AVALIAÇÃO DE CONSERVAÇÃO DA VIABILIDADE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *ESCHERICHIA COLI* SOB INFLUÊNCIA DE FLUÍDOS BIOLÓGICOS EM SUPERFÍCIES SECAS

Deigilam Cestari Esteves[1], Heberth Paulo dos Santos Silva[2], Kerolin Suelen Vieira Rodrigues Pinto[2], Bruno Lima Sonvesso[2], Rogéria Keller[2], Marcus Vinícius Pimenta Rodrigues[1,2].

[1] Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE. Curso de Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. [2]Curso de Graduação em Biomedicina, Presidente Prudente - SP. E-mail: marcusvinicius@unoeste.br
Auxílio Financeiro: UNOESTE, CAPES-PROSUP.

RESUMO

As bactérias podem constituir a microbiota de diversos seres, incluindo o homem. Com o avanço tecnológico, o estresse causado aos seres, levou a necessidade de adaptação dos mesmos. No caso das bactérias, essa adaptação é perceptível em pouco tempo, uma vez que seu ciclo biológico é curto. Um desequilíbrio nas relações entre homens e bactérias, pode levar a problemas na integridade da saúde do hospedeiro, como infecções ambientais e hospitalares causadas por bactérias multiresistentes com índices crescentes nos últimos anos, manifestando-se com alta morbidade e mortalidade. Pesquisas recentes evidenciam que as bactérias demonstram um perfil de sobrevivência, não cultivo, em superfícies secas de modo a manter a sua virulência quando expostas a fluidos biológicos. O objetivo desse estudo foi documentar através de análises laboratoriais a capacidade de sobrevivência das principais bactérias de interesse médico em superfícies abióticas. Tendo o fluído biológico sangue permitido viabilidade por maior tempo.
Palavras chave: bactéria, adaptação, multiresistência, fluído biológico, viabilidade.

EVALUATION OF CONSERVATION FEASIBILITY OF *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* UNDER THE INFLUENCE OF BIOLOGICAL FLUIDS ON DRY SURFACES.

ABSTRACT

The bacteria can constitute the microbiota of diverse beings, including humans. With the technological advance, the stress caused to the beings lead to their need to adapt. In the case of bacteria this adaptation is seen in a short period of time, once its biological cycle is short. An unbalance in the relationship between humans and bacteria may lead to problems in the host's health, such as environment and hospital infections caused by multi-resistant with growing figures in the past few years, presenting high morbidity and mortality rates. Recent researches highlight that bacteria show a survival profile which is non-cultivated on dry surfaces in order to keep its virulence when exposed to biological fluids. The objective of this study was to document through laboratorial analysis the survival capability of the main bacteria of medical interest on abiotic surfaces, having the biological fluid, the blood, allowed viability for a longer period of time.
Key words: bacteria, adaptation, multiresistant, biological fluid, viability

INTRODUÇÃO

As bactérias podem ser encontradas em todos os ambientes, uma vez que dispõem de mecanismos que possibilitam a conservação da sua viabilidade por longos períodos de estresse[1]. São capazes de desempenhar diversas funções quando em equilíbrio com os seres vivos que compartilham o mesmo habitat e ainda com os seres que mantém relações[2].

O crescimento bacteriano no organismo do hospedeiro, sem causar agressão é chamado de colonização, porém o mesmo microrganismo é capaz de induzir o indivíduo à infecção, podendo ou não apresentar manifestações clínicas, que caracterizam diversificadas patologias, sedo adquiridas tanto no ambiente comunitário como no hospitalar[2].

Análises efetivas da condição ambiental do habitat de bactérias são necessárias[3], uma vez que as bactérias possuem a capacidade de adaptação ágil ao meio, diretamente relacionada ao seu tempo de vida, tornando-as aptas a responder prontamente a perturbações ou estresse. Inserida no ambiente hospitalar, as bactérias sofrem várias pressões do ambiente, enfatizando o uso de múltiplos antimicrobianos que selecionam cepas mais resistentes.

Infecções relacionadas à ambientes hospitalares são adquiridas pelo pacientes no decorrer de sua internação, tendo relação direta com o tempo de internação e a alta morbimortalidade, dispondo de um acompanhamento de alto custo, tornando-se oneroso para todas as partes envolvida[4,5].

