

Impacto do tempo de contaminação por *Escherichia coli* na formação de biofilme em instrumentos cirúrgicos

Impact of the contamination time by Escherichia coli on biofilm formation in surgical instruments

Impacto del tiempo de contaminación por Escherichia coli en la formación de biofilm en instrumentos quirúrgicos

Síntia de Souza Evangelista^I

ORCID: 0000-0002-7175-4286

Simone Gonçalves dos Santos^{II}

ORCID: 0000-0003-3777-853X

Adriana Cristina de Oliveira^{II}

ORCID: 0000-0002-4821-6068

^ISecretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte.
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^{II}Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte,
Minas Gerais, Brasil.

Como citar este artigo:

Evangelista SS, Santos SG, Oliveira AC. Impact of the contamination time by *Escherichia coli* on biofilm formation in surgical instruments. Rev Bras Enferm. 2021;74(3):e20200759. <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0759>

Autor Correspondente:

Síntia de Souza Evangelista
E-mail: sintiaufmg@gmail.com



EDITOR CHEFE: Antonio José de Almeida Filho
EDITOR ASSOCIADO: Álvaro Sousa

Submissão: 07-07-2020

Aprovação: 16-11-2020

RESUMO

Objetivos: avaliar a carga microbiana e a aderência de *Escherichia coli* em diferentes áreas da superfície de instrumento cirúrgico exposto à contaminação experimental ao longo do tempo. **Métodos:** estudo experimental em que fragmentos de pinças crile (serrilha, haste e cremalheira) foram contaminados por imersão em *Tryptic Soy Broth*, contendo 10^6 UFC/mL de *E. coli*, por 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas. A carga microbiana e a aderência bacteriana foram avaliadas com uso de cultura microbiológica e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. **Resultados:** verificou-se aumento da carga microbiana no instrumento cirúrgico, proporcional ao intervalo de contaminação, variando de 10^2 após 1 hora a 10^5 UFC/cm² em 24 horas. A presença de exopolissacarídeo foi detectada após 2 horas de contaminação. **Conclusões:** carga microbiana e aderência de *E. coli* aumentaram ao longo do tempo, atingindo 10^5 UFC/cm² após 24 horas de contaminação, iniciando-se formação de biofilme após 2 horas.

Descritores: Biofilmes; *Escherichia coli*; Instrumentos Cirúrgicos; Segurança do Paciente; Contaminação de Equipamentos.

ABSTRACT

Objectives: to evaluate the microbial load and adherence of *Escherichia coli* in different areas of the surgical instrument surface exposed to experimental contamination over time. **Methods:** experimental study in which fragments of crile forceps (serrated, rod and rack) were contaminated by immersion in *Tryptic Soy Broth*, containing 10^6 CFU/mL of *E. coli*, for 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 hours. Microbial load and bacterial adherence were evaluated using microbiological culture and scanning electron microscopy, respectively. **Results:** there was an increase in the microbial load on the surgical instrument, proportional to the contamination interval, ranging from 10^2 after 1 hour to 10^5 CFU/cm² in 24 hours. The presence of exopolysaccharide was detected after two hours of contamination. **Conclusions:** microbial load and adherence of *E. coli* increased over time, reaching 10^5 CFU/cm² after 24 hours of contamination, starting biofilm formation after two hours.

Descriptors: Biofilms; *Escherichia coli*; Surgical Instruments; Patient Safety; Equipment Contamination.

RESUMEN

Objetivos: evaluar la carga microbiana y adherencia de *Escherichia coli* en diferentes áreas de la superficie de instrumento quirúrgico expuesto a la contaminación experimental a lo largo del tiempo. **Métodos:** estudio experimental en que fragmentos de tenacillas quirúrgicas (sierra, asta y cremallera), contaminados por inmersión en *Tryptic Soy Broth*, conteniendo 10^6 UFC/mL de *E. coli*, por 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. La carga microbiana y la adherencia bacteriana evaluadas con uso de cultivo y microscopia electrónica de barradura, respectivamente. **Resultados:** verificó aumento de la carga microbiana en el instrumento quirúrgico, proporcional al intervalo de contaminación, variando de 10^2 tras 1 hora a 10^5 UFC/cm² en 24 horas. La presencia de polisacárido detectada tras 2 horas de contaminación. **Conclusiones:** carga microbiana y adherencia de *E. coli* aumentaron a lo largo del tiempo, alcanzando 10^5 UFC/cm² tras 24 horas de contaminación, iniciándose formación de biopelícula tras 2 horas.

Descriptorios: Biopelícula; *Escherichia coli*; Instrumentos Quirúrgicos; Seguridad del Paciente; Contaminación de Equipamientos.

INTRODUÇÃO

Anualmente, milhões de cirurgias são realizadas, sendo que esse número vem crescendo⁽¹⁾. Em 2004, estimou-se a realização de cerca de 234,2 milhões de procedimentos cirúrgicos, o que correspondeu a uma cirurgia a cada 25 seres humanos, subindo para 312 milhões em 2012⁽¹⁻²⁾. Apenas no Brasil, o número de procedimentos diagnóstico, clínico, cirúrgico e transplante ultrapassou 12 milhões de intervenções no ano de 2019⁽³⁾. O uso de instrumento estéril para realizar tais procedimentos é condição essencial para uma assistência segura e livre de riscos.

A infecção de sítio cirúrgico é um evento adverso de causa multifatorial, destacando-se o uso do instrumento estéril, livre de contaminação, como um dos fatores que pode contribuir para a maior segurança do procedimento a depender da carga microbiana e da virulência, do tipo de procedimento e da resposta imunológica do paciente⁽⁴⁻⁶⁾.

Por se tratar de produtos para a saúde passíveis de processamento, o instrumento cirúrgico deve ser submetido a um conjunto de ações sequenciais e interdependentes que incluem a limpeza, a secagem, a avaliação da integridade e da funcionalidade, o preparo e a esterilização, a fim de permitir seu reuso seguro⁽⁷⁾. Entre essas ações, a limpeza é apontada como ponto crítico, pois, quando adequadamente realizada, promove remoção de sujidade, visando à redução dos níveis de microrganismos, endotoxinas, proteínas e sangue, condição fundamental para alcance da esterilidade do instrumento cirúrgico após o processamento⁽⁸⁻⁹⁾.

