

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Enfermagem
Programa de Pós-Graduação em Enfermagem

SÍNTIA DE SOUZA EVANGELISTA

**EFICÁCIA DA LIMPEZA MANUAL VERSUS AUTOMATIZADA PARA A
REMOÇÃO DE *Staphylococcus epidermidis* ADERIDO À SUPERFÍCIE DE
INSTRUMENTAL CIRÚRGICO EM DIFERENTES INTERVALOS POR
CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2019

SÍNTIA DE SOUZA EVANGELISTA

**EFICÁCIA DA LIMPEZA MANUAL VERSUS AUTOMATIZADA PARA A
REMOÇÃO DE *Staphylococcus epidermidis* ADERIDO À SUPERFÍCIE DE
INSTRUMENTAL CIRÚRGICO EM DIFERENTES INTERVALOS POR
CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Enfermagem.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia, políticas e práticas de saúde das populações.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana C. de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Simone G. dos Santos

Belo Horizonte

2019

EV92e Evangelista, Sintia de Souza.
Eficácia da limpeza manual versus automatizada para a remoção de Staphylococcus epidermidis aderido à superfície de instrumental cirúrgico em diferentes intervalos por contaminação experimental [manuscrito]. / Sintia de Souza Evangelista. -- Belo Horizonte: 2019.
119f.: il.
Orientador (a): Adriana Cristina de Oliveira.
Coorientador (a): Simone Goncalves dos Santos.
Área de concentração: Saúde e Enfermagem.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem.

1. Biofilmes. 2. Infecção Hospitalar. 3. Instrumentos Cirúrgicos. 4. Segurança do Paciente. 5. Infecção da Ferida Cirúrgica. 6. Dissertação Acadêmica. I. Oliveira, Adriana Cristina de. II. Santos, Simone Goncalves dos. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem. IV. Título.

NLM: WO 162

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

Este estudo é parte de uma pesquisa do Núcleo de Estudos e Pesquisa em Infecções Relacionadas ao Cuidar em Saúde (NEPIRCS/CNPq) da Escola de Enfermagem da UFMG. Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – Processo -APQ-02025-15.

Bolsa de Iniciação Científica concedida pela FAPEMIG.

Escola de Enfermagem da UFMG
Colegiado de Pós-Graduação em Enfermagem
Av. Alfredo Balena, 190 | 30130-100
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil
+ 55 31 3409-9836 | 31 3409-9889
caixa postal: 1556 | colpgrad@enf.ufmg.br

25
III anos
1994 - 2019

enfermagem
pós-graduação • UFMG

UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

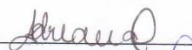
ATA DE NÚMERO 148 (CENTO E QUARENTA E OITO) DA SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DA TESE APRESENTADA PELA CANDIDATA SÍNTIA DE SOUZA EVANGELISTA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM ENFERMAGEM.

Aos 15 (quinze) dias do mês de outubro de dois mil e dezenove, às 08:00 horas, realizou-se no Anfiteatro da Pós-Graduação- 432 da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, a sessão pública para apresentação e defesa da tese "*EFICÁCIA DA LIMPEZA MANUAL VERSUS AUTOMATIZADA PARA A REMOÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS ADERIDOS A SUPERFÍCIE DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO EM DIFERENTES INTERVALOS POR CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL*", da aluna *Síntia de Souza Evangelista*, candidata ao título de "Doutora em Enfermagem", linha de pesquisa "Promoção da Saúde, Prevenção e Controle de Agravos". A Comissão Examinadora foi constituída pelas seguintes professoras doutoras: Adriana Cristina de Oliveira (orientadora), Isabel Yovana Quispe Mendoza, Juliana de Oliveira Marcatto, Maria Helena Barbosa e Thabata Coaglio Lucas, sob a presidência da primeira. Abrindo a sessão, a Senhora Presidente da Comissão, após dar conhecimento aos presentes do teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do seguinte resultado final:

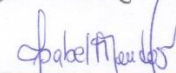
APROVADA;
 REPROVADA.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Senhora Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, eu, Patrícia Prata Salgado, Servidora do Colegiado de Pós-Graduação da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, lavrei a presente Ata, que depois de lida e aprovada será assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 15 de outubro de 2019.

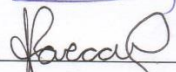
Prof^ª. Dr^ª. Adriana Cristina de Oliveira
Orientadora (Esc.Enf/UFMG)



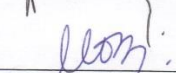
Prof^ª. Dr^ª. Isabel Yovana Quispe Mendoza
(EEUFMG)



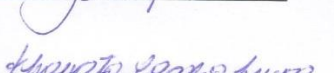
Prof^ª. Dr^ª. Juliana de Oliveira Marcatto
(EEUFMG)



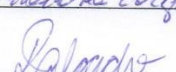
Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Barbosa
(UFTM)




Prof^ª. Dr^ª. Thabata Coaglio Lucas
(UFVJM)



Patrícia Prata Salgado
Servidora do Colegiado de Pós-Graduação



HOMOLOGADO em reunião do CPG
em 04.10.19


Prof.ª. Dra. Kénia Lara Siqueira
Coordenadora do Colegiado de Pós-Graduação em Enfermagem
Escola de Enfermagem da UFMG

DEDICO

A Deus, pela oportunidade de vir a este mundo e fazer do cuidado ao próximo minha profissão.

À minha mãe, Berenice, que me apoiou em mais um projeto. A você, toda a minha admiração e o meu respeito.

Ao meu marido, Tadeu, com quem decidi compartilhar a minha vida e que esteve ao meu lado nesta longa jornada acadêmica.

Ao meu filho Heitor, que me fez conhecer o amor mais profundo no meio deste percurso. Obrigada por ter me escolhido para ser sua mãe. Com você aprendo um pouco a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar minha vida e de minha família e que está sempre me amparando ao longo dos caminhos que escolho trilhar.

À professora Dra. Adriana Cristina de Oliveira, pela oportunidade de realizar este trabalho, aprendizado e disponibilidade.

À minha coorientadora, professora Dra. Simone Santos por nos oferecer o laboratório de microbiologia e pelas valiosas contribuições na condução do trabalho.

Ao meu marido, Tadeu Vinícius, por estar ao meu lado, pelo apoio e confiança.

À minha mãe, Berenice Evangelista, por me acolher em todos os momentos de que precisei. Sua ajuda foi fundamental, mãe. Obrigada pelo amor, dedicação e abnegação que tem sustentado nossa família até aqui.

Aos meus irmãos que Sérgio e Silma que estão sempre dispostos a me ajudar com o pequenino. À Silma também pela ajuda durante a análise deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa NEPIRCS pela oportunidade de convivência, trocas e amizade. Ainda que não estejamos muito próximas fisicamente, sei que posso recorrer a qualquer uma de vocês quando precisar. Tenho uma consideração profunda por todos.

À equipe do laboratório de microbiologia oral e anaeróbios, sobretudo, aos professores Luiz, Paula e Natália. Natalia, você é uma pessoa muito especial. Obrigada pela ajuda com os experimentos, pelas discussões intermináveis, pelas 'dicas', pela amizade e parceria. Você é iluminada. Espero que eu possa retribuir um dia toda a ajuda.

Ao Bergiliano que não mediu esforços para atender a minhas demandas na fase inicial do projeto. Agradeço pela oportunidade de convivência e pela amizade.

Ao Breno, do centro de microscopia da UFMG pela disponibilidade e cordialidade durante as sessões de microscopia.

Aos meus sogros, Lourdinha e Geraldo, pelo apoio com palavras e no cuidado com o Heitor. Sei que vocês estavam torcendo por mim.

Às alunas de iniciação científica, Ana Clara e Débora, pela colaboração na execução dos experimentos.

À SMSA de Belo Horizonte pelo apoio. Aos meus colegas de trabalho do Centro de Saúde Conjunto Santa Maria, que tanto me apoiaram nesta caminhada.

RESUMO

Ao longo de sua vida útil, instrumentais cirúrgicos são submetidos a sucessivos ciclos de contaminação e processamento. A presença em áreas de difícil acesso, como serrilha e cremalheira, assim como a adoção de práticas inadequadas, durante a pré-limpeza e a limpeza, pode dificultar a remoção de resíduos a cada reuso, favorecendo a formação de biofilme. Amplamente isolados como contaminantes de instrumentais cirúrgicos, após o uso, *Staphylococcus epidermidis* são reconhecidos pela sua capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies. Neste sentido, questiona-se: *como os métodos de limpeza manual e automatizada atuam na remoção de S. epidermidis aderido à superfície de instrumental cirúrgico submetido à contaminação experimental por diferentes intervalos?* Objetivou-se comparar dois protocolos de limpeza, manual e automatizada, quanto à capacidade de remoção de *S. epidermidis* da superfície de instrumental cirúrgico submetido a diferentes intervalos de contaminação. Tratou-se de uma pesquisa experimental, realizada no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG) e no centro de microscopia da UFMG. Foram selecionadas pinças do tipo crile reta, para a análise de áreas com diferentes desafios ao processo de limpeza: superfície irregular (serrilha e cremalheira) e lisa (haste). Os corpos de prova foram contaminados por imersão em *Tryptical Soya Broth* (TSB), contendo 10^6 UFC/mL de uma amostra clínica de *S. epidermidis*. A aderência bacteriana, logo após a contaminação e a capacidade de remoção desses microrganismos, submetidos à limpeza manual ou automatizada, foram verificadas depois de uma, duas, quatro, seis, oito e 12 horas. Os resultados foram avaliados por meio de cultura microbiológica e pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise dos resultados ocorreu pelo emprego de técnicas de estatística descritiva e análise de variância (ANOVA) em nível de confiança de 5%. No grupo submetido à contaminação, a carga bacteriana apresentou aumento, ao longo do tempo, variando entre 10^1 – 10^2 UFC/cm² após uma hora e 10^4 UFC/cm² em 12 horas. Verificou-se aderência bacteriana, depois de uma hora, com a formação de biofilme após duas horas e, em geral, um aumento na concentração de microrganismos nos tempos subsequentes. A carga microbiana foi reduzida em 1-2 log₁₀ após limpeza manual e entre 1-3 log₁₀ depois de limpeza automatizada, sendo significativa ($p < 0,05$) em todos os fragmentos e tempos avaliados neste último grupo. A análise, por meio de MEV, demonstrou a permanência de biofilme após ambos os métodos. Em geral, fragmentos de haste apresentaram menor carga microbiana, nos diferentes grupos avaliados, sendo essa diferença significativa ($p < 0,05$) ao tempo de seis horas. Concluiu-se que *S. epidermidis* apresentou a capacidade de aderência rápida levando à formação de biofilme após duas horas de contato com o instrumental cirúrgico com carga bacteriana de 10^2 UFC/cm². A limpeza automatizada foi mais efetiva que a limpeza manual, contudo nenhum dos métodos removeu o biofilme formado completamente. As condições de pré-limpeza, bem como a presença em áreas de difícil acesso, como cremalheira e serrilha, são fatores críticos à qualidade do processamento de instrumentais cirúrgicos.

Palavras-chave: Biofilme. Infecção hospitalar. Instrumentais cirúrgicos. Segurança do paciente. Infecção da ferida operatória.

ABSTRACT

Surgical instruments are subjected to successive contamination and processing cycles throughout their useful life. The presence of areas of difficult access, such as serration and rack, as well as the adoption of improper practices during pre-cleaning and cleaning, can make it difficult to remove residues after each use, favoring the formation of biofilm. Widely isolated as contaminants of surgical instruments after use, *Staphylococcus epidermidis* are recognized for their ability to form biofilm on different surfaces. In this sense, the question is: how the manual and automated cleaning methods perform on the removal of *S. epidermidis* adhered to the surface of surgical instruments submitted to experimental contamination for different intervals? We aimed at comparing two cleaning protocols, manual and automated, regarding their capacity for removing *S. epidermidis* from the surface of surgical instruments submitted to different intervals of contamination. This was an experimental research conducted at the Oral and Anaerobic Microbiology Laboratory, ICB/UFMG and at the UFMG microscopy center. Straight crile tweezers were selected to analyze areas with different challenges to the cleaning process: uneven (serrated and rack) and smooth (rod) surface. The specimens were contaminated by immersion in Triptical Soya Broth (TSB), containing 10^6 CFU/mL of a clinical sample of *S. epidermidis*. The bacterial adherence and the removal capacity of these microorganisms, submitted to manual or automated cleaning, were verified after one, two, four, six, eight, and 12 hours. Results were evaluated by microbiological culture and scanning electron microscopy (SEM). The results were analyzed using descriptive statistics and analysis of variance (ANOVA) techniques at a level of 5% confidence. In the group subjected to contamination, the bacterial load increased over time, ranging from 10^1 – 10^2 CFU/cm² after one hour to 10^4 CFU/cm² within 12 hours. Bacterial adherence was observed after one hour, with the formation of biofilm after two hours, and, in general, an increase in the concentration of microorganisms at subsequent times. The microbial load was reduced by 1-2 log₁₀ after manual cleaning and between 1-3 log₁₀ after automated cleaning and was considered significant ($p < 0.05$) in all fragments and times evaluated in the last group. SEM analysis showed the permanence of biofilm after using both methods. In general, rod fragments presented lower microbial load during the evaluation period in the different groups evaluated, and this difference ($p < 0.05$) was significant at six hours. In conclusion, the *S. epidermidis* presented fast adherence capacity and biofilm formation after two hours of contact with the surgical instruments with bacterial load of 10^2 CFU/cm². The automated cleaning was more effective than manual cleaning. However, neither method completely removed the biofilm formed. Pre-cleaning conditions, as well as the presence of difficult access areas, such as serration and rack, are critical factors in the processing quality of surgical instruments.

Keywords: Biofilm. Hospital infection. Surgical instruments. Patient safety. Infection of the surgical wound.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estágios de formação do biofilme: 1) aderência inicial e formação de microcolônias, 2) maturação e 3) dispersão. 49
- Figura 2** - Pinça crile reta (14 cm) e respectivas áreas seccionadas para análise. 59
- Figura 3** - Fluxograma das etapas da coleta de dados. 61
- Figura 4** - A. Agitador orbital (Ovan, I10-O+ACOP.E) com controle de temperatura. B- Cabine de fluxo laminar (Veco®). 62
- Figura 5** - Lavadora ultrassônica (Unique®)..... 64
- Figura 6** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos utilizados como controle negativo. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 2019. 70
- Figura 7** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após uma hora de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 71
- Figura 8** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após duas horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 72
- Figura 9** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após quatro horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 72
- Figura 10** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após seis horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 73
- Figura 11** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após oito horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 73
- Figura 12** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após 12 horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 74
- Figura 13** - Média de carga bacteriana em unidades formadoras de colônia (UFC) por cm² recuperados em fragmentos de instrumentais cirúrgicos (serrilha, haste e cremalheira), em diferentes intervalos

(horas), no grupo submetido à limpeza manual e limpeza automatizada, em relação ao grupo submetido à contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	76
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após uma e duas horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	77
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após quatro horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	78
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após seis horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	78
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após oito horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	79
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após 12 horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	79
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após uma e duas horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	80
Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após quatro horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	80
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após seis horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	81
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após oito horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	81

- Figura 23** - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após 12 horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019. 82
- Figura 24** - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de instrumentais cirúrgicos novos, evidenciando a presença de dano estrutural na sua superfície. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019. 83
- Figura 25** - Carga bacteriana recuperada dos fragmentos de serrilha, haste e cremalheira, em UFC/cm², em diferentes tempos de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019. 84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Média de carga bacteriana, em unidades formadoras de colônias (UFC)/cm², recuperada em instrumental cirúrgico após contaminação por *Staphylococcus epidermidis*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 70
- Tabela 2** - Média de carga bacteriana, em unidade formadora de colônia (UFC) por cm², recuperada em instrumentais cirúrgicos após limpeza manual e automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMI	Association for the Advancement of Medical Instrumentation
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AORN	Association of periOperative Registered Nurses
CM	Centro de Microscopia
CME	Central de Material e Esterilização
EPS	Exopolissacarídeo ou <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IRAS	Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde
ISC	Infecção de Sítio Cirúrgico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOA	Microbiologia Oral e Anaeróbios
PPS	Produtos Para a Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SCN	<i>Staphylooccus Coagulase Negativa</i>
TSA	<i>Triptical Soya Agar</i>
TSB	<i>Triptical Soya Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo geral	22
1.1.2	Objetivos específicos	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	A ETAPA DE LIMPEZA NO PROCESSAMENTO DE INSTRUMENTAIS CIRÚRGICOS.....	23
2.1.1	Limpeza no ponto de uso	24
2.1.2	Limpeza na central de material e esterilização (CME)	27
2.1.2.1	<i>Produtos de limpeza utilizados no processamento de instrumentais cirúrgicos</i>	28
2.1.2.2	<i>Qualidade da água no processamento de instrumentais cirúrgicos</i>	32
2.1.2.3	<i>Tipos de limpeza utilizados no processamento de instrumentais cirúrgicos</i>	35
2.1.2.4	<i>Monitoramento da etapa de limpeza</i>	42
2.2	FORMAÇÃO DE BIOFILME	48
2.2.1	Biofilme como um desafio para o processamento de instrumentais cirúrgicos	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	58
3.2	LOCAL DE ESTUDO	58
3.3	MATERIAL DE ESTUDO	58
3.3.1	Corpo de prova	58
3.3.2	Microrganismo utilizado	60
3.3.3	Protocolo do experimento – Modelo <i>in vitro</i>	60
3.3.3.1	<i>Métodos de análise</i>	64
3.4	VARIÁVEIS DO ESTUDO	66
3.5	ANÁLISE DE DADOS	68
3.6	ASPECTOS ÉTICOS.....	68
4	RESULTADOS	69
4.1	RECUPERAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM FRAGMENTOS DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO (SERRILHA, HASTE, CREMALHEIRA) SUBMETIDOS À CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.....	69
4.2	COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE LIMPEZA: MANUAL X AUTOMATIZADA.....	74
4.3	COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA E REMOÇÃO DE MICRORGANISMOS ENTRE AS DIFERENTES ÁREAS DO INSTRUMENTAL.....	83

5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÃO.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	APÊNDICE A - Carga Microbiana em UFC/50µl de <i>Staphylococcus epidermidis</i>. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.	110
	APÊNDICE B - Análise Comparativa entre as médias de carga bacteriana (Log₁₀ UFC/ CM²), nos grupos contaminação, em relação à limpeza manual e automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.....	111
	ANEXO A - Laudo Identificação do Microrganismo (D12).....	112
	ANEXO B - Protocolo da Microscopia	115

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, milhões de procedimentos cirúrgicos são realizados no mundo, sendo este volume crescente ao longo do tempo (ABBOTT *et al.*, 2017). A OMS, em 2004, analisando dados de 56 países, estimou que ocorra um procedimento a cada 25 seres humanos, o que corresponde a 234,2 milhões de cirurgias de grande porte por ano (WEISER *et al.*, 2008). Apenas no Brasil, no ano de 2018, a soma do número de procedimentos, como diagnóstico, clínico, cirúrgicos e de transplante, totalizou mais de 11 milhões intervenções (BRASIL, 2018).

O uso de instrumentais estéreis, durante esses procedimentos, é essencial para a prestação de assistência de forma segura, sendo incluído como um dos itens de verificação do *check list* de cirurgia segura pela sua importância (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Quando contaminados, aumentam a probabilidade de transferência de microrganismos, para o sítio cirúrgico, podendo causar infecção, a depender da carga microbiana e virulência, tipo de procedimento a ser realizado (invasivo ou não), o sítio corporal abordado e da resposta imunológica do paciente (MANGRAM *et al.*, 1999; WHO, 2009, 2016a).

Por se tratar de produtos passíveis de processamento, instrumentais cirúrgicos devem ser produzidos em matéria-prima de alta resistência (INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; WHO, 2016b), atendendo a especificações de fabricação, de acordo com as normas internacionais de qualidade (NBR ISO 7153-1/ 2006 ou a DIN – *Deutsches Institut fur Normung*), assim, tendo uma vida útil de até 10 anos (SPRY, 2007). Nesse período, os instrumentais serão submetidos a sucessivos ciclos de contaminação e processamento, cuja qualidade determina não só sua durabilidade, como também a segurança dos procedimentos e, sobretudo, do paciente durante seu reuso. Não há um tempo definido, para que esses instrumentais sejam descartados, permitindo-se seu uso até que percam a funcionalidade (BRASIL, 2012a).

O processamento consiste em um procedimento validado, utilizado para se tornar um Produto para a Saúde (PPS), que foi previamente utilizado ou contaminado, adequado para um próximo reuso (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015; WHO, 2016a). É composto por um conjunto de ações sequenciais e interdependentes que incluem a pré-limpeza, limpeza, secagem, avaliação da integridade e

funcionalidade, preparo, esterilização, armazenamento e distribuição dos produtos às unidades consumidoras (BRASIL, 2012a).

A finalidade desse processo é assegurar que o produto esteja esterilizado e adequado para o uso, evitando a transmissão potencial de microrganismos e garantindo a segurança do paciente durante e após o procedimento cirúrgico (BRASIL, 2012a; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; RUTALA; WEBER; HICPAC, 2019; WHO, 2016a).

Entre as etapas do processamento, a limpeza é apontada como ponto crítico, pois, quando adequadamente realizada, previne o ressecamento e promove a remoção de sujidade orgânica e inorgânica visando à redução dos níveis de microrganismos, endotoxinas, proteínas e sangue, durante o ciclo e ao longo da vida útil do instrumental (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; FDA, 2015, 2018; SOBECC NACIONAL, 2017). A remoção desses contaminantes é condição primordial ao alcance da esterilidade do instrumental cirúrgico, a fim de se permitir seu reuso seguro (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; WHO, 2016a). Nesse sentido, destaca-se a importância do início precoce da remoção de resíduos, assim como o papel da pré-limpeza no ponto de uso na qualidade do processamento de instrumentais cirúrgicos (ASSOCIATION OF PERIOPERATIVE REGISTERED NURSES, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; FDA, 2015; LIPSCOMB *et al.*, 2007; WHO, 2016a).

A pré-limpeza tem início na mesa operatória e engloba procedimentos voltados para a remoção da sujidade visível dos instrumentais, durante o ato cirúrgico, o enxágue em água corrente e a manutenção da umidificação (FDA, 2015). Essas ações previnem o ressecamento de matéria orgânica na superfície do instrumental, sendo primordial à prevenção da aderência de sujidade no tempo compreendido entre o uso e o início da limpeza na Central de Material e Esterilização (CME) - (FDA, 2015; GOLDBERG, 2010; LIPSCOMB *et al.*, 2007; RUTALA; WEBER; HICPAC, 2019; SOBECC NACIONAL, 2017). Assume-se que esse procedimento seja fundamental àqueles instrumentais que não são transportados prontamente até a CME, após o seu uso (SHEITOYAN-PESANT *et al.*, 2017; VICKERY *et al.*, 2009; VICKERY; PAJKOS; COSSART, 2004).