O manejo dessas infecções ainda é desafiador para os controladores atuantes nos sistemas de saúde e responsáveis pelas práticas epidemiológicas[6], constando a frequente contaminação cruzada como grande fator de disseminação, de 13 a 34.6%.

Dentre as principais bactérias de interesse médico relacionadas à contaminação ambiental estão o *Staphylococcus aureus e Escherichia coli*[7]. O correto rastreamento dessas linhagens de bactérias dentro do ambiente hospitalar é fator fundamental para a identificação de uma provável fonte de contaminação[8].

O gênero *Staphylococcus, são* bactérias GRAM positivas, esféricas (cocos), que formam agrupamentos irregulares em cachos de uva, aeróbias ou anaeróbias facultativas, imóveis, não produzem esporos, apresentam parede revestida por peptidoglicano e ácido teicóico[9]. Constituem a microbiota residente ou transitória do homem, mas são responsáveis por diversas infecções, frequentemente presentes na infecção primária da corrente sanguínea, infecções do trato respiratório inferior e de sítio cirúrgico, podendo apresentar resistência a uma ampla gama de

antimicrobianos, além de possuírem mecanismos que viabilizam a sua sobrevivência em períodos/ambientes de estresse[2,7].

Pesquisas constantes com o intuito de verificar a incidência de cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes mostram que[10] o ambiente hospitalar passou a ser um reservatório de cepas resistentes, as quais são responsáveis por infecções hospitalares no mundo todo, e que exigem um alto investimento monetário e com consequências ao hospedeiro devido à toxicidade terapêutica. Foi sugerido[11] que *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA), podem ser isolados de ambientes hospitalares e de trabalhadores da área e são de difícil erradicação e subsidiam o aumento de infecções cruzadas.

As Enterobactérias são bactérias GRAM - negativas que apresentam a forma de bacilo, são isoladas em rotina laboratorial com frequencia[7]. A esse grupo de bactérias pertencem a *Escherichia coli,* bacilos GRAM - negativos fermentadores, as quais estão entre as principais responsáveis por infecções do trato urinário (ITU)[12] e as cepas patogênicas de *Escherichia coli* possuem fimbrias que se aderem à células específicas do intestino[13] sendo um dos agentes etiológicos que aparece regularmente em isolados em casos de diarréia no homem e em diferentes espécies animais, *E. coli* normalmente apresenta cepas comensais no homem, presentes no trato gastrintestinal e não patogênicas[14].

Algumas Enterobactérias fermentadoras, tem apresentado multiresistência a antibióticos, retratando um grave problema de saúde pública mundial, tendo opções terapêuticas reduzidas e alta taxa de mortalidade (30 dias em 40% a 50%). O controle desses agentes patogênicos necessita de ações multidisciplinares, como a detecção de pacientes colonizados, prática de precaução de contato e tratamento apropriado[15].

Superfícies secas e aparentemente limpas, em ambiente hospitalar, podem ser possíveis reservatórios de bactérias, que conseguem manter a capacidade de sobrevivência, através de um estado de bacteriostase (sem multiplicação), sendo capaz de garantir seu potencial patogênico por longos períodos nessa condição[16,17,18].

Os cocos GRAM - positivos e bacilos GRAM - negativos apresentam uma alta capacidade de sobrevivência em superfícies abióticas por longos períodos de tempo, quando dispondo de proteínas derivadas de fluidos biológicos (saliva, sangue e urina)[19]. Esse estudo pode ser corroborado por Rossi e colaboradores[17] que também verificou o aumento da adesão bacteriana à superfícies na presença de fluidos biológicos. Ademais, para manter a viabilidade, as bactérias,

dependem de água, nutrientes e outros fatores para manter suas funções metabólicas[2].

Considerando a relevância da relação da contaminação ambiental por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli e* que podem levar a infecções bacterianas de alta morbidade e mortalidade em ambientes hospitalares, presente trabalho teve como objetivo analisar a capacidade da manutenção da viabilidade desses patógenos em superfícies abióticas com ou sem a influência de fluidos biológicos.

MÉTODOS

A metodologia utilizada nesta pesquisa foi adequada por ROSSI, D; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G., 2008. Utilizou - se as cepas controle: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) que apresenta como características não ser produtora de β-lactamase e *Escherichia coli* (ATCC 35218) que é caracterizada por ser produtora de β-actamase, dados obtidos através do certificado e disponíveis no site da ANVISA.