Entre os fatores que podem interferir na qualidade da limpeza, ressalta-se a pré-limpeza. Essa etapa consiste na aplicação de medidas de manutenção de umidificação, redução de exposição à contaminação e transporte precoce, direcionadas ao instrumento cirúrgico desde o ponto de uso até o início da limpeza, na central de material e esterilização⁽⁸⁾. As recomendações apontam para a necessidade de início precoce de sua limpeza, ainda na sala de cirurgia, evitando-se o ressecamento de sangue e secreções, bem como a implantação de um fluxo que garanta o transporte rápido até a unidade de processamento⁽⁶⁻¹¹⁾. Salientam-se, ainda, as características do design, a exemplo da presença de áreas críticas, comuns na maioria dos instrumentos cirúrgicos como articulação, serrilha e cremalheira, mais propensas à retenção de sujidade e, por isso, mais difíceis de serem adequadamente limpas⁽¹⁰⁾.

Seja por não adesão às boas práticas de processamento ou por seu design desafiador, a permanência de microrganismos e de matéria orgânica na superfície do instrumento cirúrgico pode facilitar sua aderência e possibilitar a formação de biofilmes. Estes são definidos como um agregado de células microbianas aderidas a uma superfície irreversivelmente, protegidas por uma matriz de substância polimérica extracelular (*Extracelular Polimeric Substance* - EPS), que atua contribuindo para coesão celular e para o aumento de sua resistência, o que dificulta a sua eliminação⁽¹²⁻¹³⁾. Contudo, poucos estudos abordam os tempos iniciais de formação de biofilmes, sobretudo em instrumento cirúrgico⁽¹⁴⁾.

Assim, em razão da realidade de muitas instituições de saúde, nas quais o processamento do instrumento cirúrgico não pode ocorrer de forma imediata, após o uso, questiona-se: Qual o impacto do tempo de contaminação antes da limpeza em relação

à aderência bacteriana em diferentes áreas da superfície do instrumento cirúrgico?

OBJETIVOS

Avaliar a carga microbiana e a aderência de *Escherichia coli* em diferentes áreas da superfície de instrumento cirúrgico exposto à contaminação experimental ao longo do tempo.

MÉTODOS

Aspectos éticos

Por se tratar de uma pesquisa experimental, em que o objeto de estudo não envolve seres humanos, observando-se a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, tornou-se dispensável a submissão ao Comitê de Ética e Pesquisa.

Desenho, período e local de estudo

Tratou-se de um estudo experimental, conduzido entre julho e dezembro de 2018, no laboratório de microbiologia oral e de anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas e no Centro de Microscopia (CM), ambos na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Amostra

Foram utilizadas pinças cirúrgicas do tipo crile reta (ABC instrumentais cirúrgicos, São Paulo, Brasil), sem uso prévio, fabricadas em aço inoxidável AISI 420, utilizadas com finalidade de preensão da extremidade de vasos seccionados durante o procedimento cirúrgico. Cada instrumento cirúrgico foi seccionado em fragmentos de 1 centímetro, representativos das áreas de serrilha, haste e cremalheira (Figure 1).



Figura 1 – Pinça crile reta (14 cm) e respectivas áreas seccionadas para análise: cremalheira, haste e serrilha

Para cada tempo analisado, foram utilizados três fragmentos, um representativo de cada região escolhida do instrumento cirúrgico, totalizando 21 para cada ensaio. Considerando que a análise microbiológica foi realizada em triplicata biológica e para a análise microscópica foi conduzido mais um ensaio, foram necessários 84 fragmentos para a realização do estudo.

As três áreas foram definidas por apresentarem diferentes desafios ao processo de limpeza: presença de serrilha, ranhuras na cremalheira e superfície lisa na haste.

Protocolo do estudo

O estudo foi conduzido conforme metodologia de referência publicada por Bjerka et al. e Pizzolito et al.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾. Para garantir a esterilidade, os fragmentos foram submetidos à limpeza automatizada em lavadora ultrassônica (USC-2800, Engesolutions®, São Paulo, Brasil) (40 kHz), enxaguados em água destilada, colocados sobre papel absorvente para secagem, empacotados em SMS (*Spunbonded/Meltblow/Spunbonded*) e esterilizados por vapor saturado sob pressão (CS, Primatec, Itu, São Paulo) a 121°C, por 15 minutos.

Para a contaminação, uma amostra de *E. coli* (*American Type Culture Collection* [ATCC] 25922), mantida refrigerada a 80 °C negativos, foi descongelada em capela de fluxo laminar (Veco®, Campinas, Brasil), semeada em placa de petri contendo *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e incubada por 18-24 horas a 37 °C, em estufa bacteriológica (Fanen®, Carandiru, Brasil).

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, em capela de fluxo laminar, retiraram-se três a quatro colônias isoladas dessa cultura, que foram prontamente inoculadas em tubo de ensaio contendo 3 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA), submetidos a homogeneização em agitador de tubo por aproximadamente cinco segundos (Vortex-Genie 2, Daigger®, fisher scientific, Bohemia Estados Unidos). A densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana foi ajustada entre 0,56 e 0,60, por meio de espectrometria (Densi CHECK Plus, BioMerieux Inc[™], Marcy-l'Étoile, França), a um comprimento de onda de 580 nanômetros (DO580), resultando em uma concentração de aproximadamente 1,5×10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Uma micropipeta (Gilson[™], França) foi usada para alíquotar e transferir uma amostra de 50 µL da suspensão bacteriana preparada para frascos, contendo 5 mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Difco[®]) e resultando em uma solução com 10⁶ UFC/mL. Para simular a contaminação, os três fragmentos da pinça esterilizados (serrilha, haste e cremalheira) foram transferidos a esses frascos com o auxílio de uma pinça estéril.