Entre os fatores que podem interferir na qualidade da limpeza, merece destaque ainda, o *design* do instrumental (INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017). A sua conformação determina a possibilidade de acesso às diferentes regiões do PPS, durante a remoção de resíduos, visto que alguns deles

podem possuir áreas críticas de difícil alcance (ALFA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019). Mesmo instrumentais cirúrgicos, classificados como não complexos, podem apresentar áreas com diferentes desafios à etapa de limpeza, como a presença de articulações, serrilha e cremalheira. Essas regiões são mais propensas à retenção de sujidade e devem receber maior atenção durante o processamento.

A limpeza é executada na CME pela combinação do uso de produtos químicos (detergentes) e aplicação de ação mecânica por um tempo e em temperatura adequados (WHO, 2016a). O procedimento deve alcançar toda a superfície do produto (interna ou externa), a fim de torná-lo seguro, para o reuso e manuseio pelo profissional de saúde até o seu completo processamento (BRASIL, 2012a; CASTONGA; RUPARELIA, 2018; WHO, 2016a, 2016b). Dessa forma, dois métodos podem ser utilizados, durante a limpeza: o manual e/ou o automatizado (ALFA, 2013; BRASIL, 2012a; FDA, 2015).

A limpeza manual é realizada pela imersão do instrumental em solução, contendo água e detergente, em concentração e tempo adequados, seguida de escovação da superfície externa e canais, quando presentes e do enxágue em água de osmose reversa ou destilada (AORN, 2017; ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION, 2007; BRASIL, 2009; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016b). O método manual é indicado, na limpeza de produtos delicados, complexos ou que não podem ser submetidos à limpeza automatizada, pela natureza do instrumental (BRASIL, 2012a). Contudo, ainda que possua indicações específicas, a limpeza manual deve ser utilizada, de forma geral, como complementar à limpeza automatizada (BRASIL, 2012a).

O método automatizado, por sua vez, é realizado com auxílio de equipamentos, como lavadoras termodesinfectoras e/ou ultrassônicas que removem a sujidade, por meio de detergentes específicos associados a jatos de água ou propagação de ondas sonoras em meio líquido. Essa é apontada como o método que apresenta maior efetividade, em comparação ao método manual, pelo menor risco de falhas humanas durante a escovação, acesso direto aos canais e possibilidade de validação (ALFA *et al.*, 2006; ALFA; OLSON; AL-FADHALY, 2010; AORN, 2017; SOBECC NACIONAL, 2013; SOUTHWORTH, 2014).

No Brasil, a RDC 15/2012 exige, em PPS de conformação complexa, ou seja, que apresentem lúmen inferior a cinco milímetros, fundo cego ou espaço interno

inacessível para a fricção direta, reentrâncias ou válvulas, a utilização de limpeza automatizada, em lavadora ultrassônica, sempre precedida de limpeza manual (BRASIL, 2012a). No entanto a realidade de muitas unidades de processamento, tanto em relação à disponibilidade de recursos quanto de área física, torna inviável a aquisição e utilização de equipamentos automatizados, o que faz com que apenas a limpeza manual seja utilizada (FAST *et al.*, 2017; FDA, 2015; MENDONÇA *et al.*, 2017; WHO, 2016b).

Uma limpeza efetiva exige o uso de um protocolo adequado que promova a redução da carga de microrganismos e que atue sobre diferentes tipos de sujidade (minerais, lipídeos, hemoglobina, proteínas, carboidratos, aminoácidos), presente nos instrumentais, após o uso. A presença de matéria orgânica, na superfície de instrumentais cirúrgicos, pode facilitar a aderência à microbiana e a formação de biofilme de diferentes formas: atuando como nutriente, protegendo fisicamente o microrganismo da ação do agente esterilizante, ou ainda, na composição de um filme condicionante, por meio de sua adsorção ao aço inoxidável (LINDSAY; VON HOLY, 2006; ROBERTS, 2013). Este último processo altera as características da superfície do instrumental e facilita a aderência de bactérias colonizantes (BOARI *et al.*, 2009; ROBERTS, 2013).

Os biofilmes são definidos como um agregado de células microbianas que se encontram aderidas irreversivelmente a uma superfície, protegidas por uma matriz de substância polimérica extracelular (*Extracellular Polymeric Substance - EPS*), produzida pelos próprios microrganismos, por meio de alterações na expressão gênica e de circuitos regulatórios durante as etapas do seu desenvolvimento (DONLAN, 2001b; LAZAR, 2011; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). O EPS promove a estabilidade mecânica do biofilme, ao interconectar suas células, contribuindo para a coesão celular (FLEMMING; WINGENDER, 2010) e para o aumento da resistência à ação de agentes saneantes, o que dificulta a sua eliminação (LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Essa maior resistência observada no biofilme independe do perfil de susceptibilidade dos microrganismos na sua forma planctônica (OTTER *et al.*, 2015).

Diversos microrganismos podem formar biofilmes, entre eles, *Staphylococcus epidermidis*, pertencente à família do grupo dos *Staphylococcus coagulase negativa* (VUONG *et al.*, 2003). Colonizante normal da pele e mucosas, *S. epidermidis* tem sido evidenciado como um patógeno oportunista em hospitais,

causando infecções, em determinado grupo de pacientes como idosos, portadores de multipatologias e imunocomprometidos (BECKER; HEILMANN;PETERS, 2014). No contexto das Infecções Relacionadas à assistência à Saúde (IRAS), têm sido relatado como importante agente causal de infecções de corrente sanguínea (ICS) (ALLEGIANZI *et al.*, 2011; COOPER *et al.*, 2018; HIDRON *et al.*, 2008) e naquelas relacionadas a dispositivos médicos implantados (BECKER; HEILMANN;PETERS, 2014).

S. epidermidis destaca-se como um dos microrganismos mais relevantes na formação de biofilme em PPS (SOBECC NACIONAL, 2017), podendo seu processo de aderência e multiplicação, na superfície de biomateriais, ser iniciado em minutos (GOTTENBOS; VAN DER MEI; BUSSCHER, 2000). Sua presença, na superfície de instrumentais, logo depois do ato cirúrgico e, durante a etapa de limpeza, é comumente verificada (EVANGELISTA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2010; RUTALA *et al.*, 1998; SAITO *et al.*, 2014; VILAS-BOAS; LEVY; FREITAS, 2009).

Os biofilmes são difíceis de serem removidos por métodos rotineiramente utilizados durante o processamento (REN-PEI *et al.*, 2014; VICKERY *et al.*, 2009). Mesmo após a etapa de esterilização, essas estruturas podem permanecer alojadas à superfície de PPS (COSTA *et al.*, 2017; STAUBITS; RAY; HARRIS, 2017). Desta forma, sua abordagem neste contexto deve ser direcionada à prevenção de sua formação por meio da adesão às boas práticas de limpeza. Sendo assim, há dificuldade de detecção do biofilme, durante o processamento de PPS, em consequência da limitação de técnicas, que permitam o seu monitoramento, em tempo real, aplicáveis à prática clínica.

Apesar da presença de biofilme em dispositivos médicos ser amplamente descrita na literatura, estudos que abordam os tempos iniciais de aderência microbiana são escassos (GOTTENBOS; VAN DER MEI; BUSSCHER, 2000; MOHITE *et al.*, 2016; PERCIN *et al.*, 2015), principalmente, na superfície de instrumentais cirúrgicos. Além disso, seu impacto na etapa de limpeza, ao longo de sua formação, é um ponto ainda não elucidado. Diante do exposto, questiona-se: *como os métodos de limpeza manual e automatizada atuam na remoção de S. epidermidis* aderido à superfície de instrumental cirúrgico submetido à contaminação experimental por diferentes intervalos?

Neste contexto, a realização deste estudo justifica-se pela necessidade de compreensão do tempo necessário entre a exposição ao contaminante, a aderência

inicial e a formação de biofilme, na superfície de instrumentais cirúrgicos, como também o papel dos protocolos de pré-limpeza e limpeza rotineiramente utilizados em unidades de processamento, na prevenção da formação e na remoção destas estruturas. A associação entre formação de biofilme e instrumentais cirúrgicos, em especial, abordando o papel do seu *design*, é um tema ainda pouco explorado na literatura, no entanto tem sido abordado em estudos recentes (COSTA *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2019).

Nesse sentido, espera-se que os resultados obtidos, a partir deste estudo, possam contribuir, a fim de ampliar a compreensão da importância da abordagem precoce do instrumental, durante a etapa de pré-limpeza e limpeza e sua repercussão, ao longo do processamento. Acredita-se ainda contribuir quanto a fornecer subsídios à tomada de decisão, com base em evidências científicas, em relação a processos e protocolos adotados nas instituições, contribuindo para a segurança do paciente a fim de garantir a entrega de um PPS seguro para o reuso.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Comparar dois protocolos de limpeza, manual e automatizada, quanto à capacidade de remoção de *S. epidermidis* da superfície do instrumental cirúrgico submetido a diferentes intervalos de contaminação.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a carga bacteriana, em fragmentos de instrumental cirúrgico (serrilha, haste, cremalheira), submetidos a diferentes intervalos de contaminação por *S. epidermidis* e após limpeza manual e automatizada;
- b) Caracterizar a microestrutura morfológica de *S. epidermidis* até a formação de biofilme, em fragmentos de instrumental cirúrgico (serrilha, haste, cremalheira), submetidos a diferentes intervalos de contaminação e após limpeza manual e automatizada.
- c) Determinar o tempo necessário para a formação de biofilme por *S. epidermidis* em instrumental cirúrgico (serrilha, haste, cremalheira).
- d) Definir a área de maior desafio para a limpeza de instrumental cirúrgico (serrilha, haste ou cremalheira), submetido à contaminação por *S. epidermidis* em diferentes intervalos de tempo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ETAPA DE LIMPEZA NO PROCESSAMENTO DE INSTRUMENTAIS CIRÚRGICOS

O processamento de PPS reutilizáveis tem reflexos diretos na qualidade da assistência prestada e na garantia de segurança do paciente sob cuidados de saúde. A limpeza, dentro do conjunto de etapas necessárias para a reutilização segura desses materiais, é um processo extremamente complexo e sofre influência de fatores diversos, como características e rotinas dos serviços de processamento, fator humano e características dos dispositivos (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; WHO, 2016b).

A abordagem da etapa de limpeza merece destaque, no contexto do processamento, pela sua importância, ao estimar que a premissa básica de que produtos que não podem ser limpos não alcançarão a esterilidade seja ponto crítico que permite o reúso seguro de PPS passível de processamento (RUTALA; WEBER; HICPAC, 2008; WHO, 2009, 2016a). Assim, torna-se importante refletir sobre as práticas adotadas aos serviços de esterilização com o objetivo de garantir a sua qualidade.

A limpeza efetiva de instrumentais cirúrgicos exige não só o envolvimento das unidades de processamento, mas também da equipe cirúrgica, que utiliza o instrumental e é responsável pelo cuidado com o material até que ele seja encaminhado à CME (GOLDBERG, 2010). As recomendações apontam para a necessidade de início precoce da limpeza, no bloco cirúrgico, e a criação de um fluxo que previna o ressecamento de matéria orgânica na superfície deste material e garanta o transporte rápido até a unidade de processamento (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; WHO, 2016a). Na CME, serão realizadas todas as ações da limpeza propriamente ditas, para que o instrumental seja preparado, embalado, esterilizado, transportado ao bloco cirúrgico e novamente reutilizado de forma segura (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; WHO, 2016a).

2.1.1 Limpeza no ponto de uso

No bloco cirúrgico, dependendo do sítio em que foram utilizados, instrumentais podem tornar-se amplamente contaminados por secreções corporais e microrganismos (CHAN-MYERS; MCALISTER; ANTONOPLOS, 1997; CHU *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 2014; WHO, 2016a). O início de ações voltadas para a redução de sujidade visível, a partir desse ponto, tem sido apontado como um ponto crítico que impacta diretamente na efetividade do processamento de PPS (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; DURO, 2013; FDA, 2015; LING *et al.*, 2018; SPRY, 2007; WHO, 2016a).

Assim, mesmo durante o ato cirúrgico, os instrumentais devem ser mantidos limpos e livres de sujidade visível (DURO, 2013). Nesse período, o instrumentador deve atuar friccionando a superfície do instrumental com compressas, livre de fiapos, embebidas em água esterilizada (AORN, 2017; DURO, 2013). Em se tratando de instrumentos canulados, recomenda-se também a instilação de água esterilizada nos lúmens, a fim de remover a sujidade visível e evitar a obstrução de canais (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; DURO, 2013; SPRY, 2007). Essa medida tem o objetivo de reduzir o tempo de contato entre a sujidade e a superfície e evitar seu ressecamento, o que reduz a possibilidade de fixação de resíduos (ALFA; NEMES, 2003; DURO, 2013; FDA, 2015; SPRY, 2007).

Entre os fatores apontados na literatura que influenciam a aderência de proteínas, um resíduo comumente encontrado na superfície de instrumentais cirúrgicos, estão a temperatura (LIPSCOMB *et al.*, 2007) e um tempo de secagem prolongado (COSTA *et al.*, 2017; LIPSCOMB *et al.*, 2007; SECKER; HERVÉ; KEEVIL, 2011). De acordo com Lipscomb *et al.* (2007), a adsorção de proteínas à superfície do instrumental cirúrgico se dá, ao longo do tempo, ocorrendo, a princípio, de forma lenta, seguida de uma elevação rápida e uma fase de platô. Assim, quanto maior o tempo de secagem de matéria orgânica na superfície desses instrumentais maior a adsorção proteica verificada e mais difícil sua remoção (COSTA *et al.*, 2017; SECKER; HERVÉ; KEEVIL, 2011).

O ressecamento de sujidade na superfície de instrumentais cirúrgicos, durante a limpeza, principalmente quando se acumula em áreas de difícil acesso, como articulações e lúmens, dificulta a sua remoção (AORN, 2017, CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018, SPRY, 2007; WHO, 2016a). A permanência de sujidade por

tempo prolongado, em aspiradores cirúrgicos ultrassônicos utilizados, durante procedimentos de craniotomia, em um hospital de Quebec (Canadá), possibilitou o ressecamento de matéria orgânica contaminante em seu interior (SHEITOYAN-PESANT *et al.*, 2017). Tal fato resultou em limpeza inadequada desse dispositivo, com consequente ineficácia de sua esterilização, que propiciou a transmissão de microrganismos, durante o procedimento, relacionando-se à ocorrência de um surto de infecção de sítio cirúrgico (ISC).

Outra prática que merece destaque, neste sentido, é a aplicação de álcool na superfície de instrumentais cirúrgicos durante a etapa de limpeza. Apesar de não haver uma recomendação formal, tem sido uma ação da prática com o objetivo de redução da contaminação desses PPS (KULKARNI *et al.*, 2016). Contudo, apesar de relacionar-se à diminuição de carga microbiana, essa prática aumenta a fixação de proteínas na superfície de instrumentais cirúrgicos, especialmente na presença de sangue (COSTA *et al.*, 2017; PRIOR *et al.*, 2004). Desta forma, o tempo de exposição na mesa cirúrgica, associado ao intervalo prolongado entre o uso e o transporte da CME de instrumentais contaminados, além do uso de desinfetantes nessa etapa, pode aumentar a probabilidade de aderência de sujidade (COSTA *et al.*, 2017; LIPSCOMB *et al.*, 2007; PRIOR *et al.*, 2004; SECKER; HERVÉ; KEEVIL, 2011; SHEITOYAN-PESANT *et al.*, 2017).

Uma vez utilizados, durante a cirurgia, o ideal é que os instrumentais cirúrgicos sejam contados, organizados e prontamente transportados para a área de processamento. Contudo não é um fluxo factível a muitos hospitais, o que pode ocasionar que esses materiais permaneçam em contato com a sujidade por horas. O uso de soluções que mantenham a umectação dos instrumentais nesse período promove a redução significativa da contaminação residual (AORN, 2017; BRASIL, 2009; LING *et al.*, 2018; LIPSCOMB *et al.*, 2007; MULLANEY, 2008; RUTALA; WEBER; HICPAC, 2008; SECKER; HERVÉ; KEEVIL, 2011; SHOEMAKE; STOESSEL, 2007; WHO, 2016a).

Recomenda-se a manutenção da umidificação de instrumentais após o uso, por imersão em solução de detergente e água potável morna (entre 30°C e 40°C), atentando-se para a necessidade de irrigação de lúmens, quando presentes (BRASIL, 2009). O uso de produtos de limpeza específicos nessa etapa auxiliam a redução de carga proteica, previnem a corrosão, o ressecamento e agregação de matéria orgânica e inorgânica e a formação de biofilme (AORN, 2017; DURO, 2013;

INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LIPSCOMB *et al.*, 2007). O mercado disponibiliza uma variedade de formulações, contendo detergentes em forma de gel, espumas e *sprays* que auxiliam na manutenção da umidificação até o transporte para a CME, principalmente, em áreas difíceis de limpar, além de atuarem na prevenção da formação de biofilmes (DURO, 2013; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SPRY, 2017), no entanto há pouca evidência de ação desses produtos na prática.

Uma alternativa constitui-se no uso de compressas embebidas em água, que são mantidas em contato com o instrumental até que seja encaminhado à CME (AORN, 2017; DURO, 2013). Cabe ressaltar que dispositivos que assim o permitem devem ser previamente desmontados, possibilitando o contato de toda a superfície do material, em especial, em áreas de difícil acesso à solução de limpeza (AORN, 2017; DURO, 2013; FDA, 2015; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SPRY, 2007).

Entre as diversas possibilidades, independente do produto ou técnica empregada, é necessário desprezar soluções utilizadas nessa etapa e antes seja feito o transporte, pelo risco de extravasamento e contaminação, tanto ambiental quanto dos profissionais (AORN, 2017; DURO, 2013; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SPRY, 2007; WHO, 2016b). É importante ressaltar que o uso de solução salina com o intuito de manter a umidificação e, não obstante durante a limpeza, é contraindicado pelo potencial de causar corrosão em instrumentais cirúrgicos (AORN, 2017; DURO, 2013; FDA, 2015; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SPRY, 2007).

Embora mantidos sob umidificação, o transporte à CME deve ser priorizado, uma vez que os instrumentais nessa etapa encontram-se contaminados e mantidos em um ambiente propício à proliferação microbiana, com a presença de umidade e fonte de nutrição que pode derivar da matéria orgânica que compõe a sujidade desses produtos. Instrumentais mantidos em imersão em água por tempo prolongado (240 minutos), apesar de apresentarem redução na carga proteica, demonstram aumento da carga bacteriana (COSTA *et al.*, 2017). Além do mais, aqueles que permanecem em contato com microrganismos podem apresentar aumento de carga microbiana, ao longo do tempo, relacionado ao próprio ciclo de replicação bacteriana (MOHITE *et al.*, 2016; PERCIN *et al.*, 2015) e também à sua aderência na superfície dos instrumentais ao longo do tempo de exposição (ROBERTS, 2013).

A possibilidade de transporte, em tempo adequado, para o processamento de matérias, exige a construção de fluxo intersetorial que envolve, ainda, a equipe do centro cirúrgico, uma estrutura física na instituição que permita sua realização, como a disponibilidade de elevadores exclusivos para essa função ou a proximidade entre o centro cirúrgico e a CME, além de recursos humanos em número adequado (DURO, 2013; GOLDBERG, 2010).

Instrumentais contaminados devem ser transportados à CME em carrinhos fechados, contendo barreira física entre sua última prateleira e o piso, sendo acondicionados em recipientes à prova de vazamento e fáceis de limpar (DURO, 2013; LING *et al.*, 2018; WHO, 2016b). Esses equipamentos devem ser fabricados com material leve, visto que várias caixas cirúrgicas são transportadas, ao mesmo tempo e por si só representam uma carga pesada. Neste sentido, a manutenção do sistema de rolagem das rodas é importante.

A determinação de uma rota pré-determinada, direta para a área de descontaminação, reduz o risco de cruzamento com material esterilizado ou com áreas de cuidado ao paciente ou com grande circulação de pessoas minimizando-se o risco de contaminação cruzada (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; DURO, 2013; LING *et al.*, 2018; WHO, 2016b).

Ainda que seu uso seja destinado ao transporte de material contaminado, é primordial realizar sua limpeza e secagem entre os usos (LING *et al.*, 2018), evitando-se o risco de aderência da sujidade e formação de biofilme no carrinho, que podem posteriormente atuar como fonte de contaminação de itens alocados no seu interior durante o uso. Por tratar-se de material contaminado, a porta de entrada de instrumentais cirúrgicos, na CME, deve ser sempre a área suja, na recepção, evitando-se seu cruzamento com instrumentais já limpos e principalmente estéreis.

2.1.2 Limpeza na central de material e esterilização (CME)

A etapa de limpeza propriamente dita é realizada na CME. Um processo de limpeza efetivo deve ter a capacidade de permitir a limpeza de toda a superfície, a redução de sua carga microbiana ao longo do processo e a remoção de todos os agentes de limpeza utilizados (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; WHO, 2016a).

De acordo com a proposição inicial de Hebert Sinner, a efetividade da limpeza pode ser alcançada pela interação de quatro variáveis que influenciam diretamente na sua qualidade. No contexto do processamento de PPS, essas variáveis podem ser assim definidas: 1) A ação química, que compreende o conjunto de produtos químicos utilizados, durante a etapa de limpeza, representada pelos diferentes tipos de detergentes. 2) O tempo, uma vez que todos os produtos requerem um intervalo mínimo de contato para atuação. 3) A ação mecânica que corresponde à aplicação de uma força capaz de eliminar a sujidade, podendo ser manual ou automatizada. 4) A temperatura, que de forma mais abrangente pode ser tratada como as condições físico-químicas da água, já que esse é um solvente universal, utilizado na diluição de detergentes, por meio dos quais se controla essa variável (MASSICOTTE, 2009; WHO, 2016a).

Contudo, quando se considera a complexidade da etapa de limpeza, no âmbito do processamento de PPS, outros fatores são considerados determinantes na qualidade desse processo, como *design* do PPS, quantidade e tipo de sujidade, presente na superfície dos instrumentais, condições de secagem, validação, manutenção e operação de equipamentos, monitorização do processo de limpeza e treinamento dos profissionais envolvidos nessa etapa (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; DURO, 2013; SHEIToyAN-PESANT *et al.*, 2017; WHO, 2016b).

2.1.2.1 Produtos de limpeza utilizados no processamento de instrumentais cirúrgicos

Os detergentes, utilizados na limpeza de PPS, são formulações com a função de melhorar a capacidade de remoção de sujidade da água e reduzir os efeitos negativos de impurezas possivelmente contidas nela (BRASIL, 2012a). Sua ação ocorre, por meio da presença de agentes químicos, que auxiliam na emulsificação, saponificação, redução da tensão superficial e suspensão de sujidade (BRASIL, 2012a; LYON, 2008; OLSEN; FALHOLT, 1998; WHO, 2016b).