As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo BHI (Caldo Infusão de cérebro e coração - HIMEDIA) em fase exponencial, centrifugadas por 10 minutos a 2500rpm. O sedimento foi lavado e ressuspendido em salina estéril para obtenção de suspensão bacteriana correspondente ao padrão 1,0 da escala de McFarland ($3{,}0x10^8$ unidades formadoras de colônias/mL). Adicionou-se à suspensão bacteriana, em concentração volumétrica (v/v), sangue, urina, sendo que ambos seriam descartados pelo laboratório de Analises Clinicas, saliva artificial (Manipulação à dose da Salivan, Apsen Farmacêutica, São Paulo, Brasil) e água destilada estéril. Foram utilizados quatro tipos de suportes com área de 3,0 cm² sendo piso cerâmico (LEF Cerâmica modelo 3020, PEI 4, qualidade A, espessura 7,7 mm), fragmento de tecido em fibras de algodão (branco) e em fibras sintéticas (azul) e colchão caixa de ovo (azul, espessura 7 mm). Os suportes foram lavados, esterilizados, contaminados com 20µL dos inóculos e armazenados em placas de Petri fechadas, as quais foram mantidas em temperatura ambiente. A viabilidade bacteriana foi determinada através da imersão de corpos de prova em tubos contendo TSB (Caldo Tripsicaseína de Soja), agitados vagarosamente e incubados a 37ºC por até três dias. Os testes foram realizados em triplicata, 24 horas após a contaminação dos suportes, a cada 7 dias até ausência do crescimento bacteriano nos três campos de prova simultaneamente. Em relação ao número de corpos de prova inoculados no dia zero, foram utilizados aproximadamente 300 corpos para cada material e líquido biológico. Os experimentos foram acompanhados da

suspensão bacteriana, na ausência dos fluidos biológicos, para o controle. Foram realizadas diluições de 100µL do caldo contaminado para 1,0mL de salina estéril, até a diluição 4. Foram inoculados 100µL na placa contendo Ágar Mueller Hinton, e colocados na Estufa a 37ºC por 24h. As leituras foram realizadas através da técnica de contagem padrão em placas para Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com resultados expressos em notação cientifica em UFC/mL.

RESULTADOS

A cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* apresentou, em presença do fluído biológico sangue na superfície tecido algodão, crescimento e viabilidade maiores em tempo e numero de unidade formadora de colônias (Figura 1).

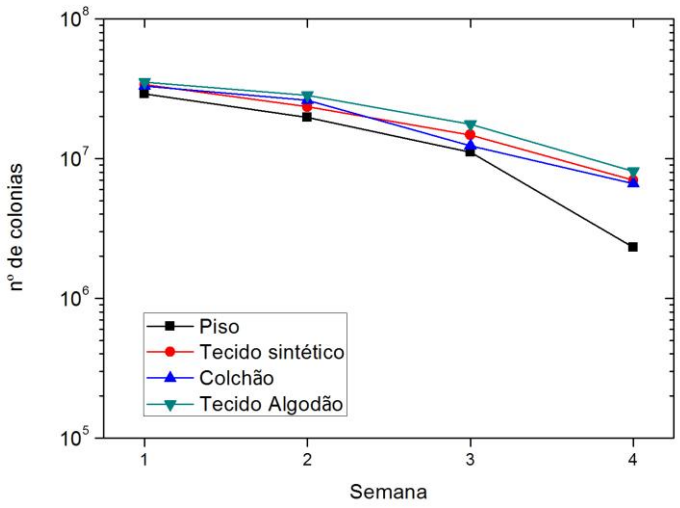


Figura 1. *Staphylococcus aureus* com o fluído biológico sangue.

A superfície piso, manteve a viabilidade, porém com presença de menor número de colônias. As superfícies colchão e tecido sintético mantiveram viabilidade semelhante a das outras, mas com número intermédiário de crescimento de colônias de intermediário. O fluído biológico urina (Figura 2) apresentou viabilidade prolongada, porém com número de colônias menor.