Optou-se por esse microrganismo por se tratar de um dos principais patógenos causadores das infecções intra-hospitalares e, dentre elas, as infecções de sítio cirúrgico⁽¹⁷⁻¹⁸⁾, além de sua reconhecida capacidade de formar biofilmes⁽¹²⁾. Os frascos foram rosqueados e incubados a 37 °C, sob agitação constante de 100 rpm em agitador orbital I10-O+ACOPE (Ovan®, Barcelona, Spain), por 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas.

Após os respectivos tempos de incubação, cada frasco foi removido do equipamento. Em cabine de fluxo laminar (Veco®, Campinas, Brasil), os fragmentos contidos neles foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada, depositados em um frasco estéril e, então, submetidos à enxágue, por seis vezes, com 3 mL de água destilada, utilizando-se um pipetador automático (K1A1D, Kasvi®, Brasil) para a remoção das células planctônicas. Os frascos foram homogeneizados manualmente, por meio de cinco movimentos circulares; e a solução, descartada. Cada fragmento

foi transferido, separadamente, para um tubo de polipropileno esterilizado (Eppi[™]; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). A análise dos fragmentos foi realizada por meio de cultura microbiológica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para análise microbiológica, em capela de fluxo laminar e com o auxílio de uma micropipeta, foi acrescentado 1,1 mL de água miliQ ao tubo contendo o fragmento. Em seguida, esses frascos foram vedados e submetidos à sonicação, por cinco ciclos de um minuto, com intervalo de um minuto entre eles, em disruptor de células (frequência de 40 kHz) (Unique®, Indaiatuba, Brasil) e, finalmente, expostos à homogeneização em agitador tipo vortex por um minuto. Após diluição seriada até a concentração de 10⁻⁴ em capela de fluxo laminar, uma alíquota de 50 µL foi semeada em placa de petri, em duplicata, sobre *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco[®]), para o cultivo e quantificação de UFC/mL. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Fanen®, Carandiru, Brasil) a 37°C, em atmosfera ambiente por 24 horas; e o número de colônias foi quantificado manualmente e convertido em UFC/cm² do fragmento analisado. Os ensaios foram conduzidos em triplicata biológica.

Os fragmentos destinados à MEV foram depositados em um tubo de polipropileno esterilizado em capela de fluxo laminar e imersos em 2 mL de solução de 2,5% de glutaraldeído a 0,2 M por 24 horas, a 4 °C. Posteriormente, com o auxílio de uma micropipeta, a solução de glutaraldeído foi descartada e substituída por água destilada, 2 mL, por duas vezes, a fim de promover o enxágue desses fragmentos. Estes foram então transferidos a um tubo contendo 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, suficiente para cobrir toda a amostra, e acondicionados em temperatura entre 2 °C e 8 °C até seu transporte ao CM-UFGM.

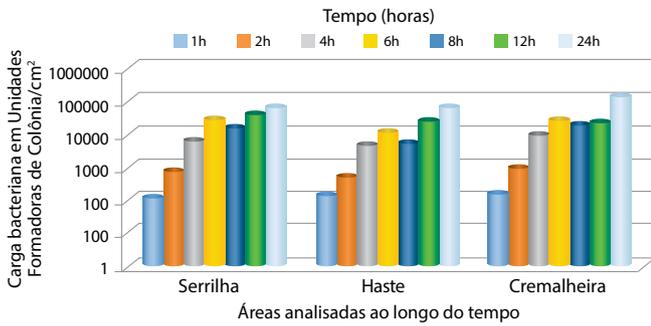
No centro de microscopia, as amostras foram submetidas à fixação secundária, desidratação, secagem até o ponto crítico de CO₂, montagem em *stubs* e metalização, conforme o protocolo do serviço. As amostras foram levadas ao microscópio, e selecionaram-se, no mínimo, cinco regiões ao longo do fragmento, para a verificação da aderência bacteriana.

Análise dos resultados

Realizou-se a contagem de UFC recuperadas dos fragmentos, em meio de cultura. A média dos valores representativos de uma alíquota de 50 µL, resultante da duplicata, foi calculada e convertida, para se obter o número de UFC presente na solução total de recuperação (1.100 µL). Obteve-se, então, o valor para cada fragmento avaliado em UFC/cm², após padronização, conforme as respectivas áreas: haste (8,4 cm²), serrilha (8 cm²) e cremalheira (7,4 cm²). Posteriormente, as médias das triplicatas foram obtidas; os dados, convertidos em log₁₀ e analisados por meio do uso do programa Excel[®] versão 16.0.

RESULTADOS

A recuperação da carga bacteriana dos fragmentos de instrumento cirúrgico (serrilha, haste e cremalheira) submetidos à contaminação bacteriana pela amostra de referência *E. coli* ATCC 25922, nos intervalos de 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas, estão apresentados na Figura 2.



Nota: cm – centímetros; h – horas.

Figura 2 – Carga bacteriana em unidades formadoras de colônias (UFC)/cm², recuperada de fragmentos de instrumento cirúrgico, após diferentes intervalos de contaminação experimental por *Escherichia coli*, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2018

Os dados demonstram a elevação da carga bacteriana ao longo dos tempos analisados. Após a primeira hora de contaminação, foi possível observar a recuperação de *E. coli* em todos os fragmentos analisados, sendo obtida uma contagem em torno de 10² UFC/cm². Essa mesma carga foi mantida até o tempo de 2 horas.

No tempo de 4 horas, detectou-se o aumento da carga bacteriana em uma escala logarítmica, passando os fragmentos a exibirem uma média de 10³ UFC/cm². O mesmo aconteceu no intervalo seguinte, quando as cargas bacterianas atingiram 10⁴ UFC/cm², com 6 horas, sendo essa média mantida até o tempo de 8 horas, exceto para o fragmento de haste, no qual houve uma redução ao valor médio de 10³ UFC/cm².