Esses produtos são utilizados, na área de processamento de PPS, no intuito de remover uma variedade de contaminantes presente nos instrumentais, após o uso, devendo atuar, sem, contudo provocar danos ao instrumental ou permitir a permanência de resíduos depois do enxágue, o que pode associar-se a danos ao paciente. As formulações de detergentes utilizados, no processamento de PPS,

devem ser biodegradáveis, atóxicas, solúveis em água, não abrasivas, eficazes em todos os tipos de sujidade, isentas de substâncias químicas prejudiciais ou de risco aos seres humanos, bacteriostáticas, de fácil enxágue e com baixa formação de espuma (BRASIL, 2012b; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; SMITH *et al.*, 2012; WHO, 2016b). Para cumprir sua função, a composição dos detergentes, em geral, inclui a presença de (LYON, 2008; OLSEN; FALHOLT, 1998; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a):

a) agente surfactante - tensoativo que atua reduzindo a tensão superficial da água e possibilitando a dissolução de partículas normalmente insolúveis por meio de ligações químicas. Essas moléculas possuem duas regiões distintas, sendo uma hidrofóbica, que é atraída pela sujidade e outra hidrofílica, que se liga à água, atuando, assim, como “pontes”, impedindo a redeposição dessas partículas;

b) agente quelante - sequestra íons da água dura (cálcio e manganês) e os mantém em suspensão, protegendo os surfactantes de minerais encontrados na água e prevenindo a precipitação de sujidade sobre os instrumentais;

C) inibidores de corrosão - atuam sobre a natureza corrosiva da água, prolongando o tempo que esses materiais podem ficar submersos.

A escolha do detergente deve ser feita, considerando as características da sujidade que se pretende remover, o tipo de PPS e de limpeza, tal como a qualidade da água disponível; recomenda-se utilizar o produto que melhor se adapte às necessidades de cada serviço (PFIEDLER ENTERPRISES, 2014). Existem diferentes tipos de detergentes disponíveis no mercado com indicações diversas (neutros, alcalinos e enzimáticos), devendo ser usados separadamente, pelo risco de geração de resíduos tóxicos (AORN, 2017; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017).

Os detergentes neutros, pH entre 6,5 e 7,5, sem adição de enzimas, podem ser empregados na limpeza de instrumentais com pouca quantidade de matéria orgânica (SOBECC NACIONAL, 2017). Essas formulações apresentam baixa formação de espuma e remoção fácil durante o enxágue e podem ser empregados tanto na limpeza manual quanto automatizada (AORN, 2017). Sua utilização em metais é segura (PFIEDLER ENTERPRISES, 2014).

Os Detergentes alcalinos, pH entre 9 e 14, removem a sujidade e seu uso está indicado em equipamentos automatizados, sendo adequados em processos em que se utiliza água dura (PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; SOBECC NACIONAL,

2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016b). Têm a capacidade de dissolver resíduos de proteínas e gorduras e, em geral, requerem temperatura ótima de atuação que varia entre 60°C e 70°C (SOBECC NACIONAL, 2017). Possuem boa compatibilidade com instrumentais cirúrgicos, contudo podem reagir com alumínio, zinco, metais não ferrosos borracha e látex, a depender do antioxidante agregado (OLIVEIRA; MATI, 2017; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a).

Diferentemente, detergentes enzimáticos são compatíveis com diferentes materias (OLIVEIRA; MATI, 2017). Esses produtos são utilizados com a função de clivagem de substratos específicos, por meio de enzimas, que atuam de forma a catalisar reações, decompondo estruturas moleculares complexas em compostos mais simples, o que facilita sua dissolução diminuindo o tempo necessário para a limpeza (SHOEMAKE; STOESSEL, 2007).

As enzimas são específicas e atuam em tipos exclusivos de sujidade, sendo comumente utilizadas nas formulações à lipase, que atua clivando lipídios, carboidrases e alfa-amilase que têm ação sobre carboidratos, celulase que age sobre a celulose e protease e peptidase que apresentam ação catalizadora sobre proteínas (INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; OLSEN; FALHOLT, 1998; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 55 (BRASIL, 2012b) estabelece os requisitos mínimos para detergentes enzimáticos de uso restrito, em estabelecimentos de saúde, com indicação para a limpeza de dispositivos médicos. A legislação traz uma série de exigências, para que esses produtos sejam registrados, como comprovação da efetividade da ação enzimática, estudos de toxicidade, além de determinar padrões para sua rotulagem e embalagem. Também se recomenda sua diluição imediatamente antes de uso e de sua troca a cada carga processada (BRASIL, 2012b).

O reúso de solução de limpeza, em lavadoras ultrassônicas, reduz a efetividade na remoção de microrganismos em PPS (AORN, 2017; BRASIL, 2012b; EVANGELISTA *et al.*, 2015; MUQBIL *et al.*, 2005). Essa é uma prática comum, em serviços de processamento, contudo deve ser considerada a possibilidade de redução de sua efetividade visto que o acúmulo de matéria orgânica pode reduzir a disponibilidade de ingredientes ativos (surfactantes) que atuam na sua remoção (AORN, 2017; MATI, 2018; SOBECC NACIONAL, 2017), levando à saturação da

solução. Associado a isso, a natureza proteica desses produtos pode facilitar a manutenção e proliferação de microrganismos e causar a contaminação de PPS durante a limpeza (MATI, 2018; SHOEMAKE; STOSSEL, 2007).

O emprego dessas soluções exige uma combinação de remoção da sujidade prévia, concentração adequada do produto, tempo de contato, pH e temperatura definidos, conforme as orientações do fabricante, além da aplicação de uma força mecânica (fricção com escovas e esponjas, jatos de água ou energia ultrassônica) para que se possa obter o melhor resultado com sua utilização (AORN, 2017; OLSEN; FALHOLT, 1998; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014; SMITH *et al.*, 2012; SOBECC NACIONAL, 2017; SPRY, 2007; WHO, 2016b).

As indicações de tempo de imersão e temperatura da água utilizada na diluição devem ser fornecidas, no rótulo do produto pelo fabricante, entretanto variam entre três e cinco minutos de imersão a uma temperatura em torno de 27 a 44°C não excedendo 60°C, o que previne a coagulação e fixação de proteínas em instrumentais (KULKARNI *et al.*, 2016; PFIEDLER ENTERPRISES, 2014). A manutenção da temperatura recomendada é importante, para manter a efetividade das enzimas, que atuam numa faixa de temperatura ideal (VESCAN *et al.*, 2018).

A concentração do produto após a diluição é outra variável importante que interfere no resultado do processo de limpeza. Neste sentido, quando preparado manualmente, recomenda-se utilizar uma marcação permanente no recipiente de diluição, indicando o nível adequando de água, conforme o volume de solução desejado (SPRY, 2007). O uso de sistemas automatizados ou dispositivos dosificadores, para a mensuração do volume de detergente necessário, auxiliam nesta tarefa (AORN, 2017; SPRY, 2007).

Concentrações acima do recomendado dificultam o enxágue e favorecem a permanência de resíduos de detergentes, na superfície desses materiais, podendo associar-se à reação inflamatória, quando em contato com o paciente. Na utilização de equipamentos automatizados, o enxágue inadequado pode permitir a permanência desses resíduos (LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2006), sobretudo, naqueles em que não há um monitoramento de sua efetividade de forma periódica.

2.1.2.2 Qualidade da água no processamento de instrumentais cirúrgicos

A água é utilizada durante várias etapas do processamento de PPS. Sua função, apenas considerando a etapa de limpeza, inclui: ação como solvente ou diluente de produtos, assim como de sujidades solúveis, transferência de força mecânica e calor, desinfecção térmica durante o uso de processo automatizado e enxágue (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LYON, 2008; WHO, 2016a).

Características como temperatura, pH, concentração inadequada de íons, contaminação microbiana, presença de endotoxinas na água afetam diversos aspectos do processo de limpeza, levando à necessidade de monitoramento periódico de sua qualidade (AORN, 2017; BRASIL, 2011; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a).

A temperatura da água deve ser controlada conforme a finalidade e etapa que será empregada. Sua utilização, nas primeiras etapas da limpeza, em temperatura elevada (acima de 45°C), por exemplo, relaciona-se à coagulação de sangue e proteínas, possibilitando sua fixação à superfície dos itens processados e à inativação de enzimas; por outro lado, seu uso abaixo da temperatura recomendada reduz a habilidade do detergente na remoção de sujidades compostas, principalmente, por gorduras e óleos (BRASIL, 2012b; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH D, 2016a).

O uso de água dura, com níveis elevados de minerais, especialmente, cálcio e magnésio, pode danificar os instrumentais, ao longo do tempo, provocando corrosão e alteração na coloração (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LYON, 2008; WHO, 2016a). Quando utilizada na diluição de detergentes, a presença desses íons pode interferir ainda na atividade enzimática, especialmente, de lipases e proteases (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; VESCAN *et al.*, 2018).

Outrossim, os minerais presentes podem ligar-se a surfactantes, diminuindo sua disponibilidade na solução para atuar sobre a sujidade (LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). A presença de impurezas na água pode afetar, ainda, a funcionalidade, a efetividade e a vida útil de equipamentos automatizados, podendo relacionar-se à oxidação da câmara interna e

à mudança de coloração de componentes de polietileno de lavadoras (SOBECC NACIONAL, 2017).

Técnicas e equipamentos específicos devem ser empregados, a fim de minimizar a presença de contaminantes e proporcionar a concentração adequada de minerais na água utilizada no processamento de PPS (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). A água potável, proveniente do sistema de abastecimento público, pode ser obtida, por meio de um processo de tratamento que inclui a decantação e a filtração, todavia a concentração de sais dissolvidos varia, conforme a fonte e a forma de coleta (AAMI, 2007; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

Esse tipo de água tem um baixo nível de contaminação microbiana e é livre de microrganismos patogênicos, exceto aqueles que podem causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). A água mole resulta do uso de abrandadores, que realizam troca de íons, transformando água dura em água mole, sem, todavia reduzir a carga microbiana ou de resíduos orgânicos (AAMI, 2007; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Esses tratamentos são suficientes, para obter água de qualidade, que possa ser utilizada durante a pré-limpeza e limpeza (AAMI, 2007; WHO, 2016a).

Na etapa de enxágue, porém exige-se, no mínimo, o uso de água deionizada (AAMI, 2007) a qual é obtida, por meio de resinas que removem íons, no entanto permitem a permanência de contaminação microbiana e também de endotoxinas (AAMI, 2007; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). A presença desses contaminantes, durante o enxágue, pode ser considerada uma fonte de contaminação pela possibilidade de sua deposição na superfície de instrumentais (AAMI, 2007; LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

Particularmente, em relação a endotoxinas, por se tratar de resíduos termorresistentes, são inativados apenas em temperaturas acima de 180° C, o que não é alcançado em ciclos habituais de esterilização que variam entre 121°C e 134°C (LYON, 2008; RUTALA; WEBER, 2019; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Quando em contato com a corrente sanguínea, esses resíduos podem causar reação inflamatória severa, resultando em febre, hipotensão, dispneia, coagulação vascular disseminada, sepse e choque. Para mais, pode constituir um

risco para o desenvolvimento de Síndrome Tóxica do segmento anterior (TASS) em pacientes submetidos a cirurgias oftalmológicas (AORN, 2017; BRASIL, 2017a).

Instrumentais cirúrgicos submetidos à limpeza por equipamentos automatizados apresentaram um aumento nos níveis de carboidrato e endotoxinas de 84% e 60%, respectivamente, sendo esse resultado atribuído à qualidade da água utilizada durante o enxágue (ALFA; OLSON; AL-FADHALY, 2010). O nível de endotoxina desejável na água usada, no último enxágue de instrumentais cirúrgicos, é de 0,25 unidades de endotoxinas (UE)/mL (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

Desta forma, esforços no sentido de disponibilizar pontos que forneçam água purificada (destilada ou de osmose reversa), na área de limpeza e seu uso em lavadoras, contribuem, para a segurança do processamento, de igual modo à conservação desses equipamentos (AAMI, 2007). A água destilada deriva-se da ebulição da água, que resulta em vapor livre de sais inorgânicos, bactérias, vírus, cistos e endotoxinas logo após a condensação, mas, em geral, é um processo bastante oneroso para ser utilizado em hospitais (AAMI, 2007; LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

A água de osmose reversa por sua vez consiste na utilização de membranas semipermeáveis que removem sais inorgânicos da água, bactérias e endotoxinas produzindo água com alto grau de pureza (AAMI, 2007; LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Em alguns sistemas, o controle microbiano final pode ser feito com a utilização de filtros que retêm partículas de até de 0,2 μm (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Uma limitação desse método é o grande volume de água que não passa pela membrana de filtração e é desprezado. Neste caso, pode-se reaproveitá-la em outros setores ou utilizar um tratamento prévio na água que reduz o nível de impureza a ser removida pelo sistema (LYON, 2008; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). PPS críticos, como instrumentais cirúrgicos, que entram em contato com corrente sanguínea e tecidos ósseos, ocular ou neurológico, devem ter o enxágue final com água pura, seja de osmose reversa ou destilada (AAMI, 2007; AORN, 2017).

2.1.2.3 Tipos de limpeza utilizados no processamento de instrumentais cirúrgicos

Iniciada durante a pré-limpeza, a limpeza propriamente dita ocorre, nas unidades de processamento, quando os instrumentais provenientes do bloco cirúrgico são recebidos. A ação mecânica, necessária à remoção de sujidade nesta etapa, pode ser executada de forma manual, com o uso de escovas, ou automatizada, com a utilização de lavadoras termodesinfectoras ou ultrassônicas, (ALFA, 2013; AORN, 2017; BRASIL, 2008; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; MULLANEY, 2008), sendo ideal ou obrigatória, em alguns casos, a utilização de um protocolo que combine os dois métodos (BRASIL, 2012a).

A limpeza manual ocorre, por meio de imersão do material, em solução contendo água e detergente, em temperatura compatível com o detergente utilizado (aproximadamente, 50° C) e concentração adequadas, por um período determinado, de acordo com a recomendação do fabricante do produto (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; RUTALA; WEBER, 2019; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a). Deve-se atentar para a necessidade de abertura prévia naqueles que apresentam articulação, a fim de permitir o contato adequado com a solução de limpeza (AORN, 2017; FDA, 2015; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; WHO, 2016a).

Após um tempo recomendado de imersão, a escovação da superfície externa e canais promove a ação mecânica necessária para a remoção de resíduos. O processo deve ser realizado ainda com o instrumental submerso, no intuito de reduzir a formação de aerossóis, a partir da solução de limpeza potencialmente contaminada, que pode atingir o próprio profissional e também o ambiente (AORN, 2017; WHO, 2016a). Recomenda-se a utilização de escovas específicas para essa função, fabricadas em *nylon* com cerdas macias (AORN, 2017; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; WHO, 2016a), as quais podem ser de uso único ou reprocessáveis. Quando são reprocessadas, essas escovas devem ser descontaminadas pelo menos diariamente ou mais frequentemente se necessário (AORN, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a). O uso de produtos abrasivos pode resultar em dano ao instrumental, aumentando a probabilidade de retenção de sujidade (AORN, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017).

A execução do procedimento de escovação deve ser realizada de forma padronizada, recomendando-se a fricção da superfície dos instrumentais por pelo

menos cinco vezes, sendo a escova deslizada do sentido proximal para o distal (AORN, 2017; BRASIL, 2009; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a). A inspeção visual das articulações, dentes e serrilhas deve ser realizada pela maior probabilidade de acúmulo de sujidade nesses locais, a fim de possibilitar a sua remoção completa.

Em canulados, a utilização de escovas especiais compatíveis com o seu diâmetro é necessária, assim como a instilação de soluções de limpeza e água nos lúmens que pode ser realizada com o auxílio de pistolas de ar ou água (WHO, 2016b). A fricção é uma etapa essencial à remoção de sujidade, em artigos submetidos à limpeza manual, uma vez que apenas a imersão em detergente enzimático não se mostrou suficiente para a redução nos níveis de resíduos (LUCIANO *et al.*, 2016). O processo é finalizado com enxágue dos instrumentais (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; RUTALA; WEBER, 2019; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a).

A limpeza manual é indicada em PPS que não podem ser imersos, instrumentais delicados que requerem limpeza especial ou que não podem passar pelo processo automatizado e, como etapa precedente à limpeza automatizada, em lavadora ultrassônica ou termodesinfectoras para PPS de conformação complexa (AAMI, 2011; AORN, 2017; BRASIL, 2012a; RUTALA; WEBER, 2019; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a). No entanto, ainda hoje, muitas instituições utilizam o método manual como o único método de limpeza (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; MENDONÇA *et al.*, 2017).

A limpeza automatizada, por sua vez, é realizada com o auxílio de equipamentos, como lavadoras termodesinfectoras e ultrassônicas (AORN, 2017). O uso de lavadoras termodesinfectoras é seguro (MURDOCH *et al.*, 2006; WHO, 2016b) e promove a redução efetiva da contaminação microbiana (EVANGELISTA *et al.*, 2015). Esses equipamentos possuem ciclos com etapas que podem variar de acordo com o modelo e o fabricante.

Em geral, seu processo inclui fases sequenciais de enxágue/descarga, limpeza por meio da pressão de jatos de água associados a detergentes e braços aspersores giratórios direcionados, novo enxágue, desinfecção térmica em temperaturas que variam entre 65°C e 95°C e secagem (ALFA; OLSON, 2014; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; MURDOCH *et al.*, 2006; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016b;). Nesses equipamentos, a pressão de bombeamento, fluxo e qualidade da água, temperatura, tempo,

concentração de detergente são variáveis críticas que determinam a sua efetividade (ALFA; OLSON, 2014; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH; 2016a).

Durante a etapa de limpeza, a temperatura da água deve atender às recomendações do fabricante do agente de limpeza utilizado no processo (em torno de 45°C). Na fase de termodesinfecção, utiliza-se uma combinação entre valores de tempo e temperatura que devem atingir uma taxa de letalidade ou A0 mínimo de 600 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2013). Esse valor é definido como o efeito de desinfecção resultante da exposição a 80°C por um período de um segundo por um microrganismo com um valor de Z de 10°C, sendo Z o aumento na temperatura necessário para causar a redução decimal desse microrganismo (ROHM-RODOWALD *et al.*, 2013; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Essa medida pode ser alcançada, por exemplo, utilizando-se a temperatura de 80°C por 10 minutos ou 90°C em um minuto.

As especificações, para o funcionamento, validação e manutenção de termodesinfectoras, são previstas na ABNT NBR ISO 15883. Ao utilizar esse equipamento, a qualidade da limpeza pode ser afetada em virtude da preparação dos itens a serem processados, da utilização da capacidade de carga adequada e do posicionamento dos itens processados, visto que os dispositivos devem ser atingidos durante a limpeza (CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018).

Todavia, como qualquer equipamento, o uso de lavadoras termodesinfectoras pode estar relacionado a falhas, principalmente decorrente da não adesão aos protocolos e normas vigentes para o seu bom funcionamento. A contaminação de instrumentais com resíduos de proteína, carboidratos e endotoxinas, acima dos níveis esperados após limpeza nesses equipamentos, foi relacionada à baixa qualidade da água utilizada na etapa de enxágue (ALFA; OLSON; AL-FADHALY, 2010). Ainda, a falta de manutenção e padronização desses equipamentos, conforme normas estabelecidas e nem sempre implementadas e monitoradas pelas instituições, são apontadas como a causa para níveis elevados de proteína e matéria orgânica residual recuperados em instrumentais cirúrgicos submetidos à limpeza em lavadoras desinfectoras (LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2006; MURDOCH *et al.*, 2006).

A limpeza em lavadora ultrassônica é recomendada em materiais que apresentam desafios ao processo de limpeza, como articulações, fendas, lúmens, serrilhas e cremalheiras (AORN, 2017; RUTALA; WEBER, 2019; UNITED KINGDON

DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a), dispositivos com peças pequenas e como etapa preliminar à limpeza em lavadora termodesinfectora (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

Sua efetividade está relacionada a um processo conhecido como “cavitação”, que consiste em ondas de energia sonora de alta frequência, geradas por meio de transdutores, que, propagadas em meio aquoso, criam minúsculas bolhas, que acumulam energia até se colapsarem na superfície dos instrumentais, produzindo áreas localizadas de vácuo que deslocam os contaminantes (JATZWALK; SCHÖNE; PIETSCH, 2001; KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; RUTALA; WEBER, 2019; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Alguns modelos possuem ainda conectores que promovem fluxo, na parte interna de dispositivos canulados, durante o processo de limpeza, potencializando a capacidade de remoção de resíduos nesse tipo de instrumental (ALFA *et al.*, 2006; ALFA; NEMES, 2004; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

A limpeza realizada por lavadoras ultrassônicas sofre influência da frequência, intensidade e amplitude de sonicação, temperatura da água, presença de detergente na solução (tipo e concentração) e tempo (JATZWALK; SCHÖNE; PIETSCH, 2001; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; MASON, 2016). Em geral, uma temperatura entre 27° C e 43°C, tempo de exposição entre cinco e 10 minutos, frequência de sonicação próxima a 40 KHZ (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; MASON, 2016; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a) são parâmetros recomendados para promover a limpeza adequada.

Quanto menor a frequência ultrassônica, maiores as bolhas formadas, durante a cavitação e maior o impacto da atividade ultrassônica, já que a concentração de resíduos, na solução de limpeza, pode afetar esse processo bem como a presença de bolhas na água utilizada para a limpeza (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011). Assim, recomenda-se que seja realizado um ciclo regular com a cuba preenchida apenas por água, sem instrumentais, por cinco a oito minutos para promover a desgaseificação (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; WHO, 2016a). Além disso, como a cavitação ocorre em meio líquido, é fundamental que o instrumental esteja completamente submerso e seus canais preenchidos (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011). Quando utilizado de forma correta, lavadoras ultrassônicas reduzem o tempo de manipulação pelos profissionais e o tempo total de limpeza do instrumental minimizando o risco de exposição a contaminantes (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011).

A legislação brasileira exige a utilização da limpeza automatizada, em lavadora ultrassônica ou outro equipamento de eficiência comprovada com a presença de conectores para canulados e tecnologia de fluxo intermitente, para PPS de conformação complexa (presença de lúmen inferior a cinco milímetros, fundo cego ou espaço interno inacessível para a fricção direta, reentrâncias ou válvulas) (BRASIL, 2012a).