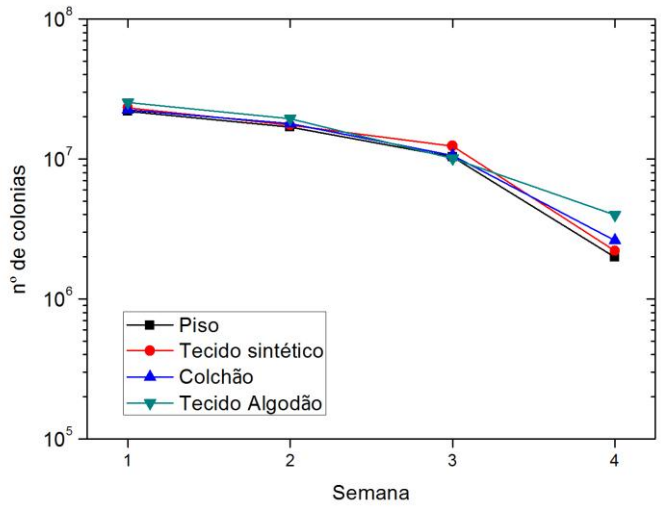


Figura 2: *Staphylococcus aureus* com o fluído biológico urina.

A saliva (Figura 3) assim como a urina, apresentou número de colônias inferior porém com resultados mais próximos ao do fluído sangue.

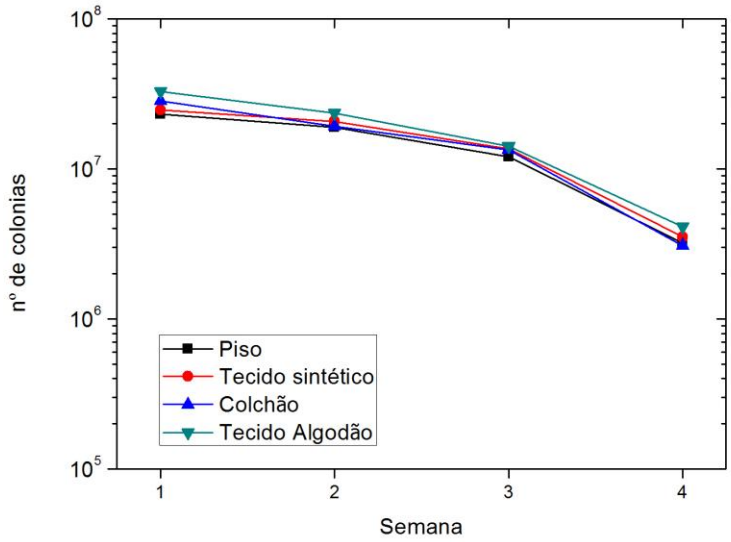


Figura 3: *Staphylococcus aureus* com o flúido biológico saliva.

Na presença de água (Figura 4) o *Staphylococcus aureus* manteve sua viabilidade por mais de 30 dias de estudo, com número menor de crescimento de colônias.

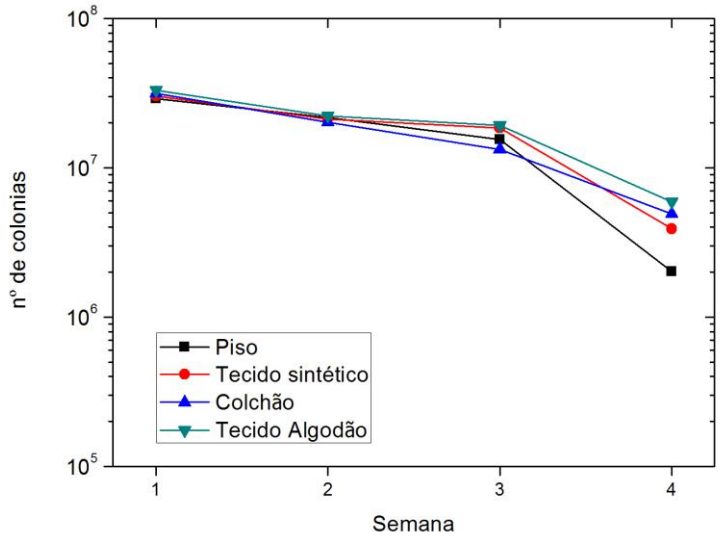


Figura 4. *Staphylococcus aureus* com água.