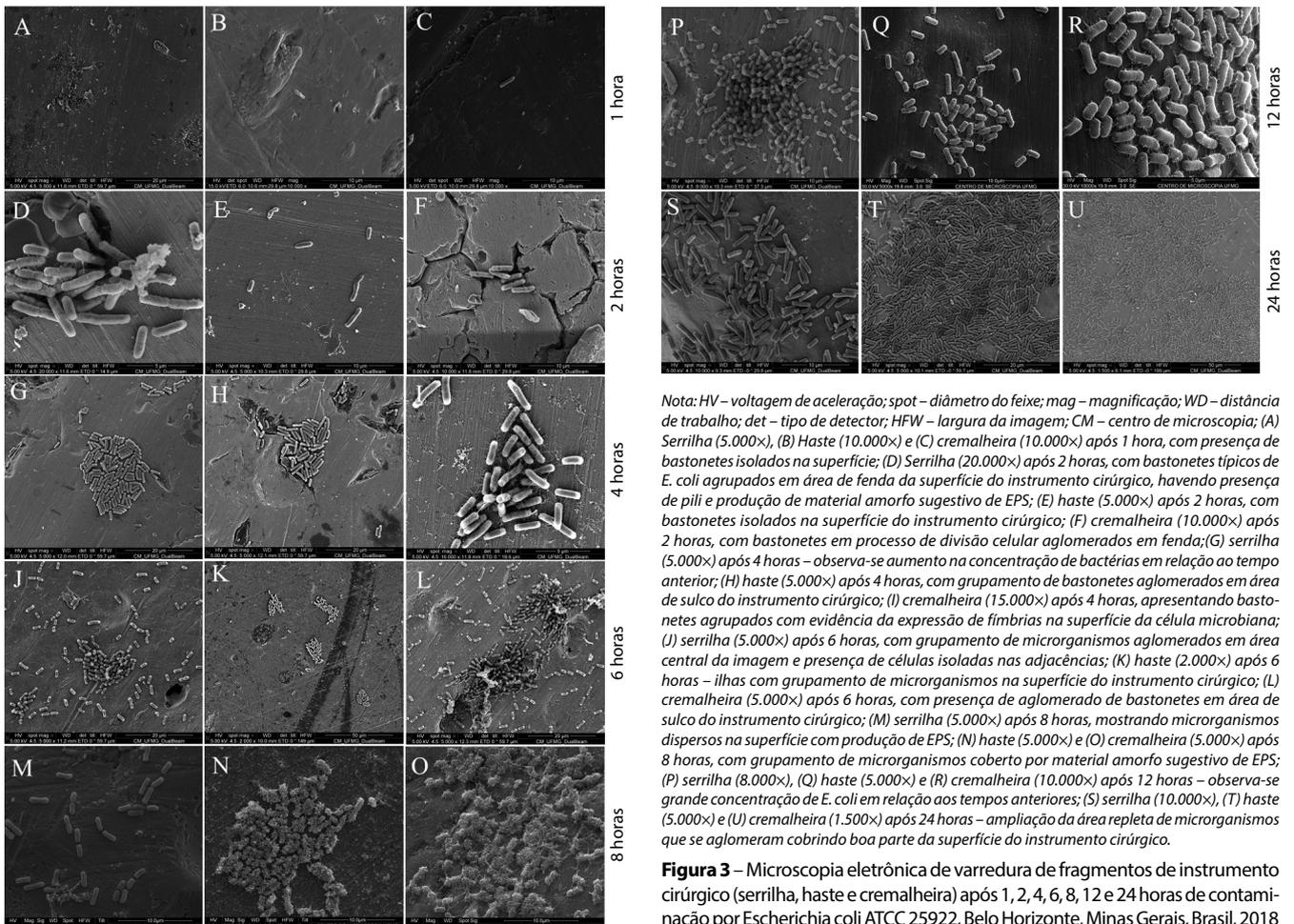
Após 12 horas, houve elevação de carga bacteriana nos fragmentos avaliados, sendo essa variação mais pronunciada no fragmento de haste, cuja carga atingiu 10⁴ UFC/cm². No intervalo de 24 horas uma carga bacteriana de 10⁴ UFC/cm² foi mantida para as áreas de haste e serrilha, enquanto, na cremalheira, foi recuperada uma média de 10⁵ UFC/cm².

Quando se comparou as três diferentes áreas analisadas, notou-se que a carga bacteriana foi semelhante nos três fragmentos analisados ao longo do tempo, no entanto a haste apresentou as menores cargas microbianas entre o tempo de 2 e 8 horas, enquanto a cremalheira foi a região com maior carga microbiana ao longo do tempo, exceto no tempo de 12 horas. Ainda, ressalta-se que os valores médios recuperados na serrilha foram próximos aos observados na cremalheira.

Por meio de MEV, os fragmentos foram analisados quanto à sua estrutura, a fim de determinar a aderência bacteriana e a formação de biofilme ao longo do tempo (Fig. 3). As imagens selecionadas referem-se às áreas dos fragmentos em que foi identificada maior aderência bacteriana e/ou estrutura sugestiva da formação de EPS.

Após 1 hora, na área de serrilha (Fig. 3A), haste (Fig. 3B) e cremalheira (Fig. 3C), observou-se a aderência de bastonetes dispersos na superfície do instrumento, morfologia típica de *E. coli*.

No tempo de 2 horas, observou-se, em região de serrilha (Fig. 3D), bastonetes, agrupados em área de fenda identificada na superfície do instrumento cirúrgico, com presença de pili e produção de material amorfo, esbranquiçado, sugestivo de