O *design* do PPS tem grande relevância para o alcance de sua limpeza e, conseqüentemente, esterilidade e também é apontado como um fator que afeta a qualidade do processamento (COSTA *et al.*, 2018; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; LOPES *et al.*, 2019; SHEITOVAN-PESANT *et al.*, 2017). Esse é um aspecto que deve ser levado em conta, quando se planejam e fabricam novos produtos e mesmo durante sua aquisição (FDA, 2015; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017). Instrumentais cirúrgicos apresentam área de difícil acesso às etapas de limpeza, como a presença de ranhuras, serrilha e articulações e uma grande rotatividade dada a frequência com que são utilizados em procedimentos, exigindo-se atenção para o seu processamento (ALFA, 2013; COSTA *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2019; MURDOCH *et al.*, 2006).

A presença de sujidade grosseira em PPS, antes de serem submetidos à limpeza em lavadoras ultrassônicas, pode contaminar a solução e a cuba da lavadora (EVANGELISTA *et al.*, 2015; KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; MATI, 2018). A ação de limpeza, promovida pelo equipamento associado à presença de detergente na solução, remove a sujidade dos instrumentais cirúrgicos que se torna dissolvida na solução de limpeza, podendo depositar-se no equipamento durante seu uso (AORN, 2017). A cuba da ultrassônica deve passar por lavagem, desinfecção (álcool 70%), enxágue e secagem diariamente ou, preferencialmente, a cada uso, a fim de prevenir a formação de biofilmes e acúmulo de endotoxinas (AORN, 2017; KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; WHO, 2016a).

O uso de ultrassônica não está indicado para itens fabricados em cortiça, vidro, borracha, madeira e cromo além de agulhas, endoscópios rígidos e outros dispositivos delicados (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011). Além de tudo, diferentes tipos de metais não devem ser submetidos ao mesmo ciclo de processamento, uma vez que, durante o processo de cavitação, íons provenientes de um tipo de metal podem se soltar e aderir ao outro (KAUFFMAN; JOSEPH, 2011).

O método automatizado é apontado como mais efetivo em relação ao método manual (ALFA, 2013; ALFA *et al.*, 2006; ALFA; NEMES, 2003, 2004; ALFA; OLSON; AL-FADHALY, 2010; AORN, 2017). Tal fato é atribuído a variações de técnicas durante a limpeza entre os profissionais, maior carga de trabalho, tempo dispendido, risco ocupacional e aumento na disseminação ambiental de microrganismos (AORN, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017). A utilização de equipamentos automatizados, no entanto, apesar de representar grande avanço tecnológico na área de limpeza de PPS, não exclui a necessidade de validação, manutenção regular e profissionais treinados para operá-las (ALFA, 2013; AORN, 2017; DURO, 2013; WHO, 2016a).

A validação é um procedimento documentado com o intuito de demonstrar que um processo produzirá, de forma consistente, um produto que esteja de acordo com especificações pré-determinadas (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b; WHO, 2016a). Deve ser aplicada a todos os equipamentos utilizados no processamento de PPS e consiste na realização de testes que incluem: qualificação de instalação, de operação e de desempenho (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b; WHO, 2016a).

A qualificação de instalação garante que o equipamento tenha sido instalado, de acordo com suas especificações, enquanto a qualificação de operação atesta que, depois da qualificação de instalação, o equipamento opera dentro dos parâmetros, sendo que ambas são fornecidas pelo fabricante ou distribuidora (BRASIL, 2012a; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b). Com a qualificação de desempenho, assegura-se que, após as qualificações de instalação e operação, o equipamento apresenta desempenho adequado por, no mínimo, três ciclos sucessivos, com parâmetros idênticos, utilizando-se a carga de maior desafio, sendo recomendada uma requalificação anual (BRASIL, 2012a; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b).

Depois da qualificação, o desempenho dos ciclos desses equipamentos deve ser continuamente monitorado, pelo menos semanalmente (ALFA, 2013; AORN, 2017; DURO, 2013), para garantir que atinjam o nível de limpeza esperado (WHO, 2016a). Os principais parâmetros incluem a dosagem de detergentes, tempo de exposição, temperatura, drenagem, calibração, qualidade da água, força de cavitação

e de fluxos capazes de promover a limpeza (DURO, 2013; MASON, 2016; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b).

A qualificação dos ciclos de limpeza, em lavadoras termodesinfectoras, pode ser feita com o uso do *soil test*, ou teste de sujidade cuja composição deve conter pelo menos sangue desfibrinado, mucina e gema de ovo (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Em geral, o produto apresenta-se em pó, que misturado à água simula a presença de sangue e outras matérias orgânicas. O produto é aplicado com um pincel sobre o instrumental cirúrgico cobrindo, principalmente, ranhuras e articulações e deixado para secar por 30 minutos antes de ser colocado na lavadora. Deve ser então acionado o programa de limpeza, sem secagem e verificado se houve sua remoção ao final do ciclo (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016b).

Podem ser utilizadas, ainda, placas impregnadas que simulam a presença de sujidade (MASON, 2016). A leitura desse teste é realizada, por meio de inspeção visual da quantidade de resíduo removido, de acordo com um guia de interpretação fornecido pelo fabricante (ALFA, 2013). Outra alternativa comercialmente disponível, contudo, ainda sem estudos sobre sua utilização, é o uso de indicadores químicos multiparamétricos capazes de monitorar simultaneamente, por exemplo, tempo, temperatura, cavitações e concentração de detergente em ultrassônicas.

A atividade em lavadoras ultrassônicas pode ser avaliada pelo padrão de erosão que é criado em uma folha de papel alumínio exposta ao banho por um curto período (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a). Especificamente, a força de cavitação pode ser avaliada pelo uso de testes disponíveis comercialmente (Sono-check®), podendo ser aplicados anualmente (MASON, 2016; WHO, 2016a).

Em seguida à limpeza, seja pelo método manual ou automatizado, o instrumental deve passar por enxágue. Além de promover a remoção da sujidade despreendida pelos processos de limpeza, o enxágue deve remover também possíveis resíduos químicos, resultantes do uso de detergentes, da superfície dos instrumentais (AORN, 2017; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a). O uso de água tratada nesta etapa é recomendado e evita a recontaminação do instrumental (AAMI, 2011; AORN, 2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Níveis elevados de endotoxinas na água utilizada no enxague podem contribuir para a

permanência de contaminação por esses resíduos em PPS, depois da limpeza, enquanto minerais, em quantidade superior a 50 ppm, podem ocasionar manchas e a deterioração dos instrumentais, além de tornar as soluções de detergente enzimático menos efetivas (DANCER *et al.*, 2012; FDA, 2015).

Em seguida ao enxágue, o instrumental deve ser criteriosamente seco. A permanência de gotículas de água nesta etapa favorece a sobrevivência e o crescimento microbiano, inibe a ação do óxido de etileno, dilui os agentes químicos líquidos desinfetantes e podem causar oxidação ou manchas nas superfícies dos PPS (AAMI, 2011).

2.1.2.4 Monitoramento da etapa de limpeza

O monitoramento da limpeza é de fundamental importância para o processamento do instrumental (ALFA, 2013; AORN, 2017; BRASIL, 2012a; FDA, 2015; WHO, 2016a, 2016b). A validação desse processo é vital, para o alcance da esterilidade logo após o processamento, pois minimiza a possibilidade submeter itens que não foram adequadamente limpos à esterilização, o que pode associar-se à falha do método (BRASIL, 2012a). A técnica mais simples e mais utilizada neste sentido é a inspeção visual (AORN, 2017; DURO, 2013; FDA, 2015; MASON, 2016; WHO, 2016a, 2016b).

O procedimento consiste na avaliação criteriosa de toda a superfície do instrumental a olho nu, do sentido proximal para o distal, a fim de verificar a permanência indesejada de sujeira, posteriormente, a etapa de limpeza (BRASIL, 2009; FDA, 2015; MASON, 2016; WHO, 2016a). Deve ser iniciado, durante o enxágue, tornando-se obrigatório em todos os PPS nas etapas de secagem e preparo (BRASIL, 2012a; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; RUTALA; WEBER, 2019; WHO, 2016a). Durante essa última etapa, recomenda-se sua complementação pelo uso de lentes intensificadoras (BRASIL, 2009, 2012a; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; RUTALA; WEBER, 2019; WHO, 2016a, 2016b) que auxiliam na visualização de áreas críticas, como articulações, ranhuras e encaixes. A legislação brasileira exige o uso de lentes com capacidade de aumento mínimo de oito vezes (BRASIL, 2012a).

A inspeção dos itens, durante essa etapa, deve ser realizada em superfície passível de desinfecção por álcool 70%, a fim de evitar a recontaminação dos instrumentais (AORN, 2017; SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016a). De mais a mais, o uso de luvas deve ser considerado, a fim de minimizar a transferência de resíduos entre as mãos dos profissionais e os instrumentais. Uma polpa digital pode transferir até 0,51 nanograma/mm² de proteínas à superfície de aço inoxidável, enquanto a utilização de luvas pode reduzir esse valor para menos de 0,06 picograma/mm² (HOWLIN *et al.*, 2009).

Por se tratar de uma técnica subjetiva, os critérios que determinam se um instrumental está ou não limpo, precisam ser previamente definidos (FDA, 2015) e a equipe treinada para essa avaliação. Instrumentais nos quais a presença de sujidade é detectada devem ser novamente submetidos ao protocolo de limpeza (SOBECC NACIONAL, 2017; WHO, 2016b), evitando-se práticas, como a fricção com álcool, uma vez que esse atua aumentando a fixação da sujidade. Fatores como intensidade e fonte de iluminação, na área de inspeção, restrições de tempo e número elevado de instrumentais processados diariamente (AORN, 2017; LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2008; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a) podem afetar a confiabilidade da técnica.

Apesar de amplamente empregada, a inspeção visual é um método com baixa sensibilidade quando comparado a outros disponíveis (DURO, 2013; MASON, 2016). A detecção de sujidade pelo método de fluorescência foi possível em 84,3% (27/32) dos instrumentais avaliados, enquanto, por inspeção visual, apenas 9,4% foram considerados inadequados (DESCÔTEAUX *et al.*, 1995). Em outro estudo, a porcentagem de instrumentais considerados com alto nível de contaminação por fluorescência foi de 66% versus 4% detectados por inspeção visual (LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2008).

A desvantagem do método é que permite apenas a verificação de sujidade visível, nas superfícies externas, apresentando limitações na detecção de resíduos microscópicos (AORN, 2017; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Sua falha, em evidenciar a presença desses resíduos, foi demonstrada pela detecção de níveis elevados de Adenosina Trifosfato (ATP) (LING; LIM; GOH, 2015) e endotoxinas (ALFA; OLSON; AL-FADHALY, 2010) em instrumentais previamente considerados limpos.

O uso da inspeção visual também não é suficiente, para detectar sujidade residual, em produtos de conformação complexa, principalmente, contendo lúmens. Nestes casos, o uso de boroscópio, dispositivo que atua como endoscópio e projeta a imagem da superfície analisada de forma amplificada para uma tela, pode ser empregado (SOBECC NACIONAL, 2017). O uso desse equipamento permitiu a identificação de restos de tecido e cerdas de escovas que não eram visíveis à inspeção visual, em canais de sucção da peça de mão de *shaver*, utilizados em artroscopia (TOSH *et al.*, 2011). Assim, a inspeção visual pode ser um bom método para identificação de contaminação grosseira, entretanto deve ser complementada com testes químicos capazes de identificar resíduos microscópicos (MASON, 2016).

Dada a variedade de procedimentos, em que são utilizados instrumentais cirúrgicos, podem apresentar diferentes contaminantes residuais depois da limpeza que não podem ser visualizados a olho nu. A monitorização de níveis de ATP, proteína, hemoglobina, endotoxina, carboidrato e microrganismos podem ser utilizados como parâmetro para a avaliação da qualidade dessa etapa (ALFA, 2013; CLOUTMAN-GREEN *et al.*, 2015; DURO, 2013). A combinação de dois métodos, simultaneamente, pode ser útil dada a diferente natureza química desses resíduos (CLOUTMAN-GREEN *et al.*, 2015). Na prática, métodos para a monitorização dos níveis de ATP e proteínas são os mais utilizados.

A mensuração dos níveis de ATP, por bioluminescência, tem se mostrado como alternativa à complementação da avaliação visual, pois permite a monitorização do processo em tempo real. Ademais, sua utilização é simples e a leitura do resultado imediata, fornecendo um resultado quantitativo, o que define critérios objetivos para a avaliação da qualidade da limpeza.

O teste é realizado, por meio da obtenção de um suabe da superfície a ser avaliada, que é imerso em um tubo, contendo reagente e logo inserido em um dispositivo portátil para a leitura. A mensuração é realizada de forma indireta, utilizando-se o ensaio de bioluminescência de luciferina-luciferase, que resulta na geração de um sinal luminoso, convertido em unidades relativas de luz (RLU), por meio de um leitor denominado luminômetro em poucos segundos. A quantidade de luz emitida nesta reação é proporcional ao nível de ATP, possibilitando, assim, a mensuração de resíduos de matéria orgânica, na superfície avaliada, tanto como a contaminação microbiana, uma vez que o ATP está presente na célula de todos os organismos vivos (BOMMARITO; WITCHER; THORNHILL, 2011).

Essa técnica, contudo não pode ser empregada como um marcador de contaminação microbiana, uma vez que mede todo o ATP celular e não apenas aquele proveniente de microrganismos (ALFA; FATIMA; OLSON, 2013; GRIFFITH *et al.*, 2000; HANSEN; HILGENHONER; POPP, 2008; SHAMA; MALIK, 2013). Assim, pinças com níveis elevados de ATP, em seguida ao procedimento cirúrgico, não necessariamente apresentam contaminação bacteriana em sua superfície, visto que se trata de uma molécula que pode se originar de outros resíduos (SAITO *et al.*, 2014).

Na literatura, não há consenso sobre os níveis adequados de ATP a serem considerados, para instrumentais cirúrgicos, pois verificaram-se valores de limite diversos que variam entre 30 e 150 RLU (HEATHCOTE; STADELMANN; 2009; LING; LIM; GOH, 2015; VEIGA-MALTA, 2016). Nas unidades de processamento, os níveis de ATP podem ser padronizados, conforme uma série histórica construída, no próprio serviço, a fim de determinar a média dos menores valores possíveis de serem alcançados após a etapa de limpeza (LING; LIM; GOH, 2015). Todavia, ao se determinar os níveis aceitáveis para cada serviço, propõe-se um protocolo que abranja a padronização da área avaliada (cm²), a metodologia e o número de amostras obtidas, além do dispositivo utilizado para mensuração, sendo que existe grande variabilidade entre diferentes marcas. Sendo assim, em baixos níveis de contaminação, a mensuração dos níveis de ATP pode não ser adequada (WHITELEY; GLASBEY; FAHEY, 2016).

A monitorização dos níveis de proteína, também, pode ser utilizada com a finalidade de avaliar a qualidade da limpeza, pois pode representar o maior resíduo presente em instrumentais cirúrgicos após o uso (CLOUTMAN-GREEN *et al.*, 2015). Esse comportamento é incentivado, acima de tudo, em países com alto risco de transmissão da doença de *Creutzfeldt Jacob*, caracterizada pela presença de príon, um fragmento de proteína resistente à maioria dos métodos utilizados no processamento de PPS (PERRETT; NAYUNI, 2014; UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). A redução nos níveis de proteína total diminui também a carga de proteína priônica, quando presente.

No Reino Unido, o departamento de saúde definiu como limite máximo de proteína aceitável, em instrumentais cirúrgicos, o equivalente a 5µg de albumina sérica bovina por lado do instrumental (UNITED KINGDON DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Em seguida à limpeza em lavadora desinfectora, 66% dos instrumentais cirúrgicos apresentavam contaminação por proteínas (>4,2µg/mm²) e

apenas 7% apresentaram baixo nível de contaminação (até 420ng/ mm²) (LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2008). Estudos prévios demonstraram a presença de instrumentais cirúrgicos, aptos ao uso, apresentando carga microbiana de até 1173µg (BAXTER *et al.*, 2006) ou 2228 mg por instrumental (MURDOCH *et al.*, 2006), evidenciando o risco de contaminação cruzada a partir desses instrumentais.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para a determinação da carga proteica em instrumentais cirúrgicos. Os *kits* baseados em testes colorimétricos são práticos e de fácil aplicabilidade na rotina dos serviços de processamento. Seu uso exige a aplicação de suabe umidificado que deve ser rolado na superfície do instrumental e, em seguida, introduzido em uma solução que contém o reagente (UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a). Esses testes fornecem resultados semiquantitativos, por meio da mudança de cor dos reagentes, que pode ocorrer na presença de até 1 µg de proteína. As duas principais metodologias aplicadas incluem testes baseados na reação de biureto, incluindo suas variantes e no uso de ninidrina (LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2016; PERRETT; NAYUNI, 2014).

A reação de biureto caracteriza-se pela mudança de cor de azul para violeta, em soluções de sulfato de cobre, quando em meio alcalino, na presença de proteínas (PERRETT; NAYUNI, 2014). Este achado é a base, para um outro teste, amplamente empregado na detecção de proteínas, que inclui o uso de ácido bicinconínico. Neste caso, a amostra é, inicialmente, misturada a uma solução alcalina contendo sal de cobre. O íon cúprico (Cu²⁺) sequestra as ligações peptídicas, resultando em sua redução para íon cuproso (Cu⁺) que reage com o ácido bicinconínico provocando a mudança na coloração da solução, que se torna roxa (PERRETT; NAYUNI, 2014).

Na comparação entre dois métodos de monitoração de limpeza, a utilização de teste de ATP apresentou vantagens, quanto ao uso de testes de proteína, baseado na reação de biureto (VEIGA-MALTA, 2016). De acordo com os resultados deste estudo, instrumentais cirúrgicos com resultado negativo, para a detecção de proteína, foram classificados como não adequados pelo teste de ATP. As principais limitações apontadas ao uso desse teste foram a dificuldade, para determinar precisamente a coloração assumida pelo teste, após a reação e o tempo de incubação inadequado, resultando em leituras não confiáveis.

Em testes que utilizam a ninidrina, este composto reage com o grupo α-amino de aminoácidos primários, em pH em torno de 5,5, resultando na produção de

CO₂, NH₃ e um aldeído com um carbono a menos que o original (BHAGAVAN, 2002; PERRETT; NAYUNI, 2014). A mudança de coloração de amarelo para azul/violeta resulta da reação do NH₃ com a ninidrina (BHAGAVAN, 2002). Todavia estudos recentes demonstraram a baixa sensibilidade da ninidrina na detecção de proteínas, além da limitação no emprego da técnica de suabes umedecidos em água na remoção de proteínas aderidas à superfície de instrumentais cirúrgicos (NAYUNI *et al.*, 2013).

Uma proposta é o uso de técnicas, para a detecção de proteínas, baseados em fluorescência, ou seja, emissão de luz a partir de uma amostra que se deseja analisar (PERRETT; NAYUNI, 2014). Assim, os resíduos de proteínas, previamente corados por um marcador de proteína fluorescente (SYPRO Ruby), podem ser visualizados por meio de microscopia de contraste de interferência diferencial/epifluorescência (HOWLIN *et al.*, 2009; LIPSCOMB *et al.*, 2006a; LIPSCOMB; SIHOTA; KEEVIL, 2006, 2008). Nesse mesmo método, existem ainda soluções em forma de *spray* que permitem a detecção, localização e mensuração do nível residual de proteína em toda a superfície do instrumental (ProReveal) (PERRETT; NAYUNI, 2014).

Apesar de representar um dos resíduos mais importantes na contaminação de instrumentais cirúrgicos, a presença de microrganismos, não pode ser facilmente evidenciada na prática. Estudos que abordam a avaliação da contaminação microbiana de instrumentais cirúrgicos (CHAN-MYERS; MCALISTER; ANTONOPLOS, 1997; CHU *et al.*, 1999; EVANGELISTA *et al.*, 2015; SAITO *et al.*, 2014) utilizam a infraestrutura e técnica laboratorial, o que impede seu uso de forma rotineira nos serviços de processamento.

O nível residual de hemoglobina é útil em instrumentais que têm contato direto com sangue (CLOUTMAN-GREEN *et al.*, 2015). O teste, para a presença de hemoglobina, é realizado, por meio de uma reação enzimática na presença de sangue em um suabe, que altera a cor da solução na presença de uma quantidade de hemoglobina estabelecida pelo fabricante. O monitoramento da etapa de limpeza deve ser realizado com periodicidade definida, em protocolo da unidade processadora, mantendo-se o registro desses dados (BRASIL, 2012a).

2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Bactérias possuem duas formas de vida distintas, a planctônica, na qual as células podem mover-se livremente, ou sésil, em que as células microbianas formam estruturas organizadas chamadas de biofilmes (GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008; LINDSAY; VON HOLY, 2006). O biofilme é a forma mais comum e mais bem-sucedida de sobrevivência de microrganismos no ambiente (FLEMMING *et al.*, 2016). Estruturalmente, eles são compostos por uma pequena proporção de microrganismos (cerca de 10%), com uma única ou multiespécies, sendo o restante representado pela matriz polimérica, que os envolve.

Naqueles constituídos por multiespécies, os microrganismos podem se estabelecer de forma independente ou apresentarem interações entre os grupos envolvidos (FLEMMING *et al.*, 2016). Quando estabelecem relação de sinergismo, os microrganismos cooperam entre eles (FLEMMING *et al.*, 2016), resultando, em geral, em aumento de resistência a antimicrobianos ou à resposta imunológica dos pacientes. Em relações de antagonismo, esse microrganismos podem competir por nutrientes e provocarem inibição de crescimento microbiano entre as espécies (SCHWERING *et al.*, 2013).

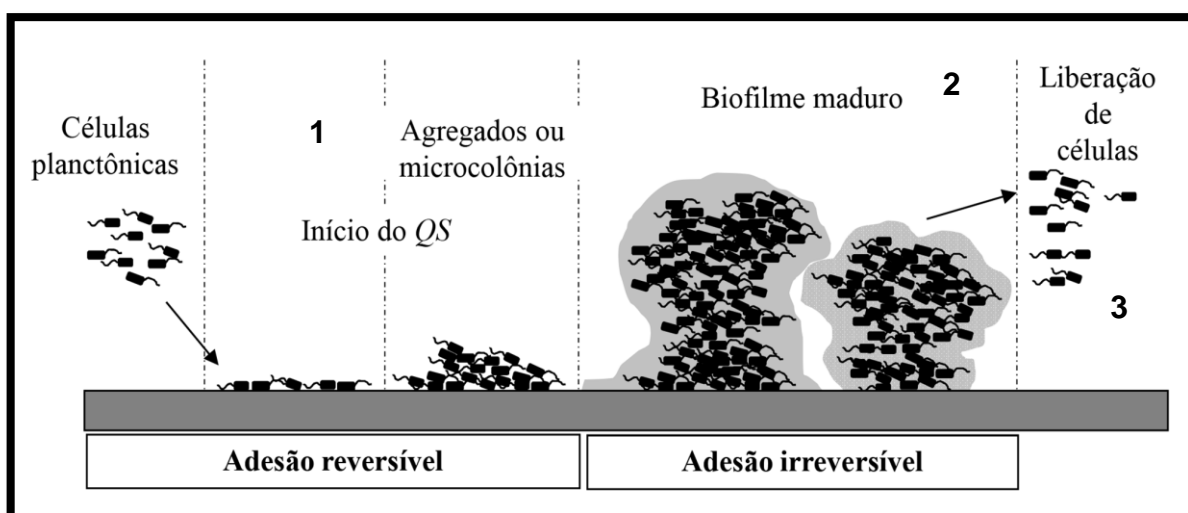
A matriz, por sua vez, é resultante da aglomeração de EPS, na qual, em torno de 97% da sua estrutura é composta por água, assemelhando-se a um hidrogel, além de ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, lipídios, minerais ou componentes do sangue, dependendo do ambiente em que se desenvolvem (FLEMMING *et al.*, 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; HALL-STOODLEY *et al.*, 2012).