Staphylococcus aureus, apresentou declínio mínimo de tempo, com viabilidade preservada até o segundo mês de estudo para todos os fluídos e a água, contudo o número de colônias é variável perante a influência de cada fluído e superfície. Já a cepa bacteriana de *Escherichia coli* pesquisada, apresentou declínio acentuado quando comparada a cepa de *Staphylococcus aureus*, tendo o sangue para todas as superfícies como o fluído biológico que permitiu por maior tempo a viabilidade (Figura 5).

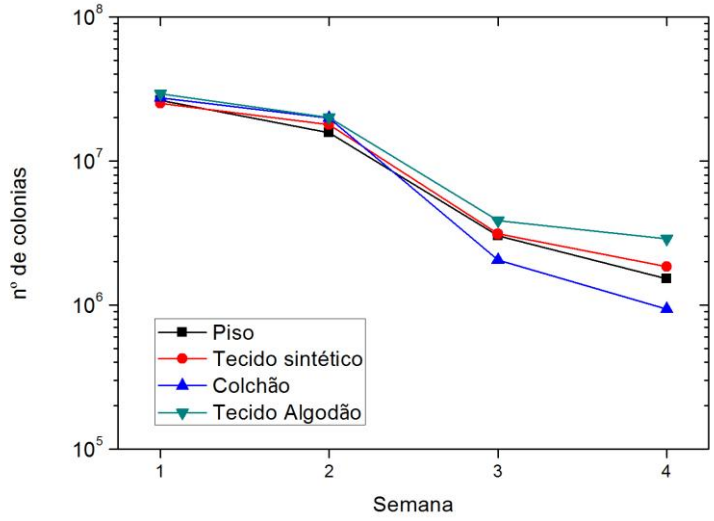


Figura 5. *Escherichia coli* com o fluído biológico sangue

A cepa de *Escherichia coli* acompanhada pelos fluídos, urina e saliva, e ainda a água, teve na quarta semana ausência de crescimento. Com o fluído biológico urina (Figura 6) em superfície tecido sintético, a cepa demonstrou ausência de crescimento na terceira semana.

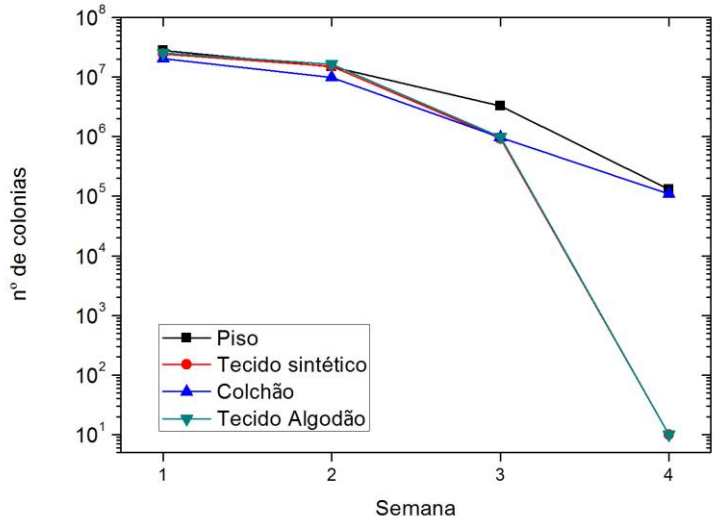


Figura 6. *Escherichia coli* com o fluído biológico urina

Em presença do fluído biológico saliva (Figura 7), exprimiu ausência de crescimento de colônias em piso.

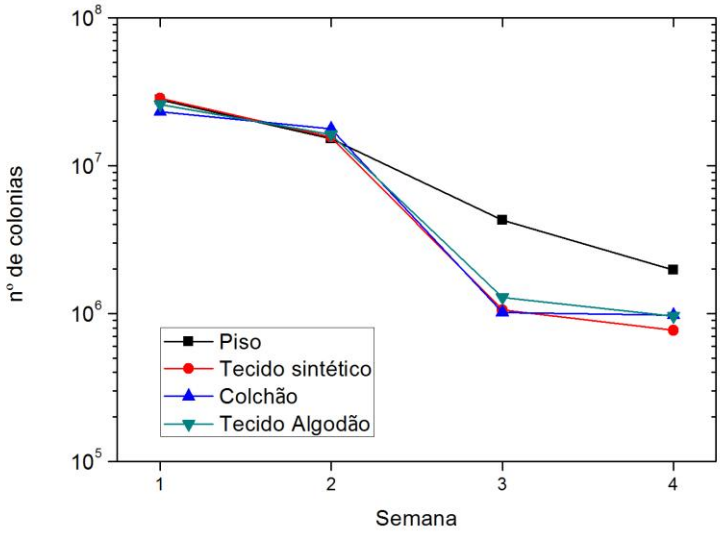


Figura 7. *Escherichia coli* com o fluído biológico saliva.