Nota: HV – voltagem de aceleração; spot – diâmetro do feixe; mag – magnificação; WD – distância de trabalho; det – tipo de detector; HFW – largura da imagem; CM – centro de microscopia; (A) Serrilha (5.000x), (B) Haste (10.000x) e (C) cremalheira (10.000x) após 1 hora, com presença de bastonetes isolados na superfície; (D) Serrilha (20.000x) após 2 horas, com bastonetes típicos de *E. coli* agrupados em área de fenda da superfície do instrumento cirúrgico, havendo presença de pili e produção de material amorfo sugestivo de EPS; (E) haste (5.000x) após 2 horas, com bastonetes isolados na superfície do instrumento cirúrgico; (F) cremalheira (10.000x) após 2 horas, com bastonetes em processo de divisão celular aglomerados em fenda; (G) serrilha (5.000x) após 4 horas – observa-se aumento na concentração de bactérias em relação ao tempo anterior; (H) haste (5.000x) após 4 horas, com agrupamento de bastonetes aglomerados em área de sulco do instrumento cirúrgico; (I) cremalheira (15.000x) após 4 horas, apresentando bastonetes agrupados com evidência da expressão de fimbrias na superfície da célula microbiana; (J) serrilha (5.000x) após 6 horas, com agrupamento de microrganismos aglomerados em área central da imagem e presença de células isoladas nas adjacências; (K) haste (2.000x) após 6 horas – ilhas com agrupamento de microrganismos na superfície do instrumento cirúrgico; (L) cremalheira (5.000x) após 6 horas, com presença de aglomerado de bastonetes em área de sulco do instrumento cirúrgico; (M) serrilha (5.000x) após 8 horas, mostrando microrganismos dispersos na superfície com produção de EPS; (N) haste (5.000x) e (O) cremalheira (5.000x) após 8 horas, com agrupamento de microrganismos coberto por material amorfo sugestivo de EPS; (P) serrilha (8.000x), (Q) haste (5.000x) e (R) cremalheira (10.000x) após 12 horas – observa-se grande concentração de *E. coli* em relação aos tempos anteriores; (S) serrilha (10.000x), (T) haste (5.000x) e (U) cremalheira (1.500x) após 24 horas – ampliação da área repleta de microrganismos que se aglomeram cobrindo boa parte da superfície do instrumento cirúrgico.

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumento cirúrgico (serrilha, haste e cremalheira) após 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas de contaminação por *Escherichia coli* ATCC 25922, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2018

EPS. Nesse período, em área da haste (Fig. 3E), identificaram-se bastonetes dispostos de forma isolada, enquanto na cremalheira (Fig. 3F), notam-se bastonetes em processo de divisão celular, aglomerados em região de fenda.

Um acréscimo na concentração de microrganismos foi observado após 4 horas em relação ao tempo anterior nos fragmentos de serrilha (Fig. 3G), haste (Fig. 3H) e cremalheira (Fig. 3I). Na área de haste, é possível observar sua presença em sulcos da estrutura do instrumento cirúrgico; e, na cremalheira, evidencia-se a expressão de pili na superfície da célula bacteriana.

Na serrilha (Fig. 3J), após 6 horas, identificou-se um grupamento de microrganismos aglomerados em área central da imagem e presença de células isoladas nas adjacências. No fragmento de haste (Fig. 3K), pôde-se observar grupamento de microrganismos na superfície do instrumento cirúrgico. Na cremalheira (Fig. 3L), a presença de bastonetes concentrados em área de sulco foi verificada.

No tempo de 8 horas, em serrilha (Fig. 3M), microrganismos dispersos na superfície foram visualizados, evidenciando-se a produção de EPS. De forma semelhante, as áreas de haste (Fig. 3N) e cremalheira (Fig. 3O) apresentaram grupamento de bastonetes cobertos por material amorfo sugestivo de EPS.

Em relação aos tempos anteriores, destaca-se que, após 12 horas de contato com o microrganismo, serrilha (Fig. 3P), haste (Fig. 3Q) e cremalheira (Fig. 3R) apresentaram uma grande concentração de *E. coli*, a qual evoluiu em 24 horas para uma superfície repleta de microrganismos como observado em serrilha (Fig. 3S), haste (Fig. 3T) e cremalheira (Fig. 3U).

Apesar de se tratar de instrumento cirúrgico novo, durante a realização das imagens, chamou atenção a presença de alterações estruturais tipo fendas, facilmente observadas nos fragmentos de serrilha (1, 2 e 6 horas), cremalheira (2 e 6 horas) e haste (4 horas).

DISCUSSÃO

A qualidade da limpeza do instrumento cirúrgico é de fundamental importância para que possam ser reutilizados de forma segura. O início precoce desse procedimento é amplamente defendido nas principais *guidelines* de processamento⁽⁶⁻¹⁰⁾, contudo, muitas vezes, não representa a realidade de diversas instituições hospitalares, onde esses instrumentos são mantidos, por períodos prolongados, em contato com contaminantes provenientes do ato cirúrgico, tais como do sítio operatório, da microbiota da pele do paciente ou da equipe durante a manipulação. Nesse sentido, demonstrou-se, experimentalmente, que um período de contato de 1 hora foi suficiente para promover uma carga bacteriana média de até 10^2 UFC/cm² na superfície de instrumento cirúrgico mantido em contato com *E. coli*.

O aumento do tempo de contato levou à elevação da carga microbiana, atingindo 10^3 UFC/cm² após 4 horas, 10^4 UFC/cm² em 6 horas e 10^5 UFC/cm² após 24 horas. Resultados similares foram descritos em instrumento cirúrgico também experimentalmente contaminado por *E. coli*, no qual a carga microbiana, nas primeiras 12 horas de incubação, variou entre 10^2 UFC/cm² e 10^4 UFC/cm², atingindo 10^6 UFC/cm² em 24 horas⁽¹⁹⁻²¹⁾.

Como observado, a demora no início do processamento permitiu o alcance de níveis de carga microbiana acima dos esperados (10^5 UFC/cm²) para o instrumento cirúrgico após 24 horas. Estudos que avaliaram a recuperação de microrganismos

na superfície de instrumento cirúrgico após o uso verificaram níveis de contaminação em torno de 10^2 , podendo atingir até 10^4 UFC/instrumento, a depender do sítio abordado⁽²¹⁻²³⁾. Nessas publicações, no entanto, a carga microbiana foi analisada em condições ideais de processamento, ou seja, logo após o procedimento cirúrgico, podendo ter sido subestimada quanto ao tempo real em que normalmente são processadas.