O processo que leva à formação de um biofilme é contínuo e envolve a fixação de microrganismos a uma superfície, sua multiplicação e coagregação em multicamadas, produção de EPS e dispersão microbiana (DIETRICH *et al.*, 2013; LINDSAY; VON HOLY, 2006; OTTO, 2009). Didaticamente, esse processo pode ser dividido em três estágios, como apresentado na **FIGURA 1**.

A aderência inicial de microrganismos é a primeira etapa de formação do biofilme. Caracteriza-se por ser um processo reversível, resultante de uma série de interações simultâneas (DONLAN, 2001a). 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 nutriente, pH, condições de fluxo) (DONLAN, 2001a; GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008; ROBERTS, 2013).

Figura 1 - Estágios de formação do biofilme: 1) aderência inicial e formação de microcolônias, 2) maturação e 3) dispersão.



Fonte: adaptado de Macedo e Abrahan (2009).

Em instrumentais cirúrgicos, a aderência microbiana pode ocorrer diretamente ou mediada pela formação de um filme condicionante (LINDSAY; VON HOLY, 2006). O processo de aderência direta envolve a aproximação (menor que 1 nanômetro) de microrganismos à superfície, que pode ocorrer de forma aleatória ou por meio de mecanismos de quimiotaxia ou de motilidade. A probabilidade de aderência resulta então de um balanço entre forças atrativas e repulsivas (interações eletrostáticas, carga elétrica superficial celular e da superfície, forças de van der Waals e força hidrodinâmica) exercidas entre a superfície a ser colonizada e o microrganismo (DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; SCHEUERMAN; CAMPER; HAMILTON, 1998; TRENTIN; MACEDO, 2013; VERMELHO; BASTOS; SÁ, 2007).

Na aderência mediada, inicialmente, moléculas e pequenas partículas são transportadas para a superfície de colonização, por difusão molecular ou mesmo pela força gravitacional, formando uma camada de condicionamento de composição uniforme, que tem influência importante na fase subsequente de adsorção e atração de microrganismos para a superfície (LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001). Os

componentes dessa camada condicionante podem alterar características da superfície favorecendo a aderência microbiana (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008). Em PPS reutilizáveis, o filme condicionante é formado, a partir da precipitação de fluidos corporais, que facilitam a aderência microbiana subsequente (ROBERTS, 2013).

Nesta etapa inicial, a interação entre o microrganismo e a superfície é mantida por ligações químicas fracas (DONLAN, 2001a), havendo, assim, maior probabilidade de remoção dessas estruturas. Quando não são removidos por meio da limpeza, esses microrganismos iniciam um processo de multiplicação e agregação celular que resulta em uma aderência irreversível decorrente do seu processo de desenvolvimento (ROBERTS, 2013).

A maturação do biofilme ocorre, por meio de um processo contínuo, dinâmico e oneroso, do ponto de vista do alto consumo de energia, que envolve a síntese e a excreção de EPS que se liga a moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante formando a matriz, estrutura fundamental na sua formação e manutenção (DUNNE, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016). A composição do EPS pode variar entre diferentes biofilmes, a depender do microrganismo presente, condições de fluxo no ambiente, temperatura e disponibilidade de nutrientes (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Na estrutura do biofilme, a matriz desempenha diversas funções. Determina a organização espacial (microestrutura morfológica) e a estabilidade do biofilme, mantendo as células bem próximas, o que lhes permite estabelecer interações do tipo comunicação célula-célula e as relações de sinergismo entre microrganismos de diferentes espécies (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Contribui também à manutenção de um *habitat* favorável, atuando na obtenção, armazenamento e circulação de nutrientes e outras moléculas por meio de canais (DONLAN, 2001a). Atua, ainda, como um sistema digestivo externo, para os microrganismos nela embebidos, estabilizando as enzimas digestivas extracelulares produzidas, metabolizando componentes celulares provenientes de lise celular e os disponibilizando como fonte de energia (FLEMMING *et al.*, 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

A matriz tem papel crítico, ainda, na capacidade de resistência a agentes externos agressivos, a exemplo dos antimicrobianos (DONLAN, 2001a; DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016; LAZAR, 2011). Neste sentido, atua

como uma barreira física protetora aos microrganismos aí contidos, conferindo-lhes uma resistência natural, que não é inerente à sua forma planctônica, mas decorrente da expressão fenotípica ou comportamental típica de biofilmes, conhecida como recalcitrância ou tolerância (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004; LAZAR, 2011).

Diversos mecanismos estão envolvidos nesse aumento da resistência, como a neutralização ou diluição de moléculas nocivas pela matriz antes que possam atingir os microrganismos, a presença de zonas de dormência, ou seja, microrganismos com baixa taxa metabólica, o que prejudica, por exemplo, a atuação de antimicrobianos, além de subpopulações resistentes no interior dos biofilmes e ainda a transferência horizontal de genes de resistência (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004; FLEMMING *et al.*, 2016).

A etapa de maturação resulta, então, na formação de uma estrutura tridimensional, compacta na qual a fixação dos microrganismos torna-se irreversível, na ausência de intervenção química ou física (DONLAN, 2001a; DUNNE, 2002).

A última etapa envolvida na formação de biofilmes é a fase de desagregação ou ruptura, a qual consiste na dispersão de microrganismos, a partir do biofilme, por meio de perda de bactérias em pequenos grupos, via processo contínuo de erosão ou desprendimento de grandes grupos de células, sendo esse menos frequente (LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001). A desagregação pode relacionar-se a diversos fatores, como uma perturbação externa ou a processos internos no biofilme (degradação enzimática endógena e liberação de EPS ou proteínas ligadoras de membrana), à ausência ou dificuldade de difusão de nutrientes e/ou oxigênio, à diminuição do pH e acúmulo de metabólitos secundários tóxicos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004; FLEMMING *et al.*, 2016).

A dispersão pode se dar pela liberação de células individuais, grupos de células ainda envoltas em EPS ou, por meio da migração de bactérias pela superfície (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004), o que gera uma remodelação contínua da matriz de EPS (FLEMMING *et al.*, 2016). Esses fragmentos ou células dispersas podem colonizar novas superfícies ou causar novos episódios de infecção (FLEMMING *et al.*, 2016).

O complexo processo de formação desagregação de biofilme é controlado, em parte, por um mecanismo de comunicação entre bactérias que ocorre, por meio da transmissão de sinais elétricos, ou mais comumente, pela troca de pequenas

moléculas orgânicas ou proteínas (FLEMMING *et al.*, 2016; WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG, 2017). Os sistemas que utilizam sinalização química são conhecidos como *quorum-sensing* e atuam por meio da liberação extracelular de moléculas conhecidas como autoindutores pelas bactérias (FLEMMING *et al.*, 2016; JAYARAMN; WOOD, 2008; PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Os autoindutores se acumulam no microambiente dos microrganismos em resposta à densidade populacional bacteriana aumentada (JAYARAMN; WOOD, 2008; PAPENFORT; BASSLER, 2016). Essas moléculas são captadas pelas células vizinhas e induzem à expressão de genes específicos (FLEMMING *et al.*, 2016; FUX *et al.*, 2005; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004; JAYARAMN; WOOD, 2008; PAPENFORT; BASSLER, 2016; WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG; 2017).

Apesar da capacidade bacteriana em detectar a sinalização, em qualquer concentração, a comunicação mediada por autoindutores, frequentemente, ocorre com uma forma de concentração dependente (JAYARAMN; WOOD, 2008). Assim, as bactérias monitoram os níveis de autoindutores, para promoverem mudanças em seu número de células e alterar coletivamente o padrão global de expressão de genes, visando à adaptação e à sobrevivência das mudanças ambientais contínuas (JAYARAMN; WOOD, 2008; PAPENFORT; BASSLER, 2016). Processos assim controlados são improdutivos e onerosos, quando realizados por uma única célula microbiana, mas se tornam efetivos em grupo, acontecendo, portanto, em condições de alta densidade populacional (JAYARAMN; WOOD, 2008; PAPENFORT; BASSLER, 2016).

A comunicação via *quorum sensing* ocorre tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas por meio de diferentes moléculas sinalizadoras (WHITELEY; DIGGLE; GREENBERG; 2017). Em bactérias Gram-negativas, a classe mais comum de autoindutor é a acil homoserina lactona (transcrita pelo gene *LuxI*-type sintetase) que se difunde livremente dentro e fora da célula ligando-se a receptores específicos no interior da membrana ou no citoplasma (PAPENFORT; BASSLER, 2016). Em bactérias Gram-positivas, difere-se tanto pelo tipo da molécula do autoindutor, que, neste caso, é um peptídeo (*autoinducing peptídeo*, AIP) quanto pelo mecanismo de reconhecimento de sinalização e detecção.

O AIP é sintetizado, como um peptídeo precursor, modificado e exportado das células, utilizando-se maquinário de transporte de proteínas (JAYARAMAN;

WOOD, 2008). A sinalização e reconhecimento do AIP ocorre não pela ligação direta com um receptor, mas por meio de um sistema de transdução com sinalização de dois componentes, nos quais o AIP liga-se a um sensor histidina quinase ligadora de membrana, e as informações vinculadas são retransmitidas à célula, por meio da fosforilação de uma proteína reguladora de resposta que finalmente se liga ao gene promotor- alvo para regular a expressão gênica (JAYARAMAN; WOOD, 2008).

Os métodos disponíveis, para a análise de biofilmes, empregam cultura microbiológica, após o desprendimento de microrganismos embebidos na matriz, por meio de raspagem e/ou sonicação ou de igual modo pela combinação de sonicação e agitação ou sua visualização por técnica de microscopia eletrônica diretamente na superfície de aderência (COENYE; NELIS, 2010; DEVA; ADAMS; VICKERY, 2013; LINDSAY; VON HOLY, 2006). A técnica de sonicação tem se mostrado efetiva remoção, para posterior isolamento de microrganismos envolvidos e tem sido utilizada ao diagnóstico de infecção relacionada a próteses de joelho e quadril (TRAMPUZ *et al.*, 2007).

No entanto, dada a estrutura complexa dos biofilmes, o emprego de métodos não destrutivos, que permitam compreender melhor sua microestrutura morfológica, formação, desenvolvimento, resistência e as interações microbianas na matriz do biofilme se fazem necessários (COENYE; NELIS, 2010). Os métodos visuais incluem a microscopia de epifluorescência, utilizando corantes ou microscopia eletrônica de varredura, de transmissão ou de força atômica que fornece informações sobre as propriedades da superfície.

2.2.1 Biofilme como um desafio para o processamento de instrumentais cirúrgicos

Microrganismos podem formar biofilmes em, praticamente, todas as superfícies, sejam bióticas ou abióticas. Sua presença representa uma preocupação, em diversos setores, sobretudo na área de saúde, uma vez que, quando presentes, representam um reservatório de bactérias que pode se relacionar a infecções crônicas, além de proteger as células microbianas da ação de antibióticos e esterilização (ALFA, 2013; GARRET; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Em pacientes, a presença de biofilmes, em tecidos corporais (pulmão, ouvido, válvulas cardíacas e feridas) e em dispositivos médicos implantáveis (tubo endotraqueal, cateteres venosos e urinários), associa-se a quadros crônicos de infecção (HALL-STOODLEY *et al.*, 2012; LINDSAY; VON HORY, 2006). Em PPS passíveis de processamento, a presença de biofilme é relatada, ainda que após processo de desinfecção, em endoscópios (REN-PEI *et al.*, 2014), ou em instrumentais cirúrgicos, depois da esterilização (COSTA *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2018).

Instrumental utilizado para a obtenção de amostras de tecidos ósseos apresentou uma cavidade interna inacessível, durante a limpeza, que permitiu a permanência de sujidade e a recuperação de *S. coagulase-negativa* nesses dispositivos mesmo depois do processo de esterilização (STAUBITZ; RAY; HARRIS, 2017). Neste caso, o problema foi solucionado, substituindo-se o referido instrumental por outro, de mesma função, cujo *design* permitia que fosse desmontado durante o processamento. Assim, todos os esforços devem ser feitos a fim de encaminhar a esterilização a um produto livre de biofilmes.

A ocorrência de ISC, relacionada à sobrevivência de microrganismos, após limpeza inadequada, em especial, em PPS com *design* complexo, tem sido relatada. A retenção de sujidade, em cânulas de artroscopia e no canal de sucção da peça manual de *shavers*, relacionou-se à falha da esterilização desses produtos e à ocorrência ISC em pacientes submetidos à artroscopia (TOSH *et al.*, 2011). Resultado semelhante foi observado por Parada *et al.* (2009) que descreveram um surto de cinco casos de artrite séptica, em seguida à reconstrução do ligamento cruzado anterior, atribuído à retenção de sujidade na porção canulada de um sistema de fixação tibial.

Outro estudo conduzido, em pacientes com ISC pós-craniotomia, identificou o tempo prolongado de ressecamento de matéria orgânica e o *design* complexo de aspiradores cirúrgicos como fatores que determinaram a limpeza e, conseqüentemente, esterilização inefetiva nesses produtos (SHEITOYAN-PESANT *et al.*, 2017). Tais achados ressaltam a relevância da limpeza adequada no processamento de PPS. A presença de microrganismos viáveis, na superfície de instrumentais cirúrgicos aptos ao uso, pode contribuir para a ocorrência de ISC (DANCER *et al.*, 2012).

Apesar de bem estabelecidas, a não adesão às boas práticas de processamento de PPS é relatada, principalmente, em países de média e baixa renda

em decorrência, em especial, da falta de treinamento dos profissionais e de insumos básicos como, escovas e detergente apropriados, secagem, falhas na utilização de um fluxo unidirecional (FAST *et al.*, 2017; O'HARA *et al.*, 2015). Um levantamento realizado, por meio do sistema de registro de segurança do paciente na Pensilvânia, identificou um aumento no número de eventos agudos associados à presença de material biológico, em instrumentais cirúrgicos entre 2005 e 2015, decorrente de seu processamento inadequado (DAVIS, 2017).

O processamento de PPS tem papel fundamental na prestação de cuidado seguro e prevenção da transmissão de agentes infecciosos, sendo apontado como uma medida importante na redução das taxas de ISC (ANDERSON *et al.*, 2014; AORN, 2017; RUTALA; WEBER, 2019; WHO, 2009, 2016a). Apesar de a maioria das ISC relacionarem-se a microrganismos de origem endógena, ou seja, da própria microbiota do paciente podem derivar também de fontes exógenas, como instrumentais cirúrgicos contaminados que são introduzidos nos pacientes, durante sua utilização (ALFA, 2019; WHO, 2016a), o que justifica a exigência de sua esterilização entre o uso em diferentes pacientes. A exemplo de sua importância, a confirmação da esterilidade do instrumental é um dos itens incluídos no *time out*, ou seja, antes da incisão, na lista de verificação de cirurgia segura (WHO, 2009).

A possibilidade de aderência microbiana e formação de biofilme, em instrumentais cirúrgicos, relaciona-se ao seu contato direto e prolongado com matéria orgânica e inorgânica, além de microrganismos, que pode se dar não somente no ato cirúrgico, mas também durante toda a etapa de limpeza até que seja realizada a esterilização. Aliás, a presença de outros resíduos orgânicos e inorgânicos, como áreas de difícil acesso à limpeza, em instrumentais como serrilha, articulação e cremalheira, levam à possibilidade de formação e permanência de biofilme nesses materiais (COSTA *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2019; RUTALA; WEBER, 2019; WHO, 2016a). Contudo o processo de formação de biofilme, como ocorre de forma gradual, pode ser interrompido se a limpeza e esterilização forem realizadas prontamente após o uso.

Alguns patógenos são comumente associados à contaminação de instrumentais cirúrgicos, como *Staphylococcus aureus*, SCN e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre eles destaca-se *S. epidermidis* pela alta frequência com que é isolado nesses materiais logo após o uso e durante a etapa de limpeza (EVANGELISTA *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2010; RUTALA *et al.*, 1998; SAITO *et al.*,

2014; VILAS-BOAS; LEVY; FREITAS, 2009). Tal ocorrência pode relacionar-se ao fato de que essa bactéria é um colonizante comum de pele e mucosas.

Pertencente ao grupo dos SCN, esses microrganismos apresentam forma de cocos Gram-positivos agrupados em cachos (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; OTTO, 2009) e, na maioria das vezes, estabelece uma relação de simbiose com humanos. Entretanto podem apresentar potencial patogênico, quando em contato com o tecido do hospedeiro, por meio de ruptura de barreira cutânea, inoculação ou implante de dispositivos médicos, o que foi demonstrado a partir de 1980 (BECKER; HEILMANN, PETERS, 2014).

Sua relevância como causador de infecções tem sido ressaltada, em pacientes idosos, portadores de multipatologias e imunocomprometidos. Tem sido reconhecido, ainda, como importante agente causal de infecções relacionadas a dispositivos médicos implantáveis (cateter venoso central, próteses, marcapasso, implantes mamários) por sua capacidade de formação de biofilme nesses materiais (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; O'GARA; HUMPHREYS, 2001; OTTO, 2009).

S. epidermidis foi o agente etiológico em 31% dos casos de infecções associadas a cateter vascular (EHLERS *et al.*, 2018) e representou 9% de amostras clínicas provenientes de culturas bacterianas positivas de dispositivos médicos inseridos em pacientes hospitalizados (REVDIWALA; RAJDEV; MULLA, 2012). Dados publicados pelo *National Health Care Safety Network* apontam que SCN foi o microrganismo mais frequentemente isolado em ISC e infecções associadas a dispositivos implantáveis nos Estados Unidos.

Esses microrganismos, também, são apontados como reservatório de genes de resistência (OTTO, 2009). No Brasil, *Staphylococcus coagulase negativa* foram os principais agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea em UTI adulto, pediátrico e neonatal com perfil de resistência à oxacilina, variando entre 75% e 80,4% (BRASIL, 2017a).

Casos de infecções relacionadas à permanência desses microrganismos, em instrumentais cirúrgicos, foram reportados em pacientes submetidos a cirurgias limpas ortopédicas e oftalmológicas (DANCER *et al.*, 2012). Apesar do número de infecções ser reduzido, em relação ao volume de procedimentos realizados, a transmissão via dispositivos contaminados, quando ocorre, tem um potencial para causar surtos (FDA, 2018). Por se tratar de uma parcela que pode ser evitada, a

qualidade e a efetividade do processamento de instrumentais cirúrgicos merecem ser analisadas (ALFA, 2013).

Considerando que, segundo o *National Institute of Health*, cerca de 65% a 80% das IRAS são relacionadas à presença de biofilmes (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004). A compreensão da sua dinâmica de formação, tanto quanto as repercussões da sua permanência, na superfície de instrumentais cirúrgicos, repercute diretamente na melhoria da segurança do paciente submetido ao cuidado cirúrgico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo experimental, no qual o pesquisador é um agente ativo, que determina um objeto de estudo (contaminação bacteriana e remoção de *S. epidermidis* em instrumental cirúrgico), seleciona as variáveis capazes de influenciá-lo (tempo de contaminação, tipo de limpeza, área do instrumental) e define formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto (CHEHUEN NETO, 2012; GIL, 2010).

3.2 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), em parceria com o Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA)/Departamento de Microbiologia e com o Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG).

Os experimentos foram conduzidos no laboratório MOA, como a preparação de meios de cultura, esterilização dos fragmentos, cultivo de amostras microbiológicas, contaminação do instrumental, simulação da limpeza dos materiais e preparação inicial de amostras para microscopia.

No CM-UFMG, as amostras foram submetidas às etapas de preparação para se obter micrografias, por meio da análise nos microscópios eletrônicos de varredura Quanta 200 ESEM (FEI™) e FIB – Quanta FEG 3D (FEI™).

3.3 MATERIAL DE ESTUDO

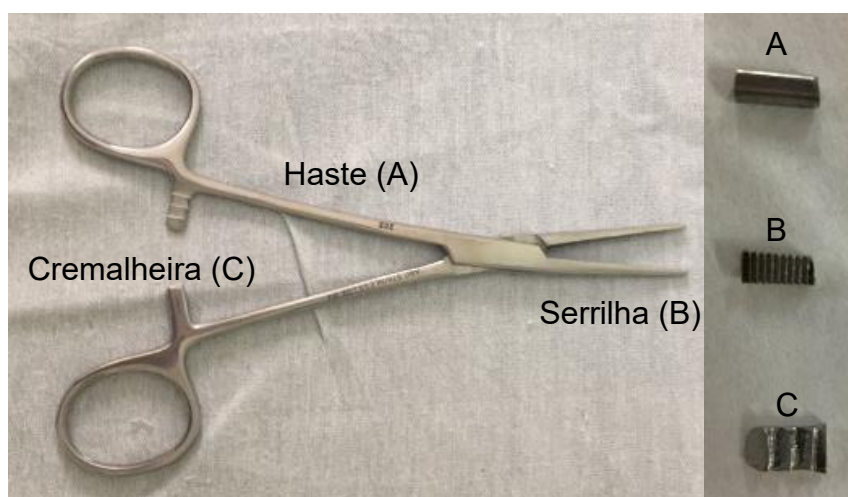
3.3.1 Corpo de prova

Foram utilizadas, como corpo de prova, 108 pinças cirúrgicas do tipo crile reta (ABC instrumentais cirúrgicos, São Paulo, Brasil). Esse instrumental possui função hemostática e é utilizado, durante o procedimento cirúrgico, com a finalidade de prensão da extremidade de vasos seccionados até que seja possível a

hemostasia definitiva. Para os experimentos, foi utilizado instrumental novo, sem uso prévio, fabricado de acordo com padrões internacionais de qualidade, atendendo as normas da ABNT NBR ISO 7153-1 (ABNT, 2006) e registrado junto ao ministério da saúde (REG. MS: 10304850059). De acordo com a referida ISO, esse tipo de material contém porcentagem de carbono que varia entre 0,16 e 0,25, manganês de até 1, fósforo de 0,04, enxofre de 0,03, silício de 1 e cromo entre 12 e 14.

