTOS, L. S., SANTANNA, L. O., RAMOS, J. N., GUIMARAES, J. P. D., BARBOSA, E. A. B., SOUZA, C., CAMELLO, T. C. F., HIRATA JUNIOR, R., MATTOS GUARALDI, A. L. Esquema de triagem no diagnóstico diferencial de amostras clínicas de *Corynebacterium striatum* In: **26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu.** Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. v.1. p.1 - 1

SOUZA, C., MOTA, H. F., RAMOS, J. N., SANTOS, C., VIEIRA, Y., HIRATA JUNIOR, R., MOREIRA, L. O., MATTOS-GUARALDI, A. L. Teve Trabalho Científico *Caracterização De Amostras De Corynebacterium Striatum Oriundas De Surto Epidêmico Em Ambiente Hospitalar, Rio De Janeiro, Brasil. Apresentado Na Modalidade Pôster, Durante O XII Congresso Brasileiro De Epidemiologia E Infecção Hospitalar, Na Cidade De Santos/Sp.*

SOUZA C, MOTA, HF, SOUZA, M.C., RAMOS, JN, FARIAS, Y.V., MARTINS M.S.M, SANT'ANNA L.O., SANTOS L.S., VIANA V. G., FÁTIMA,N, ANDRADE A.O., STAVRACAKIS, R.P., SANTOS C.S., HIRATA, JR.R., MOREIRA, L.O., MATTOS-GUARALDI A.L. *Avaliação Da Produção De Biofilme e da Susceptibilidade De Corynebacterim striatum Multirresistente Frente a Desinfetantes e Antisépticos Utilizando Carreadores Metálicos com a autoria de: foi apresentado na forma de pôster durante o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2013 realizado no Centro de Convenções de Natal, na cidade de Natal, RN, no período de 29 de setembro a 3 de outubro de 2013.*

RAMOS, J. N., SIMPSON-LOUREDO, L., SANTOS, L. S., VIDAL, L. M. R., MOTA, H. F., SOUZA, C., LADEIRA, E. M., FARIA, Y. V., CAMELLO, T. C. F., SALGADO, A., MATTOS-GUARALDI, A. L., VIEIRA, V. V., HIRATA JR, R., DAMASCO, P. V. *Abiotrophia Defectiva Aortic Valve Endocarditis Associated To Pricking By Fishbone - A First Case Report In Brazil, foi apresentado na forma de pôster durante o 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2013 realizado no Centro de Convenções de Natal, na cidade de Natal, RN, no período de 29 de setembro a 3 de outubro de 2013.*

NAPOLEÃO, F^{1,2}, SANTOS, LS¹, SOUZA, MC¹, CAMELLO, TCF^{2,1}, SANTOS, CS¹, PEREIRA, GA³, GOMES, DLR^{6,1}, FARIA, YV^{1,4}, ANTUNES, CA^{1,5}, SOUZA, C¹, ALVES, GB¹, SOUZA, L.P.¹, JR, RH¹, GUARALDI, AL *O perfil de*

*sensibilidade a antimicrobianos de amostras de Rhodococcus equi identificadas no HUPE/UERJ no período de 1990 a 2012 foi apresentado no **27º Congresso Brasileiro de Microbiologia que será realizado de 29 de setembro a 3 de outubro de 2013 no Centro de Convenções de Natal, Natal, RN, Brasil.***