Em tecido sintético na presença de água (Figura 8) não manifestou crescimento a partir da terceira semana. Em relação a água e ao fluído biológico urina, foi evidenciado crescimento de menor número de colônias.

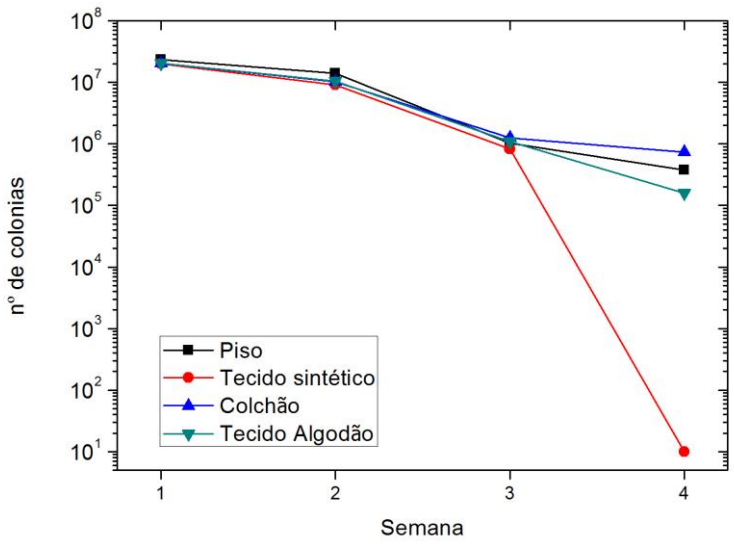


Figura 8: *Escherichia coli* com água

DISCUSSÃO

A facilidade de adaptação e tolerância de microrganismos a ambientes variados sucede principalmente por apresentarem capacidade de dissipação, versatilidade metabólica, tamanho diminuído e a transferência lateral de genes, conferindo condições de adaptação à ambientes inconstantes como o ambiente hospitalar. A análise da viabilidade bacteriana em superfícies abióticas presentes no hospital, contribui para medidas de controle e prevenção dessas infecções associadas aos cuidados em saúde[6]. A viabilidade bacteriana dos microrganismos pesquisados neste estudo apresentou variação de acordo com a superfície e o fluído adicionados. Conforme relatado nos resultados apresentados, o fluído que apresentou maior eficácia na preservação das cepas bacterianas pesquisadas, foi o sangue em todas as superfícies testadas. Esses resultados podem ser corroborados por dados publicados por Rossi e colaboradores[17], que realizaram um estudo sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus* associado a sangue, urina e saliva em superfícies secas. Em seus resultados foi evidenciado que o sangue apresentou maior capacidade de preservação da viabilidade bacteriana. Em tecido algodão houve período maior na manutenção da viabilidade que em tecido sintético, o que pode ser justificado

por ter o tecido algodão maior capacidade de absorção. Neste estudo o *Staphylococcus aureus* manteve a viabilidade em decréscimo lento, expressando elevados resultados mesmo na quarta semana. Em outro estudo de superfícies secas[19], avaliou diversos microrganismos, bactérias GRAM positivas e GRAM negativas, entre elas foram utilizadas cepas controles de *S. aureus* e *E. coli*, e constatou que as bactérias GRAM positivas continuaram viáveis por tempo maior que as GRAM negativas e em presença de fluídos biológicos a viabilidade bacteriana aumentou. No presente trabalho foram observados resultados para as amostras de *Staphylococcus aureu*s similares aos descritos por este pesquisador. *Escherichia coli* foi um dos microrganismos testados em estudo ao qual avaliou - se a sobrevivência de organismos bacterianos em papel no ambiente hospitalar nas superfícies secas sem a presença de fluídos [20] e a cepa de *Escherichia coli* apresentou declínio acentuado conforme demonstrado no presente estudo e diminuiu gradativamente sua viabilidade, tendo o fluído sangue no tecido algodão a mantido por maior tempo. Demonstrando a partir da quarta semana ausência de crescimento em urina e água nas superfícies tecido sintético e algodão. Esses dados são corroborados pelos publicados por Hirai[19] relatando que a cepa de *E. coli* teve diminuição da viabilidade gradualmente. Em estudo sobre o *S. aureus* nas superfícies da UTI, foi ressaltado o potencial que as superfícies inanimadas contaminadas com microrganismos têm em relação a transmissão dos mesmos, levando às infecções associadas aos cuidados em saúde, atentando às medidas preventivas e de controle[6].