Os instrumentais foram seccionados com o uso de um disco, específico para o corte de aço inoxidável acoplado a uma esmerilhadeira 4.1/2 9557HN (Makita®, Ponta Grossa, Brazil) a qual foi adaptada em sua extremidade um compressor de ar comprimido que auxiliou na refrigeração da pinça, minimizando danos ao metal decorrente do aumento da temperatura. Para manter a padronização, em relação ao tamanho dos fragmentos, a esmerilhadeira foi adaptada a um suporte (Black Jack™). Em cada pinça, foram seccionados três fragmentos de um centímetro, representativos das áreas de serrilha, haste e cremalheira (**FIGURA 2**), perfazendo um total de 216 fragmentos. As três áreas foram definidas por apresentarem diferentes desafios ao processo de limpeza: presença de serrilha, ranhuras na cremaheira e superfície lisa na haste.

Figura 2 - Pinça crile reta (14 cm) e respectivas áreas seccionadas para análise.



Para fins de padronização dos resultados encontrados, os fragmentos foram mensurados com o auxílio de um paquímetro eletrônico e a área total de sua superfície assim definida: cremalheira - 7,4 cm², serrilha – 8,0 cm², haste - 8,3 cm².

Para garantir sua esterilidade, os fragmentos foram à limpeza automatizada, em lavadora ultrassônica (USC-2800, Engesolutions®, São Paulo,

Brasil) (40kHz), enxaguados em água destilada, colocados sobre papel absorvente para secagem, empacotados em SMS (*Spunbonded/Meltblow/spunbonded*) e submetidos à esterilização por vapor saturado sob pressão a 121°C por 15 minutos, como condição prévia à sua contaminação controlada durante o experimento.

3.3.2 Microrganismo utilizado

Foi utilizada uma amostra clínica de *S. epidermidis* que se encontrava criopreservada em freezer a -80°C. Sua identificação foi previamente realizada, por meio de MALDI-TOF (ANEXO A), sendo todos os ensaios realizados, a partir do repique da amostra original criopreservada.

3.3.3 Protocolo do experimento – Modelo *in vitro*

A linhagem bacteriana, mantida refrigerada a 80°C negativos, foi descongelada. Em capela de fluxo laminar (Veco®, Campinas, Brazil), foi semeada em *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e incubada por 18-24 horas a 37° em estufa bacteriológica (Fanen®, Carandiru, Brasil).

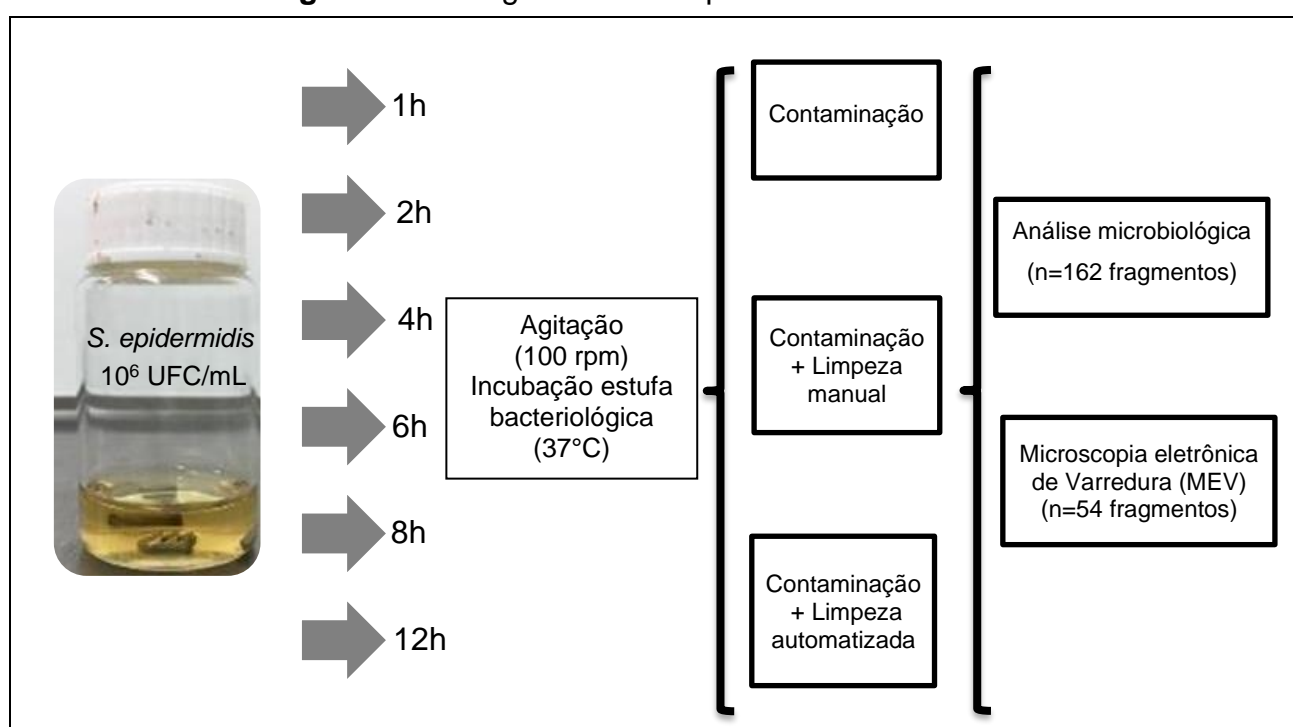
Em seguida ao período de incubação, com o auxílio de uma alça bacteriológica, retiraram-se três a quatro colônias isoladas, que foram prontamente inoculadas em três mL de *Tryptic Soy Broth* (TSB) - (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA). A Densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana resultante foi mensurada com o auxílio de Densi CHECK™ Plus (BioMerieux Inc, Rio de Janeiro, Brasil), a um comprimento de onda de 580 nanômetros (DO₅₈₀). A DO₅₈₀ do inóculo foi ajustada entre 0,56 e 0,60, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 1,5x10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL). Um tubo contendo TSB foi usado como branco para calibração do aparelho.

Uma alíquota de 50 µL da suspensão bacteriana preparada foi transferida para frascos previamente esterilizados, contendo 5 mL de TSB, formando uma solução na concentração de 10⁶ UFC/mL, aos quais foram acrescentados três fragmentos de pinças esterilizados (serrilha, haste e cremalheira), cada um representativo de uma área a ser analisada, como exibido no fluxograma (**FIGURA 3**). Os fragmentos foram depositados nesses frascos de forma a garantir contato

constante com a solução contaminante. Para cada tempo analisado, três frascos contendo os fragmentos foram preparados, sendo um para controle positivo, submetido apenas à contaminação, sem intervenção posterior e dois destinados à avaliação dos protocolos de limpeza propostos (manual ou automatizado).

Os frascos foram então incubados a 37°C, sob agitação constante de 100 rpm em agitador orbital I10-O+ACOP.E (Ovan®, Barcelona, Spain) (**FIGURA 4A**) por 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas totalizando, assim, 18 frascos por ensaio. Para a análise microbiológica, os ensaios foram conduzidos em triplicata biológica, enquanto, para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi conduzido um ensaio.

Figura 3 - Fluxograma das etapas da coleta de dados.



Posteriormente aos respectivos tempos de incubação, cada frasco foi removido do equipamento. Os fragmentos contidos neles foram retirados com o auxílio de uma pinça esterilizada e então submetidos à lavagem, em cabine de fluxo laminar (Veco®, Campinas, São Paulo) (**FIGURA 4B**) para a remoção das células planctônicas.

Figura 4 - A. Agitador orbital (Ovan, I10-O+ACOP.E) com controle de temperatura. B- Cabine de fluxo laminar (Veco®).



Realizou-se a lavagem com 3 mL de água destilada. Os frascos foram homogeneizados, manualmente, por meio de cinco movimentos circulares e a solução descartada. Esse processo foi repetido por seis vezes seguidas. Após a contaminação, os fragmentos foram conduzidos de forma diferenciada conforme o grupo analisado:

a) GRUPO 1: CONTAMINAÇÃO

Fragmentos submetidos apenas à contaminação bacteriana, seguida de enxágue, para a remoção de células planctônicas, como descrito anteriormente, foram encaminhados para a análise microbiológica ou da microestrutura morfológica por meio de MEV. Assim, tratou-se de instrumentais utilizados como controle positivo, para a avaliação da aderência bacteriana à superfície do instrumental, ao longo dos diferentes tempos de contaminação testados.

b) GRUPO 2: CONTAMINAÇÃO SEGUIDA DE LIMPEZA MANUAL

Fragmentos submetidos à contaminação e posterior limpeza manual.

Após a contaminação, fragmentos desse grupo foram depositados em um frasco esterilizado com 5 mL de solução de detergente enzimático que continha seis enzimas (lipase, carboidrase, alfa-amilase, celulase, protease e peptidase) (Indazyme 6 ST, Indalabor®, Dores do Indaiá, Brasil). A solução foi preparada com água destilada esterilizada a 40°C obedecendo-se à orientação de diluição do fabricante (2 mL/litro).

Os instrumentais foram mantidos imersos por 5 minutos (conforme recomendação do fabricante) e, em seguida, transferidos para uma placa de petri esterilizada onde se procedeu à escovação. A fricção da superfície de cada fragmento foi realizada com uma escova plana reutilizável com cerdas flexíveis e macias, em *nylon* (Batrik®, Montreal, Canadá) esterilizada. Os fragmentos foram presos para fricção, com o auxílio de uma pinça esterilizada. A escovação foi realizada por cinco vezes, sempre no mesmo sentido, sendo que, para cremalheira e serrilha, foi realizada em direção às ranhuras (WHO, 2016a).

As escovas utilizadas nesta etapa foram previamente submetidas à limpeza por imersão em detergente enzimático por 5 minutos, enxágue em água corrente, secas, empacotadas e submetidas à esterilização em vapor saturado sob pressão.

c) GRUPO 3: CONTAMINAÇÃO SEGUIDA DE LIMPEZA AUTOMATIZADA

Fragmentos submetidos à contaminação e posterior limpeza automatizada.

A limpeza automatizada foi realizada em lavadora ultrassônica (Unique®) (**FIGURA 5**). Previamente ao experimento, foi realizada a sua qualificação de desempenho pela utilização do teste TOSI®. Os fragmentos foram depositados, em um frasco esterilizado contendo 5 mL de solução de detergente enzimático (o mesmo utilizado no protocolo de limpeza manual) a 40°C e submetidos à limpeza automatizada, em lavadora ultrassônica (modelo USC-2800, Engesolutions®, São Paulo, Brasil) por 10 minutos (WHO, 2016a). Logo após o ciclo de limpeza, fez-se o enxágue dos fragmentos.

Figura 5 - Lavadora ultrassônica (Unique®).



O enxágue foi realizado da mesma forma para os grupos 2 e 3. Os fragmentos foram transferidos para frascos contendo 5 mL de água destilada esterilizada e homogeneizados, manualmente, em movimentos circulares, por 10 segundos. Logo após, foram depositados sobre papel absorvente esterilizado para a drenagem do excesso de água e encaminhados para análise.

Neste experimento, procurou-se controlar possíveis variáveis intervenientes, como a execução da limpeza sempre pelo mesmo pesquisador, durante todo o experimento, a concentração correta do detergente enzimático após a diluição bem como temperatura adequada. Todos os procedimentos de limpeza foram realizados no laboratório.

3.3.3.1 Métodos de análise

A análise dos fragmentos foi realizada, por meio de dois testes analíticos distintos: um destinado à análise quantitativa (cultura microbiológica) com contagem da carga microbiológica por centímetro quadrado (UFC/cm²) e outro de caráter qualitativo, em que se procurou demonstrar a presença de aderência celular e formação de biofilme, por meio de micrografias obtidas, a partir de MEV.

a) Cultura bacteriana

Cada fragmento submetido à contaminação ou ao protocolo de limpeza foi transferido, separadamente, para um tubo de polipropileno esterilizado (Eppi™;

Eppendorf, Hamburg, Germany), contendo 1,1 mL de água miliQ com o auxílio de uma pinça esterilizada. Optou-se pelo uso de um tubo rígido pelo menor risco de contaminação do lavado resultante (TRAMPUZ *et al.*, 2007). Após a transferência, os tubos contendo os fragmentos foram fechados, mantendo-se a esterilidade do conteúdo.

A técnica escolhida, para o desprendimento das células aderidas aos fragmentos, foi a sonicação. Com esta finalidade, procedeu-se à transferência dos tubos para um suporte que foi depositado em um recipiente contendo água destilada. Foi acrescentado gelo na parte externa, a fim de manter a temperatura, com água em torno de 22°C, o que se relaciona ao aumento da viabilidade celular (MONSEN *et al.*, 2009). Os tubos foram posicionados de forma que os fragmentos estivessem totalmente submersos. Foram realizados cinco ciclos de sonicação de um minuto, em um disruptor de células (Unique®, Indaiatuba, Brasil), com intervalo de um minuto entre eles, a uma frequência de 40 KHz. O intervalo entre os ciclos foi utilizado, a fim de evitar o rompimento de células e, em consequência, a perda de viabilidade celular durante o procedimento. Logo depois, os fragmentos foram submetidos à forte agitação em vórtex por um minuto (TRAMPUZ *et al.*, 2007).

A partir do lavado resultante dessa etapa, alíquotas de 50 µL foram semeadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em duplicata, sobre *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Difco®) para o isolamento e quantificação de bactérias totais. Foi realizada a diluição seriada até a concentração de 10^{-4} no grupo de contaminação e 10^{-2} e 10^{-1} nos grupos de limpeza manual e automatizada, respectivamente. As diluições foram determinadas, conforme crescimento microbiológico apresentado, durante o estudo piloto, a fim de se obter placas com contagem microbiológica até 300 UFC. As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica (Fanen®, Carandiru, Brasil) a 37°C, em atmosfera ambiente por 24 horas. Depois desse período, o número de colônias, em cada placa, foi contado manualmente e convertidas em UFC/cm² do fragmento analisado. Para a análise, a contagem de microrganismos, realizada a partir de uma alíquota de 50µl, foi convertida para o número de bactérias no volume total da solução (1.100µl).

b) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi utilizada, para observar, ao longo do tempo, a dinâmica de aderência dos microrganismos ao instrumento e consequente formação de biofilme

nessa estrutura. Para fixação, os fragmentos foram colocados, em tubos de polipropileno esterilizados, aos quais foi acrescentado 1 mL de uma solução de 2.5% de glutaraldeído a 0,2M e mantidos à temperatura de 4°C durante 24 horas. Após esse período, essa solução foi retirada e procedeu-se à lavagem, adicionando-se 1 mL de água destilada ao tubo e removendo-a logo em seguida. A amostra foi, finalmente, acondicionada em 1 mL de tampão fosfato 0,2 M, sendo encaminhada ao CM-UFGM.

No CM, as amostras foram submetidas, em sequência, à fixação secundária, por meio de duas etapas de tetróxido de ósmio, intercaladas com o uso de ácido tânico (método O.T.O), desidratação em concentrações crescentes de álcool (35%, 50%,70%,85% e 95%), secagem em ponto crítico de CO₂, por meio do secador automático Leica EM CPD030 (Wetzlar, Alemanha), montagem em *stubs* (suportes circulares de alumínio) e metalização por meio da deposição de uma camada de ouro. Finalmente, as amostras foram analisadas por MEV nos equipamentos Quanta 200 ESEM (FEI™) ou FIB – Quanta FEG 3D (FEI™). As etapas de preparação das amostras destinadas ao MEV, descritas acima, seguiram o protocolo do CM- UFGM (ANEXO B).

Durante a análise, os fragmentos foram levados ao microscópio e, em cada um, foram selecionados, no mínimo, cinco regiões, para a verificação da microestrutura morfológica do microrganismo aderido.

3.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Para atender os objetivos propostos, foram selecionadas as variáveis:

Variável dependente

a) Carga de *S. epidermidis* em instrumental cirúrgico.

A contagem de microrganismos em UFC/cm² foi determinada em três diferentes momentos:

- Após contaminação dos fragmentos.
- Após limpeza manual.
- Após limpeza automatizada.

Variáveis independentes

a) Tempo de contaminação dos fragmentos

Os fragmentos foram contaminados por *S. epidermidis* por seis diferentes intervalos:

- 1 hora.
- 2 horas.
- 4 horas.
- 6 horas.
- 8 horas.
- 12 horas.

b) Forma de apresentação da bactéria

As bactérias aderidas à superfície dos fragmentos foram classificadas em:

- Aderência inicial – microrganismos aderidos à superfície sem a presença de EPS.
- Biofilme: bactérias aderidas à superfície do instrumental e produzindo EPS.

c) Área do instrumental

Foram definidas três áreas do instrumental, representativas de diferentes desafios ao processo de limpeza:

- Serrilha - superfície irregular.
- Cremalheira - superfície irregular.
- Haste - superfície lisa.

d) Método de limpeza

Foram avaliados dois tipos de limpeza:

- Limpeza manual.
- Limpeza automatizada em lavadora ultrassônica.

3.5 ANÁLISE DE DADOS

Foi realizada a contagem dos microrganismos recuperados dos fragmentos que apresentaram crescimento, em meio de cultura, posterior à etapa de contaminação e de limpeza manual e automatizada. O resultado, representativo de uma alíquota de 50µl, foi convertido, para se obter o número de organismos presente na solução total de recuperação (1100µL). Obteve-se, então, o valor para cada fragmento avaliado em UFC/cm², após padronização, conforme as respectivas áreas: haste (8,4cm²), serrilha (8cm²) e cremalheira (7,4 cm²).

Os dados foram convertidos em log₁₀ e as médias das triplicatas obtidas. A análise descritiva dos dados foi realizada em potência de 10. A análise estatística foi realizada, por meio do teste F(ANOVA), para comparações entre as cargas bacterianas, nas diferentes áreas no material cirúrgico. Quando verificada significância estatística na comparação entre os grupos (controle, limpeza manual e limpeza automática), utilizou-se o teste t-student, a fim de localizar entre quais fragmentos havia diferença. Em relação às comparações entre as cargas bacterianas, em função do tempo entre fragmento do grupo controle, limpeza manual e automatizada, utilizou-se o teste t-student, uma vez que as suposições usuais do modelo (normalidade e homocedasticidade) foram atendidas. O nível de significância considerado para inferência estatística foi de 5% (p = 0,05) e o intervalo de confiança de 95%.

As suposições dos dois testes foram verificadas, mediante a aplicação do teste de Shapiro-Wilk, para a normalidade e o de Levene para homocedasticidade (TRIOLA, 2011).

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de uma pesquisa experimental, em que o objeto de estudo não envolve seres humanos ou material biológico humano, tornou-se dispensável a submissão ao Comitê de Ética e Pesquisa, observando-se a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde para a pesquisa em seres humanos e a norma operacional 001/2013 que dispõe sobre a organização e funcionamento do sistema CEP/CONEP.

4 RESULTADOS

Os resultados deste estudo são apresentados em tópicos. Inicialmente foram demonstrados os dados relacionados à aderência microbiana e à formação de biofilme após exposição à contaminação, sendo abordados tanto pelo aspecto da contagem microbiana quanto da visualização da estrutura morfológica dos microrganismos por meio de microscopia eletrônica. Na sequência, analisou-se a capacidade de remoção desses microrganismos aderidos ao longo do tempo de exposição pelos métodos de limpeza manual e automatizado. Por último, fez-se um comparativo da aderência microbiana entre os três fragmentos analisados, considerando os diferentes designs (serrilha, haste e cremalheira) e grupos analisados (contaminação, limpeza manual e automatizada).

4.1 RECUPERAÇÃO DA CARGA BACTERIANA EM FRAGMENTOS DE INSTRUMENTAL CIRÚRGICO (SERRILHA, HASTE, CREMALHEIRA) SUBMETIDOS À CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Fragmentos de diferentes áreas de pinças crile (serrilha, haste e cremalheira), expostos à contaminação por cepas de *S. epidermidis*, em diferentes intervalos (1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas), foram divididos em três grupos: contaminação, limpeza manual e automatizada. A carga bacteriana recuperada em cada fragmento apresentou elevação, ao longo dos tempos avaliados, como apresentado na **Tabela 1**.

Logo depois de uma hora de contato entre os fragmentos e a solução contendo a amostra de *S. epidermidis*, foi possível a recuperação de microrganismo, em todos os fragmentos analisados, sendo obtida a menor carga microbiana na haste (10^1 UFC/cm²) comparada aos demais fragmentos (10^2 UFC/cm²). Como observado, houve manutenção da carga microbiana recuperada em haste entre os tempos de duas e seis horas (10^2 UFC/cm²), intervalo nos quais fragmentos de serrilha e cremalheira atingiram 10^3 UFC/cm² e 10^4 UFC/cm², respectivamente. Valores semelhantes de carga bacteriana foram observados em haste, serrilha e cremalheira nos pontos de duas (10^2 UFC/cm²) e 12 horas (10^4 UFC/cm²). A maior carga

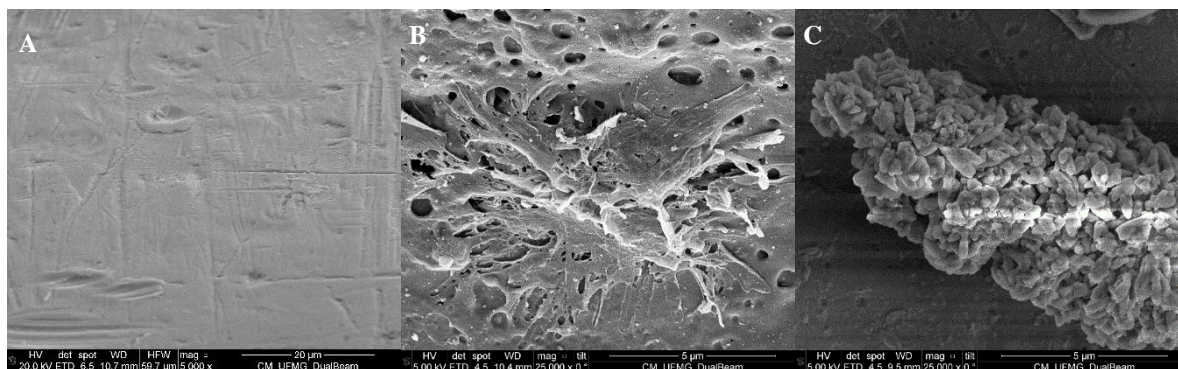
microbiana recuperada entre os fragmentos foi de 10^4 UFC/cm², alcançada pela cremalheira em seis horas, serrilha em oito horas e haste em 12 horas.

Tabela 1 - Média de carga bacteriana, em unidades formadoras de colônias (UFC)/cm², recuperada em instrumental cirúrgico após contaminação por *Staphylococcus epidermidis*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.