Quando se compararam as três diferentes áreas, para o mesmo tempo analisado, constatou-se que fragmentos de serrilha e cremalheira apresentaram em geral carga microbiana superior àquela recuperada em haste. Esse achado pode ser justificado pelas irregularidades presentes na superfície dos fragmentos de serrilha e cremalheira tanto macroscópica quanto microscopicamente. O design do instrumento cirúrgico pode atuar dificultando a remoção de sujidade durante a etapa de limpeza⁽²⁴⁾. Em produtos para a saúde contendo articulações, serrilhas, lúmen ou com superfície irregular processados por diversas vezes, ao longo de sua vida útil, analisados após esterilização, verificou-se a presença de proteínas em níveis até 100 vezes acima do recomendado, além da presença de biofilmes⁽²⁵⁾. Portanto, além de acumularem maior carga bacteriana, essas áreas apresentam, ainda, maior desafio à sua remoção durante o processamento.

De forma complementar à análise da carga bacteriana, as imagens produzidas por meio MEV permitiram a identificação da evolução ao longo do tempo da aderência microbiana ao instrumento cirúrgico. Após 1 hora de contato com o contaminante, a presença de bactérias aderidas à superfície pôde ser verificada. O processo de aderência ocorre, inicialmente, por meio de interações fracas com a superfície resultantes de um equilíbrio entre as forças atrativas e repulsivas. No caso da *E. coli*, a expressão de flagelo auxilia na motilidade ativa desse microrganismo, facilitando sua aproximação⁽¹⁴⁾. Esse processo é influenciado por características do microrganismo (espécie, concentração, presença de apêndices celulares e carga elétrica), da superfície (composição química, rugosidade e carga elétrica) e do meio circundante (temperatura, disponibilidade de nutrientes como sangue, proteínas e secreções corporais, pH e condições de fluxo)⁽¹¹⁾.

Nessa etapa inicial da aderência microbiana, pode haver um aumento de até dez vezes na resistência à sua remoção comparativamente à forma planctônica da célula⁽²⁶⁾, contudo, em geral, ainda podem ser facilmente removidas por meio de limpeza. O contato do instrumento cirúrgico seja com o sítio cirúrgico, seja com microbiota da pele do paciente ou da equipe durante a manipulação são fatores que podem favorecer a aderência microbiana, ressaltando-se, assim, a importância da remoção de sujidade precocemente, mesmo ao longo do procedimento cirúrgico, removendo-se a sujidade grosseira, visível⁽⁷⁻⁹⁾.

Posteriormente, a atuação de mecanismos como a formação de pili ou fímbrias e a expressão de proteínas de adesão promovem uma aderência forte por interações moleculares específicas conhecidas como "irreversíveis"⁽¹³⁻¹⁴⁾. Essa fase foi observada no tempo de 2 horas, no fragmento de serrilha, quando se nota a presença de pequenas estruturas capilares que emergem da superfície bacteriana, auxiliando na ancoragem das células à superfície do instrumento cirúrgico. Após a fixação inicial da célula microbiana à superfície, a aderência pode se tornar forte em cerca de segundos ou minutos⁽²⁷⁾.

Uma vez imobilizados ao substrato, inicia-se a multiplicação na superfície de contato com a formação de uma monocamada de microrganismos, agrupados como microcolônias em um processo contínuo de maturação do biofilme⁽¹⁴⁾. Nesse período, a coesão celular e a aderência célula-célula são mantidas, principalmente, pela produção de EPS, atuação de pili e síntese de adesinas⁽²⁷⁾. No presente estudo, a formação de EPS pode ser identificada após 2 horas de contato com contaminante.

Percebe-se, dessa forma, que um longo tempo de espera antes do processamento pode levar à inefetividade dos protocolos rotineiramente utilizados, uma vez que aumentam os desafios do processo de limpeza, tanto no tocante à remoção de uma elevada carga microbiana quanto no que se refere à força de coesão das células arranjadas na superfície do material. Então, nota-se que, além da recomendação de início precoce da limpeza do instrumento cirúrgico, é fundamental seu transporte imediato⁽⁷⁻⁹⁾, em até 2 horas, para início do processamento na central de material e esterilização, a fim de se alcançar a limpeza efetiva e, por sua vez, a segurança do paciente cirúrgico. Em estudo que avaliou instrumentos cirúrgicos ortopédicos experimentalmente contaminados por fragmentos ósseos e microrganismos, observou-se que um período prolongado de contaminação antes do processamento (180 minutos) resultou na recuperação de bactérias, mesmo após esterilização a vapor saturado sob pressão⁽²⁸⁾.

Ainda, ressalta-se que apenas a redução dos níveis de microrganismos não é suficiente para garantir a limpeza do instrumento cirúrgico, sendo utilizada a avaliação de outros componentes como a presença de proteínas⁽²²⁾. Quando não removida durante a limpeza, a matéria orgânica residual pode atuar como uma barreira física, protegendo microrganismos presos no seu interior do contato com o agente esterilizante, podendo ainda compor um filme condicionante formado pela adsorção de moléculas como proteínas, lipídios e polissacarídeos resultantes da precipitação de fluidos corporais à superfície do instrumento cirúrgico, facilitando a aderência microbiana^(11,27). Na prática, a presença de sangue durante o procedimento cirúrgico pode favorecer a multiplicação bacteriana uma vez que pode ser utilizada como fonte de nutrição⁽¹¹⁾.

Assim, considerando que não se incluiu, neste experimento, nenhum tipo de matéria orgânica, como sangue de carneiro, em geral utilizado em experimentos similares, pode-se inferir que, embora a formação de EPS tenha ocorrido em intervalo de 2 horas, esse período poderia ter sido inferior. O acréscimo de 5% de sangue durante a contaminação experimental de instrumentos cirúrgicos pode aumentar a concentração de proteína adsorvida à superfície do instrumento cirúrgico em até 10 vezes⁽²⁹⁾. Assim, se pensarmos na prática, quando, durante a contaminação, temos a presença de microrganismos, sangue, além de outras sujidades, a aderência pode ocorrer ainda de forma mais rápida que a observada.