CONCLUSÃO

A influência de fluídos biológicos nas superfícies secas do ambiente hospitalar permitiu que microrganismos patogênicos mantivessem sua viabilidade por períodos prolongados, tendo o sangue como o fluído que conservou as bactérias viáveis por períodos prolongados e o tecido algodão como a superfície que concedeu viabilidade em maior tempo.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver qualquer potencial conflito de interesse que possa interferir na imparcialidade deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

1. THOMAZ, S. M.; O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís: Editora União, 1999, p. 147-167.

2. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ªed. São Paulo: Atheneu, 2008.

3. SANTOS, N. Q. A.; Resistência bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar. **Texto & Contexto Enfermagem**. Santa Catarina, v.13, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/tce/v13nspe/v13nspea07.pdf> Acesso: 05 nov. 2013.

4. ROBERTS, R. R. *et al.* The Use of Economic Modeling to Determine the Hospital Costs Associated with Nosocomial Infections. **Clinical Infections Diseases**. Oxford, v. 36, n. 11 jun., 2003.

5. GUIMARÃES, A. C., *et al*. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. **Revista Brasileira de Enfermagem**. Brasília, v.64, n.5, set./out., 2011.

6. FERREIRA, A. M., *et al.* Colchões do tipo caixa de ovo: um reservatório de S*taphylococcus aureus* resistente à meticilina?. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, 2011.

7. Agência Nacional de Vilância Sanitária – ANVISA, **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**, **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**, **Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica**, Brasilia, 2004

8. RODRIGUES, E. A. C. *et al*. Infecções hospitalares: prevenção e controle. Sarvier. São Paulo. 669 p.2003.

9. KONEMAN, E. W., *et al.*; **Diagnóstico Microbiológico texto e atlas colorido**, 5. ed., MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.

10. MENEGOTO, F. R.; PICOLE, S. U.; *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **RBAC: Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, v.39, n.2, 2007.

11. RATTI R. P.; SOUSA, C. P.; *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**. Araraquara, v.30, n.2, 2009.

12. VIEIRA, J. M. S. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza, Belém-PA. **RBAC: Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Rio de Janeiro, V.39, n.2, 2007. Disponível em: <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_39_02/rbac_39_2_07.pdf> Acesso em: 06. nov. 2013.

13. TORTORA, G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L., **Microbiologia**. 8ªed. São Paulo: Artmed, 2005.

14. NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clin. Microbiol. Rev**., v.11, p. 142-201, 1998.

15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; **Nota técnica nº 01/2013, Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Brasília, 2013.

16. JAWAD, A., *et al.*; Influence of Relative Humidity and Suspending Menstrual on Survival of *Acinetobacter* spp. on Dry Surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**. Leeds, v.34, n.12, dez., 1996.

17. ROSSI, D; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; Influência de fluídos biológicos na sobrevivência de *Staphylococcus aureus* sobre diferentes superfícies secas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. Araraquara, v.29, n.2, 2008.

18. OLIVEIRA, A. C; DAMASCENO, Q. S.; Superfícies do ambiente hospitalar como

possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**. São Paulo, v.44, n.4, dez., 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342010000400038&lang=pt> Acesso em: 04 nov. 2013.

19. HIRAI, Y.; Survival of bacteria under dry conditions from a viewpoint of nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**. Japão, v.19, n.3, nov., 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685507> Acesso em: 02. nov. 2013.

20. HUBNER, N.O., *et al.* Survival of Bacterial Pathogens on Paper and Bacterial Retrieval from Paper to Hands: Preliminary Results. Paper medical records can be a source for transmission of bacteria. **AJN *ajnonline.com***, Vol. 111, No. 12, 2011. Acesso em: 03. março. 2014.

Recebido para publicação em 19/08/2014
Revisado em 25/08/2014
Aceito em 28/08/2014