Tempo (h)	Tipo de fragmento		
	Serrilha (UFC/cm ²)	Haste (UFC/cm ²)	Cremalheira (UFC/cm ²)
1	4.3×10^2	6.3×10^1	1.8×10^2
2	6.9×10^2	4.2×10^2	2.4×10^2
4	2.7×10^3	5.6×10^2	1.4×10^3
6	6.0×10^3	7.8×10^2	1.1×10^4
8	1.7×10^4	4.6×10^3	1.6×10^4
12	6.4×10^4	2.2×10^4	5.4×10^4

Por meio de MEV, os fragmentos foram analisados quanto às suas estruturas morfológicas, a fim de determinar a adesão microbiana e a formação de biofilme ao longo do tempo. Na **FIGURA 6**, são apresentadas as micrografias de fragmentos utilizados como controle negativo, ou seja, que não foram submetidos à contaminação microbiana. Essas imagens ilustram a superfície do instrumental cirúrgico livre de contaminação (**FIGURA 6A**), após contato com o meio de cultura (TSB) por uma hora (**FIGURA 6B**), do mesmo modo que submetido à imersão em solução de detergente enzimático por cinco minutos (**FIGURA 6C**).

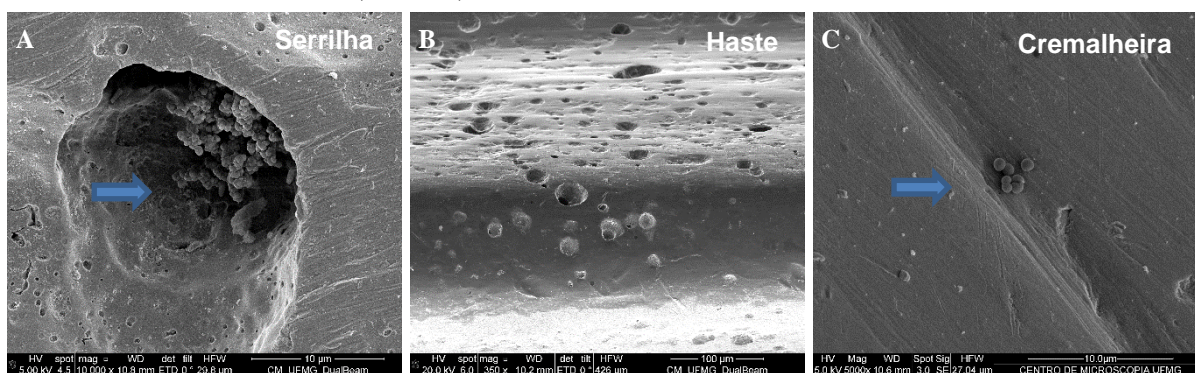
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos utilizados como controle negativo. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Superfície do instrumental cirúrgico; B. instrumental cirúrgico após contato com meio de cultura (TSB) e C. instrumental de aço inoxidável após contato com solução de detergente enzimático. Ampliação original: A = 5000X, B e C 25000X.

Nos fragmentos submetidos à contaminação bacteriana, após uma hora de exposição (**FIGURA 7**), observou-se a aderência de *S. epidermidis* na região de serrilha com a identificação de um agrupamento de células cocoides concentradas em região irregular de sulco do fragmento, arranjadas em multicamadas. No fragmento de haste, contudo não foi observada a presença de microrganismos. Na cremalheira, verificou-se região com *S. epidermidis* em fase de aderência inicial. Esses achados encontram-se indicados por uma seta na figura a fim de facilitar sua identificação

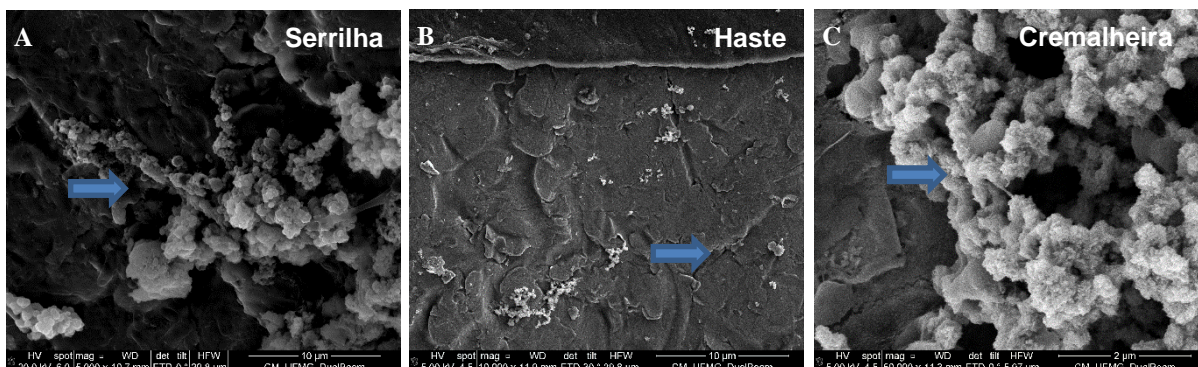
Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após uma hora de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. células cocoides agrupadas em multicamadas em área de sulco em serrilha; B. área de haste sem evidência de aderência bacteriana e C. grupamento de células coccoides aderidas em cremalheira. Ampliação original: 10000X, 350X e 5000X.

Nos fragmentos submetidos a duas horas de contaminação (**FIGURA 8**), evidenciou-se a presença de material amorfo, esbranquiçado, sugestivo de EPS nas áreas de serrilha e cremalheira. A aderência de células em forma de cocos em fragmentos de haste foi observada de forma discreta.

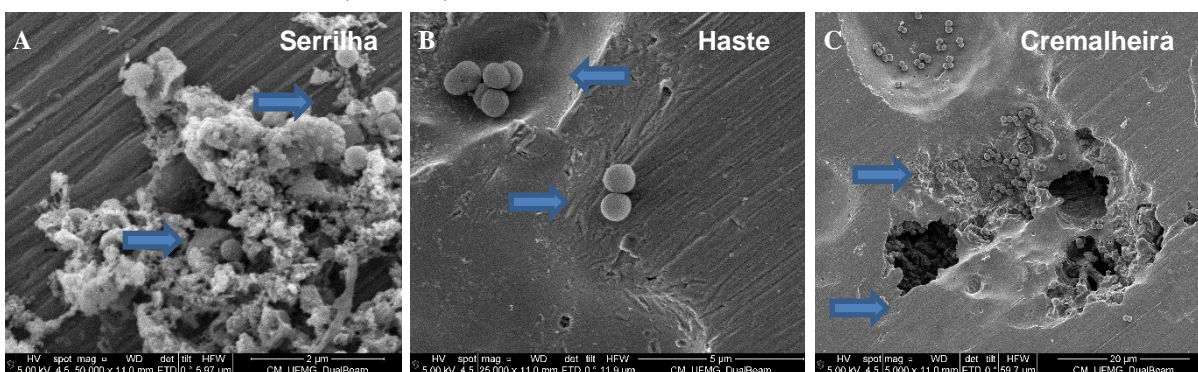
Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após duas horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Células cocoides envoltas em EPS em serrilha; B. discreta aderência de cocos em haste e C. células cocoides envoltas em EPS em cremalheira. Ampliação original: 5.000X, 10.000X, 50.000X.

No tempo de quatro horas (**FIGURA 9**), foi verificada a presença de células cocoides envoltas em material amorfo (EPS) em fragmentos de serrilha. Células de aspecto semelhante, agrupadas aos cachos, foram detectadas em ambos os fragmentos, haste e cremalheira, mas maior concentração de microrganismos foi observada neste último.

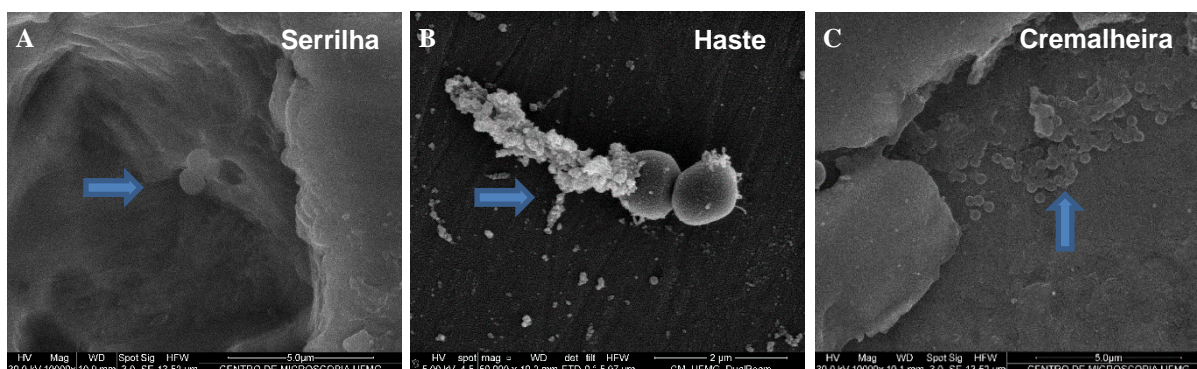
Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após quatro horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Presença de EPS envolvendo células cocoides em serrilha; B. *S. epidermidis* agrupado aos cachos em haste e C. microrganismos agrupados aos cachos em área irregular de cremalheira. Ampliação original: 50000X, 25000X e 5000X.

Na sexta hora (**FIGURA 10**), verificou-se uma aderência bacteriana discreta, em serrilha e haste, porém, nesta última, identificou-se também a expressão de EPS aderido à superfície. Na área de cremalheira, a presença de células cocoides agrupadas foi observada.

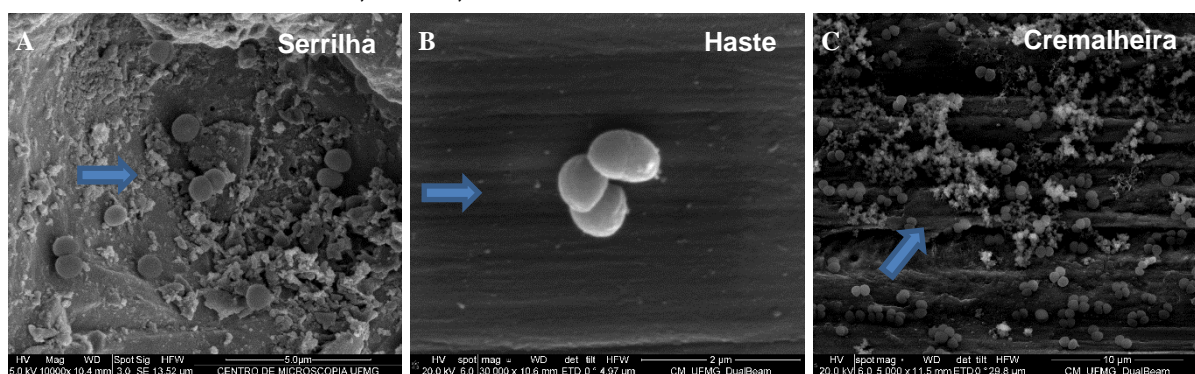
Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após seis horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Aderência bacteriana discreta em serrilha; B. produção de EPS a partir de *S. epidermidis* em haste e C. células cocoides agrupadas em área de cremalheira. Ampliação original: 10000X, 50000X e 10000X.

Após oito horas (**FIGURA 11**) de incubação, a presença de células agrupadas aos pares, em estágio de adesão inicial, foi visualizada em serrilha e haste. Contudo, neste mesmo período, no fragmento de cremalheira, foi identificada maior concentração bacteriana, além de células cocoides envoltas em EPS.

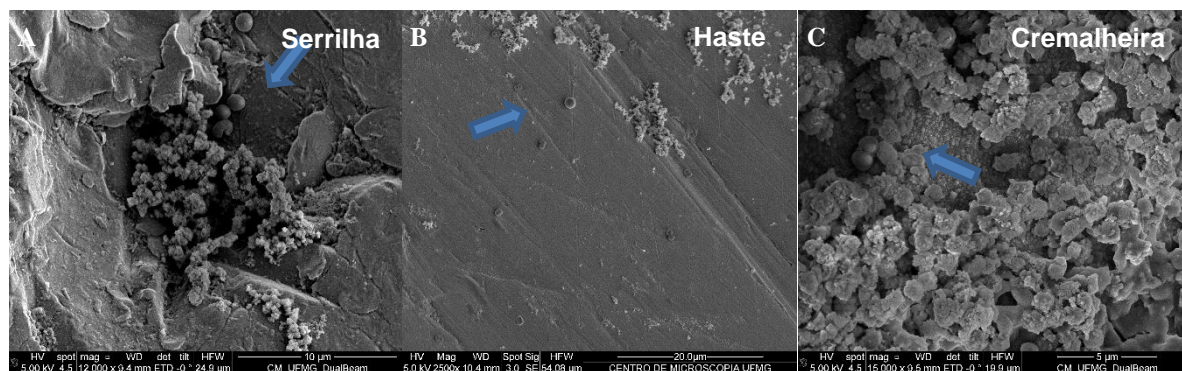
Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após oito horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Células cocoides agrupadas aos cachos em área de serrilha; B. células em adesão inicial em haste e C. maior concentração de células cocoides formando cachos com produção de EPS. Ampliação original: 10000X, 30000X, 5000X.

Depois de 12 horas (**FIGURA 12**), observou-se a presença de biofilmes mais extensos ocupando as áreas de serrilha e cremalheira, sendo possível evidenciar sua formação com aspecto mais denso na área de cremalheira. Para haste, a presença de células cocoides foi evidenciada, assim como a presença de material amorfo, em pequena quantidade, não sendo possível afirmar que se tratava de EPS.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico após 12 horas de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Microrganismos envolvidos em material amorfo sugestivo de EPS em serrilha; B. células cocoides isoladas em haste e C. presença de células cocoides envolvidas em EPS formando biofilme denso em cremalheira. Ampliação original: 12000X, 2500X e 15000X.

4.2 COMPARAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE LIMPEZA: MANUAL X AUTOMATIZADA

A carga bacteriana recuperada nos fragmentos, após aplicação dos protocolos de limpeza, manual ou automatizada, está apresentada na **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Tanto a limpeza manual quanto a automatizada reduziram a carga bacteriana abaixo de 10^2 UFC/cm², em fragmentos expostos à solução com *S. epidermidis* por até 2 horas. Neste intervalo, esses fragmentos demonstraram uma pequena variação, na carga microbiana, entre 1.1 UFC/cm² e 3.2×10^1 UFC/cm².

Tabela 2 - Média de carga bacteriana, em unidade formadora de colônia (UFC) por cm², recuperada em instrumentais cirúrgicos após limpeza manual e automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.

Tempo (h)	Limpeza Manual			Limpeza automatizada		
	Serrilha UFC/cm ²	Haste UFC/cm ²	Cremalheira UFC/cm ²	Serrilha UFC/cm ²	Haste UFC/cm ²	Cremalheira UFC/cm ²
1	8.1	1.0×10^1	6.3	1.4	1.1	1.1×10^1
2	2.8	2.8	3.2×10^1	8.7	3.9	5.7
4	9.0×10^1	1.8×10^1	1.9×10^2	1.9×10^1	5.4	9.4
6	8.7×10^2	6.4×10^1	2.0×10^3	6.3×10^1	1.3	9.8
8	7.6×10^2	2.110^2	2.3×10^3	2.6×10^1	5.54	1.1×10^1
12	5.9×10^3	1.4×10^3	9.8×10^3	1.2×10^2	1.1×10^2	3.2×10^2

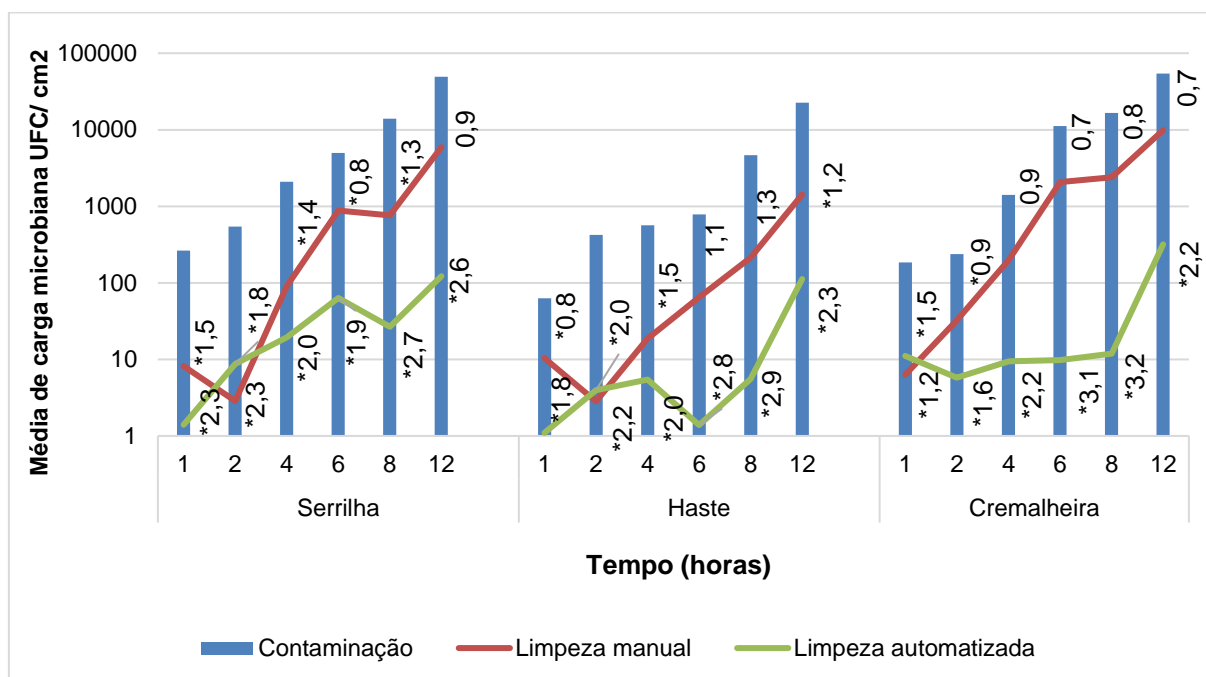
No tempo de 4 horas, contudo notou-se uma diferença da carga microbiana entre fragmentos de haste e cremalheira que apresentaram após a limpeza manual concentração na ordem de 10^1 UFC/cm² e 10^2 UFC/cm², respectivamente e abaixo de 10 UFC/cm² após limpeza automatizada.

Nos tempos subsequentes, de 6, 8 e 12 horas, a carga microbiana recuperada em fragmentos submetidos à limpeza manual foi sempre maior que aquela observada após aplicação do método automatizado. No tempo de 12 horas, a diferença de carga microbiana entre os dois grupos submetidos à limpeza manual foi de 1 log, sendo a maior concentração obtida, após a etapa de limpeza manual (10^3 UFC/cm²), em relação à automatizada (10^2 UFC/cm²).

A comparação entre a carga microbiana obtida em fragmentos submetidos à contaminação, em relação àquela observada, após limpeza manual ou automatizada, é apresentada na **Figura 13**.

Pode-se observar um aumento progressivo de carga bacteriana, ao longo do tempo, no grupo submetido à contaminação, para todos os tipos de fragmentos avaliados, ou seja, o aumento no tempo de contato entre o microrganismo e o instrumental resultou em maior aderência microbiana. A carga bacteriana, após a limpeza manual, acompanhou essa mesma tendência até o ponto de 12 horas, exceto para o tempo de duas horas em fragmentos de serrilha e haste, quando houve uma discreta redução em relação ao valor observado no tempo de uma hora. No grupo submetido à limpeza automatizada, foi observada menor recuperação de microrganismos, não ultrapassando 10^2 até o tempo de oito horas.

Figura 13 - Média de carga bacteriana em unidades formadoras de colônia (UFC) por cm² recuperados em fragmentos de instrumentais cirúrgicos (serrilha, haste e cremalheira), em diferentes intervalos (horas), no grupo submetido à limpeza manual e limpeza automatizada, em relação ao grupo submetido à contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



Os valores apresentados correspondem à fração de redução (**Log₁₀**), observado no grupo de Limpeza manual ou automatizado, em relação ao grupo submetido à contaminação. Quando a diferença foi significativa ($P < 0,05$), os valores foram sinalizados (*).

A redução de carga bacteriana proporcionada pelos dois métodos testados foi calculada pela diferença entre a carga recuperada no grupo de contaminação bacteriana em relação aos grupos de limpeza manual e automatizada e também foram representados na **Figura 13**.

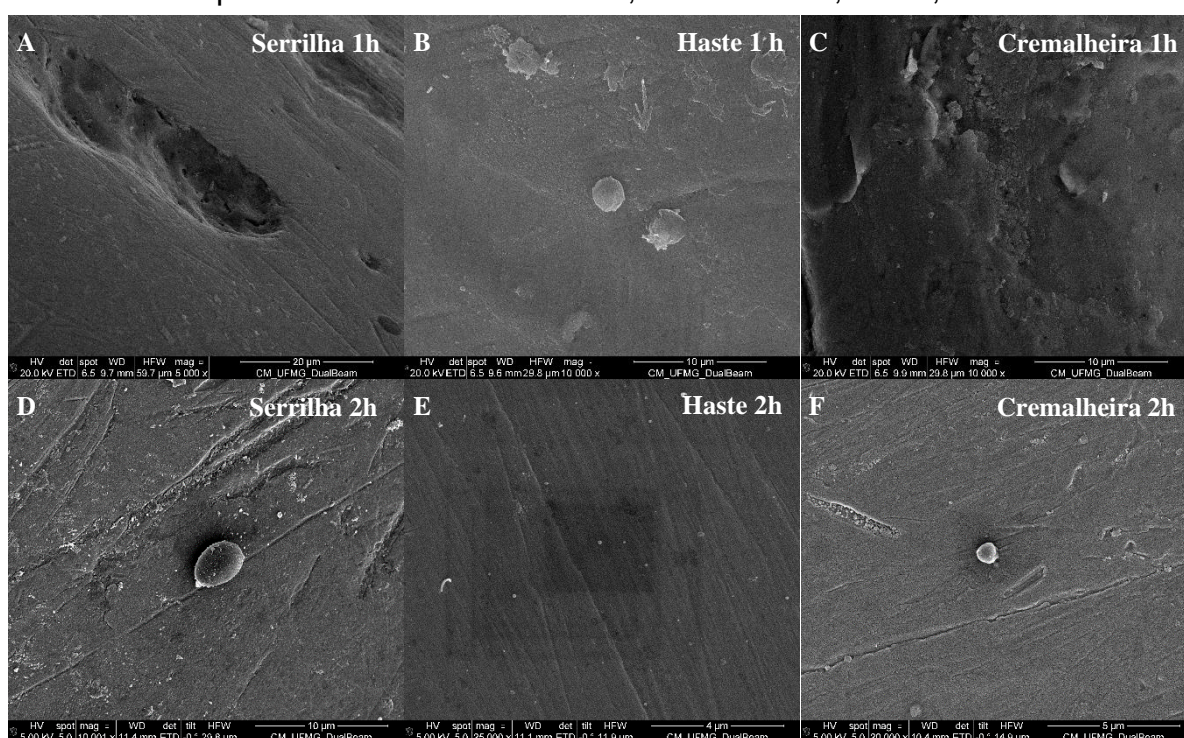
A limpeza manual promoveu uma redução de contaminação bacteriana que variou entre 0,7 e 2,3 log₁₀ UFC/cm², enquanto a limpeza automatizada reduziu entre 1,2 e 3,2 log₁₀ UFC/cm². No grupo de limpeza manual, quando se comparam os três fragmentos, cremalheiras apresentaram menor redução de carga bacteriana, a partir de duas horas, enquanto nos fragmentos de haste, esta redução foi a maior, observada a partir de quatro horas. No grupo de limpeza automatizada, a redução foi mais homogênea entre os grupos e não foi possível determinar um padrão.