Práticas como o uso de álcool na superfície do instrumento cirúrgico durante a pré-limpeza, apesar de relacionar-se à redução na carga microbiana, podem aumentar a adsorção de proteínas, especialmente na presença de sangue, reduzindo a capacidade de removê-los na limpeza em até 60%⁽²⁹⁻³⁰⁾. Dessa forma, apesar da sua reconhecida ação bactericida, é provável que o uso do álcool atue sobre a matéria orgânica promovendo desidratação e aumentando sua resistência mecânica, podendo facilitar a sua

fixação e a formação de biofilme. Essa situação é particularmente problemática em instrumentos contaminados por proteína priônica, relacionada à transmissão da doença de Creutzfeldt-Jacob, que não é inativada durante a esterilização.

A manutenção da umidificação, nessa etapa, tem mostrado um papel relevante à qualidade do processamento de produtos para a saúde, por auxiliar na prevenção da aderência de sujidade ao instrumento cirúrgico⁽³¹⁻³²⁾, sobretudo naqueles casos em que estes não são transportados imediatamente após o uso. Trinta minutos de ressecamento são suficientes para dificultar a remoção da sujidade aderida à superfície do instrumento cirúrgico⁽³¹⁾. No entanto, mesmo sob umidificação, o transporte até a central de material e esterilização deve ser priorizado, uma vez que instrumentos contaminados mantidos imersos em água, mesmo por tempo prolongado, apresentam aumento de carga microbiana^(20-21,29).

O desafio da limpeza do instrumento cirúrgico pode ainda ser afetado pela presença de alterações na sua microestrutura, observadas neste estudo durante a realização do MEV. A presença dessas fissuras pode contribuir para abrigar microrganismos, atuando como sítios potenciais para a aderência bacteriana ou retenção de sujidade durante o uso clínico e refletindo na qualidade da limpeza do instrumento cirúrgico, sobretudo quando submetidos à limpeza manual, visto que as cerdas das escovas dificilmente alcançarão esses locais⁽²⁴⁾.

Assim, a preocupação com a limpeza se justifica por tratar-se da principal fase do processamento de produtos para a saúde, evidenciado pelo risco de fixação dos microrganismos em função do intervalo para sua efetiva remoção. Protocolos rígidos que visem minimizar esse período entre o uso do instrumento cirúrgico e seu processamento podem impactar, positivamente, na redução de diversos fatores que dificultam seu processamento. O início precoce da limpeza durante o uso na mesa cirúrgica, com a retirada de sujidade grosseira do instrumento cirúrgico por compressas estéreis umidificadas, e o transporte imediato à central de material e esterilização após o uso⁽⁶⁻¹¹⁾ podem contribuir, fortemente, para mitigar o risco relacionado ao ressecamento da matéria orgânica na sua superfície — quando ocorre esse ressecamento, dificulta-se sua remoção e pode-se contribuir para a proliferação de microrganismos bem como para a ocorrência do biofilme.

Limitações do estudo

Uma limitação do presente estudo foi a utilização de apenas um microrganismo no experimento, não sendo possível uma análise da potencial formação do biofilme polimicrobiano, ou seja, formado por mais de um tipo de microrganismo. Ainda, destaca-se que a análise pela técnica de microscopia não permite a varredura de toda a superfície do instrumento cirúrgico, em decorrência de sua extensão, sendo padronizada a avaliação de, no mínimo, cinco áreas ao longo do fragmento.

Contribuições para a Área da Enfermagem

O presente estudo contribui de forma relevante com forte evidência científica para ressaltar a importância e a relevância da atuação da enfermagem na prática de processamento de

produtos para a saúde. Registra-se o intervalo precoce de aderência bacteriana e formação de biofilme no instrumento cirúrgico, permitindo a visualização desse processo microscópico e seu desenvolvimento; ademais, se esclarece como é possível e o quanto é importante interromper sua formação ainda em etapas iniciais, ressaltando o fato de que o processamento começa já durante o ato cirúrgico.

CONCLUSÕES

A qualidade do processamento de produtos para a saúde reutilizáveis tem reflexos diretos na assistência prestada e na garantia da segurança do paciente. A limpeza, dentro do conjunto de etapas necessárias para o reúso seguro de instrumentos cirúrgicos, é um processo extremamente complexo e envolve fatores diversos, como seu design, rotinas dos serviços e fator humano.

A análise microbiológica demonstrou que instrumentos cirúrgicos que permanecem em contato com contaminantes apresentam, ao longo do tempo, elevação dos níveis de carga microbiana e maior aderência bacteriana à sua superfície, o que pode impactar a efetividade da sua limpeza e aumentar o desafio à eficácia do processo de esterilização, sobretudo quando se

associa à formação de biofilme. Como observado, a aderência microbiana ao instrumento cirúrgico ocorre rapidamente, o que demonstra a importância da pré-limpeza seguida do transporte imediato para processamento, enfatizando, assim, a necessidade tanto de investimento em boas práticas de cuidado com o material, ainda ao longo do seu uso na mesa cirúrgica, quanto da adesão dos profissionais a essas recomendações. Um desafio adicional à etapa de limpeza pode estar na presença de danos estruturais no instrumento cirúrgico, os quais podem servir como reservatório e, então, dificultar o processamento seguro desses produtos.

FOMENTO

Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (<http://microscopia.ufmg.br>) pelos equipamentos disponibilizados e suporte técnico durante os experimentos relacionados a microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

1. Weiser TG, Haynes AB, Molina G, Lipsitz SR, Esquivel MM, Uribe-Leitz T, et al. Estimate of the global volume of surgery in 2012: an assessment supporting improved health outcomes. *Lancet* 2015;385(Suppl 2):S11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60806-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60806-6)
2. Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, Haynes AB, Lipsitz SR, Berry WR, et al. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet* 2008;372(9633):139-44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60878-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60878-8)
3. Ministério da Saúde (BR). Procedimentos hospitalares do SUS: por local de internação. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2019
4. Berríos-Torres SI, Umscheid CA, Bratzler DW, Leas B, Stone EC, Kelz RR, et al. Centers for disease control and prevention guideline for the prevention of surgical site infection. *JAMA Surg*. 2017;152(8):784-91. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.0904>
5. World Health Organization (WHO). Decontamination and reprocessing of medical devices for health-care facilities [Internet]. Switzerland: WHO; 2016[cited 2019 Oct 2]. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250232/1/9789241549851-eng.pdf?ua=1>
6. Dancer SJ, Stewart M, Coulombe C, Gregori A, Viridi M. Surgical site infections linked to contaminated surgical instruments. *J Hosp Infect*. 2012;81(4):231-8. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.04.023>
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 15, de 15 de março de 2012. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para a saúde e dá outras providências [Internet]. Diário Oficial da União Brasília. 2012 [cited 2019 Oct 2]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0015_15_03_2012.html
8. Caston-Gaa A, Ruparelia CS. Module 6. Processing surgical instruments and medical device. In: Curless MS, Ruparelia CS, Thompson E, Trexler PA, (Eds.). *Infection prevention and control: reference manual for health care facilities with limited resources*. Baltimore (MD): Jhpiego; 2018
9. Association of perioperative registered nurses (AORN). *Guidelines for perioperative practice*. Denver, CO: AORN; 2017
10. Instrument Reprocessing Working Group. *Reprocessing of instruments to retain value*. 11. ed. Gütersloh: Instrument Reprocessing Working Group; 2017
11. Roberts CG. The role of biofilms in reprocessing medical devices. *Am J Infect Control*. 2013;41(Suppl 5):S77-80. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.008>
12. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Sataffan K. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563-75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
13. Ripa R, Shen AQ, Funari R. Detecting *Escherichia coli* biofilm development stages on gold and titanium by quartz crystal microbalance. *ACS Omega* 2020;5(5):2295-302. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03540>
14. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol*. 2016;121(2):309-19. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
15. Pizzolitto EL, Pizzolitto AC, Pozetti GL. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. *Braz J Microbiol*. 2001;32(4):340-4. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400017>

16. Bjerkan G, Witsø E, Bergh K. Sonication is superior to scraping for retrieval of bacteria in biofilm on titanium and steel surfaces in vitro. *Acta Orthop.* 2009;80(2):245–50. <https://doi.org/10.3109/17453670902947457>
17. Saravanakumar R, Devi BMP. Surgical site infection in a tertiary care centre, an overview: a cross sectional study. *Int J Surg Open.* 2019;21:12-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijso.2019.09.008>
18. Alexiou K, Drikos I, Terzopoulo M, Sikalias N, Ioannidis A, Economou N. A prospective randomised trial of isolated pathogens of surgical site infections (SSI). *Ann Med Surg.* 2017;21:25-29. <https://doi.org/10.1016/j.jamsu.2017.07.045>
19. Li XL, Ji GY. Evaluation of the direct relationship between bacterial load on contaminated stainless steel surgical instruments and the holding time prior to disinfection and also to analyse the efficacy of different disinfecting solutions. *Biomed Res*[Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 12];28(10):4680-7. Available from: <https://www.alliedacademies.org/articles/evaluation-of-the-direct-relationship-between-bacterial-load-on-contaminated-stainless-steel-surgical-instruments-and-the-holding-.pdf>
20. Mohite ST, Ashok KY, Mahesh RS, Madhavendra K. Effect of holding time on the bacterial load of surgical instruments. *J Evol Med Dent Sci.* 2016;5(16):763-5. <https://doi.org/10.14260/jemds/2016/177>
21. Percin D, Sav H, Hormet-Oz HT, Karauz M. The relationship between holding time and the bacterial load on surgical instruments. *Indian J Surg.* 2015;77(1):16-8. <https://doi.org/10.1007%2Fs12262-012-0725-z>
22. Cloutman-Green E, Canales M, Zhou Q, Ciric L, Hartley JC, McDonnell G. Biochemical and microbial contamination of surgical devices: a quantitative analysis. *Am J Infect Control.* 2015;43(6):659-61. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.02.017>
23. Evangelista SS, Santos SG, Stoianoff MAR, Oliveira AC. Analysis of microbial load on surgical instruments after clinical use and following manual and automated cleaning. *Am J Infect Control.* 2015;43(5):522-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.12.018>
24. Evangelista SS, Guimaraes NR, Garcia NB, Santos SG, Oliveira AC. Effectiveness of manual versus automated cleaning on *Staphylococcus epidermidis* biofilm removal from the surface of surgical instruments. *Am J Infect Control.* 2020;48(3):267-74. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.08.024>
25. Costa DM, Lopes LKO, Tipple AFV, Johani K, Hu H, Deva AK, et al. Evaluation of stainless steel surgical instruments subjected to multiple use/processing. *Infect Dis Health* 2018;23(1):3–9. <https://doi.org/10.1016/j.idh.2017.08.004>
26. Otter JA, Vickery K, Walker JT, Pulcini ED, Stoodley P, Goldenberg SD, et al. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J Hosp Infect.* 2015;89(1):16-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008>
27. Kimkes TEP, Heinemann M. How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS Microbiol Rev.* 2020;44(1):106–22. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz029>
28. Smith K, Araoye I, Gilbert S, Waites K, Camins B, Conklin M, et al. Is retained bone debris in cannulated orthopedic instruments sterile after autoclaving? *Am J Infect Control.* 2018;46(9):1009-13. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2018.02.024>
29. Costa DMD, Lopes LKO, Hu H, Tipple AFV, Vickery K. Alcohol fixation of bacteria to surgical instruments increases cleaning difficulty and may contribute to sterilization inefficacy. *Am J Infect Control.* 2017;45(8):e81-e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.04.286>
30. Prior F, Fernie K, Renfrew A, Heneaghan G. Alcoholic fixation of blood to surgical instruments: a possible factor in the surgical transmission of CJD? *J Hosp Infect.* 2004;58(1):78-80. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.04.020>
31. Lipscomb IP, Pinchin H, Collin R, Keevil CW. Effect of drying time, ambient temperature and pre-soaks on prion-infected tissue contamination levels on surgical stainless steel: concerns over prolonged transportation of instruments from theatre to central sterile service departments. *J Hosp Infect.* 2007;65(1):72-7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.09.025>
32. Secker TJ, Hervé R, Keevil CW. Adsorption of prion and tissue proteins to surgical stainless steel surfaces and the efficacy of decontamination following dry and wet storage conditions. *J Hosp Infect.* 2011;78(4):251-5. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.03.021>