Essa redução foi significativa ($p < 0,05$), em todos os tempos e fragmentos submetidos à limpeza automatizada, contudo o mesmo não foi observado em relação à limpeza manual. Neste grupo, não houve significância, no tempo de 12 horas nos

fragmentos de serrilha, nos tempos de seis e oito horas na haste e em quatro, seis, oito e 12 horas para cremalheira. Quando a redução de carga bacteriana foi significativa, os valores da redução proporcionada foram sinalizados (*) na **FIGURA 13**.

Quando submetidos a MEV, não evidenciou-se a presença de microrganismos, nos fragmentos nos tempos de 1 e 2 horas, após contaminação e limpeza manual (**FIGURA 14**).

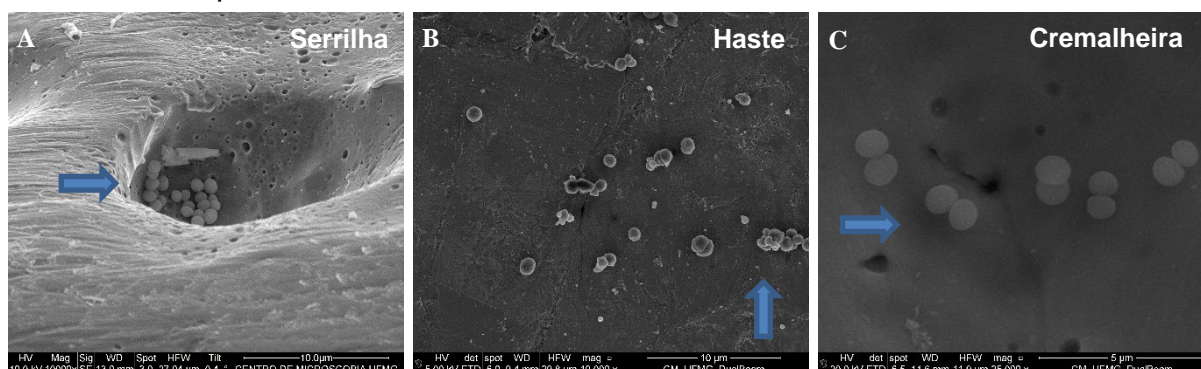
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após uma e duas horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



Fragmentos submetidos à contaminação bacteriana por 1 hora (A. serrilha, B. haste e C. cremalheira) ou 2 horas (D. serrilha, E. haste e F. cremalheira) seguida de limpeza manual, sem evidência de aderência microbiana. Ampliação original: A. 5000X, B, C e D.10000X, E. 25000X e F. 20000X.

A permanência de células com morfologia típica de *S. epidermidis* foi recuperada, no tempo de quatro horas, em todos os fragmentos analisados (**Figura 15**). Destaca-se a presença de bactérias em área de sulco observada em serrilha.

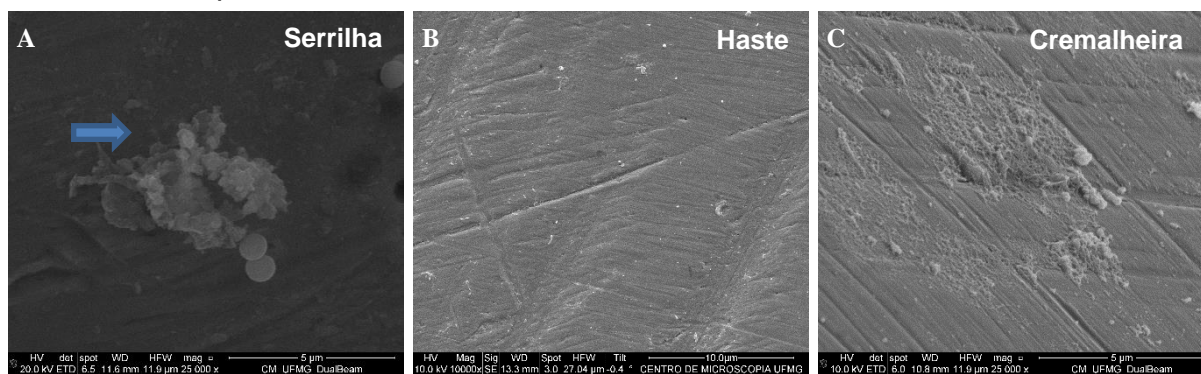
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após quatro horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Acúmulo de células cocoides em área de sulco de serrilha; B. aglomerado de células cocoides em superfície de haste e C. células cocoides aglomeradas aos pares em cremalheira. Ampliação original: A e B. 10000X e C. 25000X.

No tempo de 6 horas, a presença de células cocoides e EPS foi identificada em fragmento de serrilha (**Figura 16**). Nos fragmentos de haste e cremalheira, contudo não foi verificada a permanência de contaminação bacteriana.

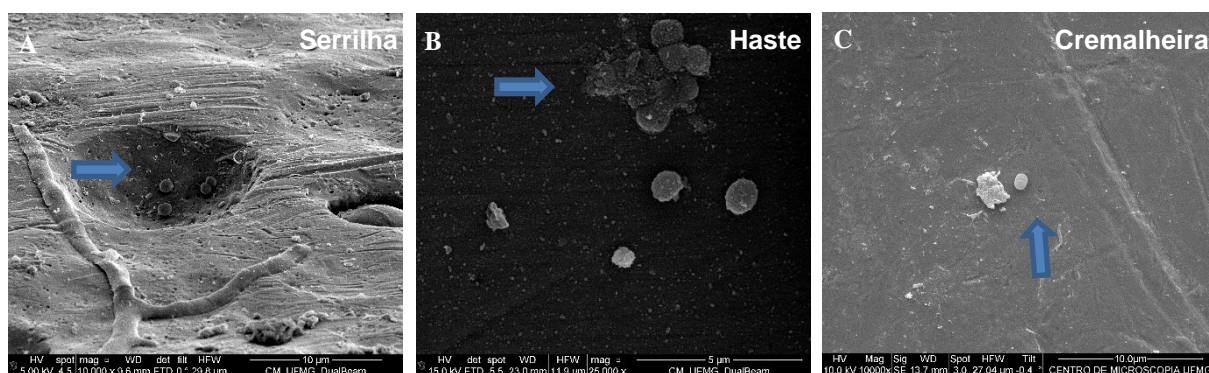
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após seis horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Cocos associados a material amorfo (EPS) em serrilha; não foram visualizados microrganismos em B. haste e C. cremalheira.

No tempo de 8 horas, observou-se a manutenção de *S. epidermidis* em aderência inicial em fragmentos de serrilha, bem como a recuperação de biofilme, em pequena quantidade, no fragmento de haste e a presença de célula cocoides isolada em cremalheira (**Figura 17**).

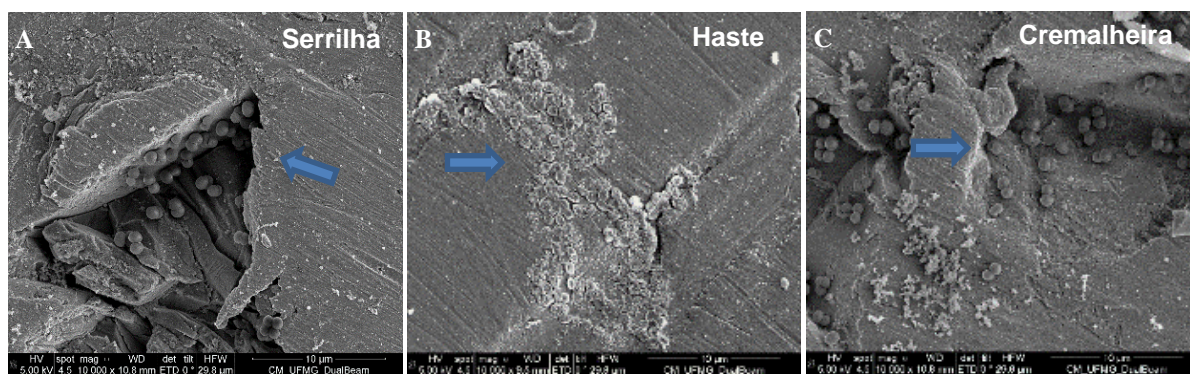
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após oito horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Células cocoides isoladas em área de sulco em serrilha; B. presença de células cocoides cobertas por material amorfo em haste e C. células cocoides isoladas em cremalheira.

Após 12 horas, a aderência microbiana de cocos foi demonstrada nos três fragmentos analisados (**Figura 18**), sobretudo, em região de fendas de cremalheira e serrilha.

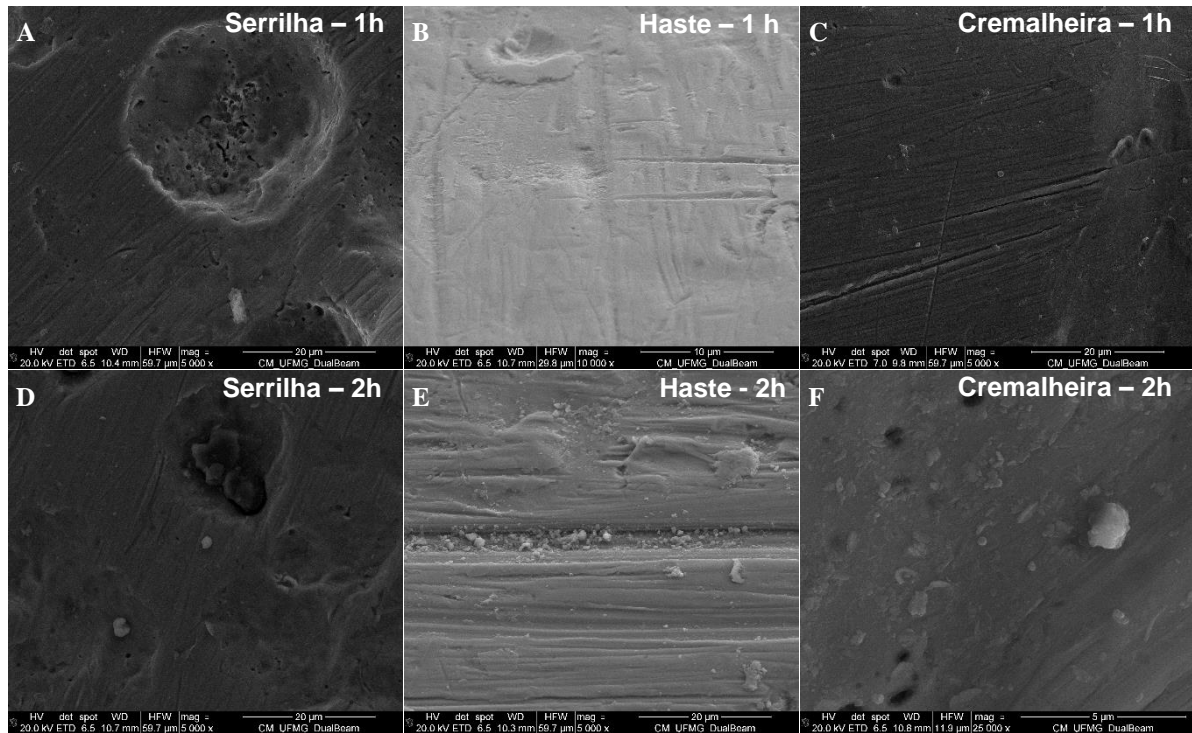
Figura 18 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após 12 horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza manual. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Células cocoides em área de sulco de serrilha; B. acúmulo de células cocoides em haste e C. cocos em área irregular de cremalheira.

Quando se tratou de fragmentos submetidos à limpeza automatizada, a análise por MEV demonstrou que esses, em geral, apresentaram menor quantidade de bactérias visualizadas em relação àqueles processados pelo método manual, evidenciando-se uma efetividade melhor desse método, especialmente, quanto à remoção de células em aderência inicial. Como demonstrado na **Figura 19**, não houve recuperação de microrganismos até o tempo de duas horas nos fragmentos submetidos à limpeza automatizada.

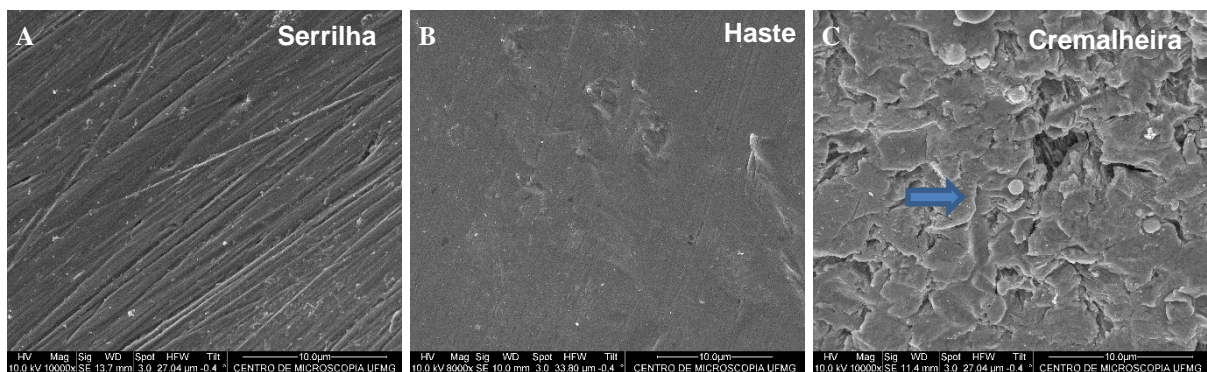
Figura 19 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após uma e duas horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



Fragmentos submetidos à contaminação bacteriana por 1 hora (A. serrilha, B. haste e C. cremalheira) ou 2 horas (D. serrilha, E. haste e F. cremalheira) seguida de limpeza automatizada, sem evidência de aderência microbiana. Ampliação original: A. 5000X, B. 10000, C. 5000 e D. e E.5000X e F. 25000X.

No momento de quatro horas não foram observadas células bacterianas em serrilha e haste, no entanto células isoladas foram observadas em fragmentos de cremalheira como destacado na **Figura 20**.

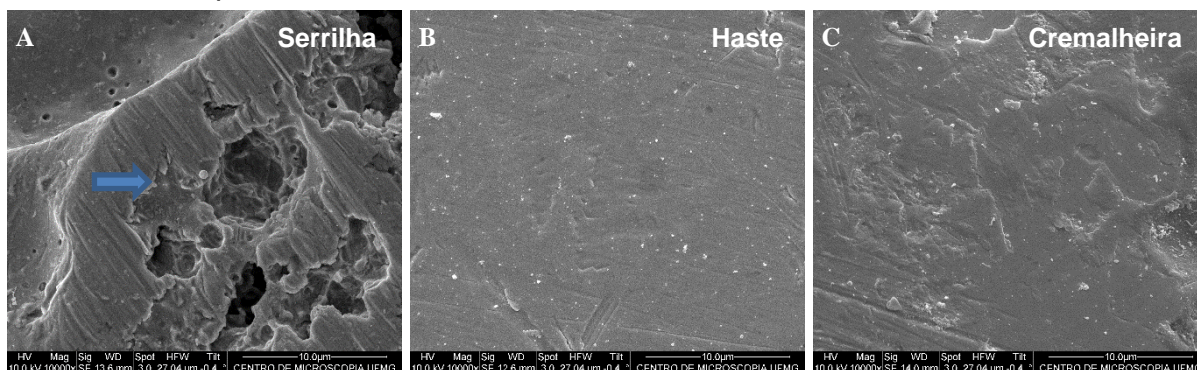
Figura 20 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após quatro horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



Não houve recuperação de *S. epidermidis* em A. serrilha e B. haste; C. presença de célula cocoide única em cremalheira. Ampliação original. 10000X, 8000X e 10000x.

Após a sexta hora de contaminação, seguida da limpeza automatizada, a permanência de *S. Epidermidis* foi verificada em serrilha, mas não em haste e cremalheira (**Figura 21**).

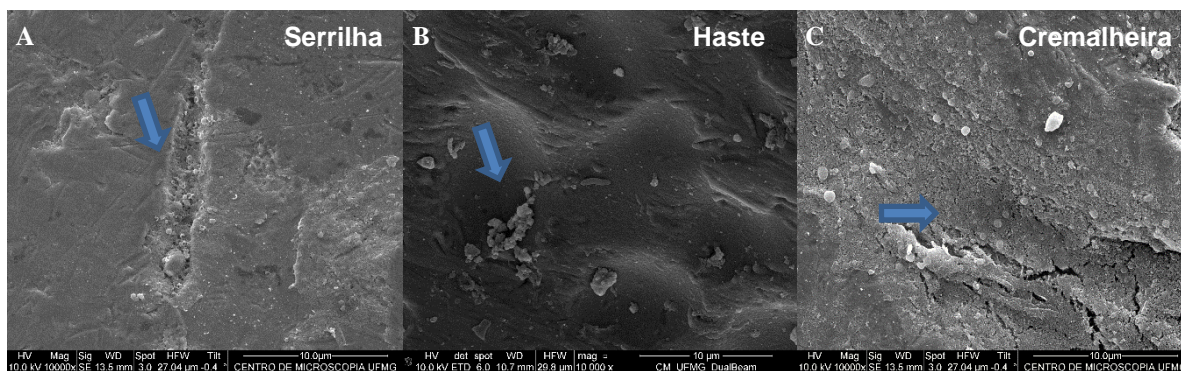
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após seis horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Célula coccoide em área de serrilha; B. Haste e C. Cremalheira, sem evidência de contaminação após limpeza automatizada. Ampliação original: 10000X.

Após a limpeza automatizada, a presença de biofilme foi verificada em fragmentos de haste e cremalheira submetidos a oito horas de exposição à contaminação por *S. epidermidis*. (**Figura 22**). Bactérias aglomeradas em área de serrilha também foram evidenciadas.

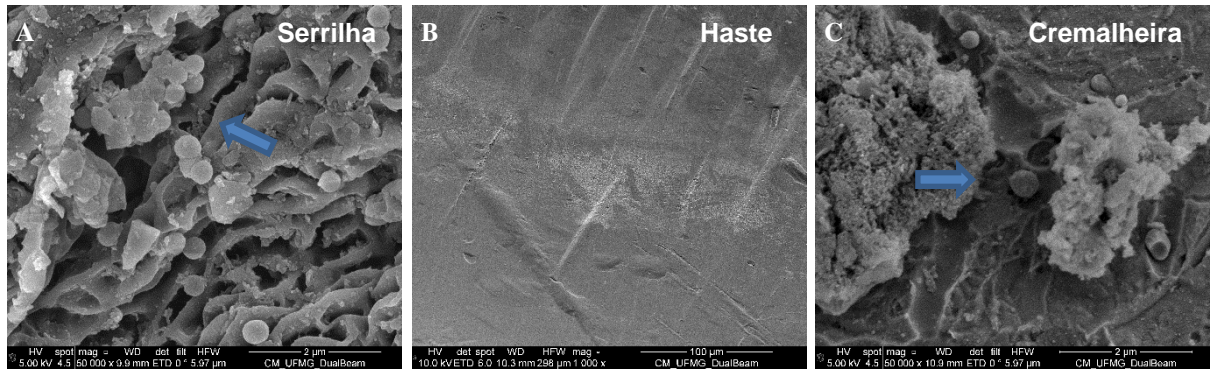
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após oito horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. Presença de células coccoide em sulco de serrilha; B. aglomerado de células coccoide cobertas por material amorfo em haste e C. células coccoide embebidas em EPS em cremalheira. Ampliação original: 10000X.

No tempo de 12 horas, não houve recuperação de microrganismos em fragmentos de haste. A permanência de biofilme foi identificada em áreas de serrilha e cremalheira (**Figura 23**).

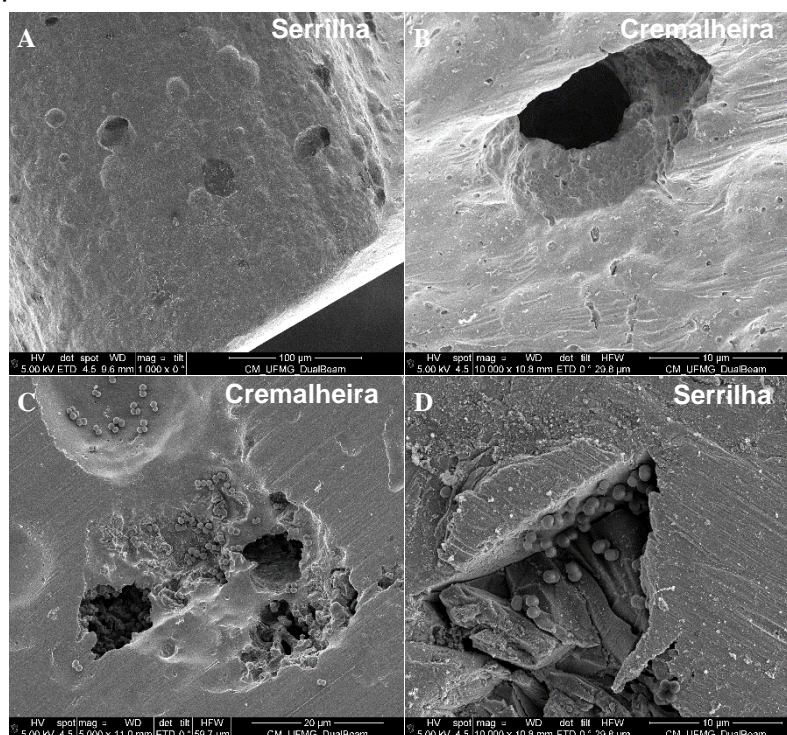
Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura de fragmentos de instrumental cirúrgico, após 12 horas de contaminação bacteriana, seguido de limpeza automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



A. presença de *S. epidermidis* envolto por EPS em serrilha; B. superfície de haste sem evidência de contaminação bacteriana e C. presença de células cocóides envoltas em EPS em cremalheira. Ampliação original: 50000X, 1000X e 50000X.

Apesar de não ter sido objetivo deste trabalho, ao longo da sua execução percebeu-se a presença de danos estruturais na superfície dos instrumentais cirúrgicos (**Figura 24**).

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura da superfície de instrumentais cirúrgicos novos, evidenciando a presença de dano estrutural na sua superfície. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



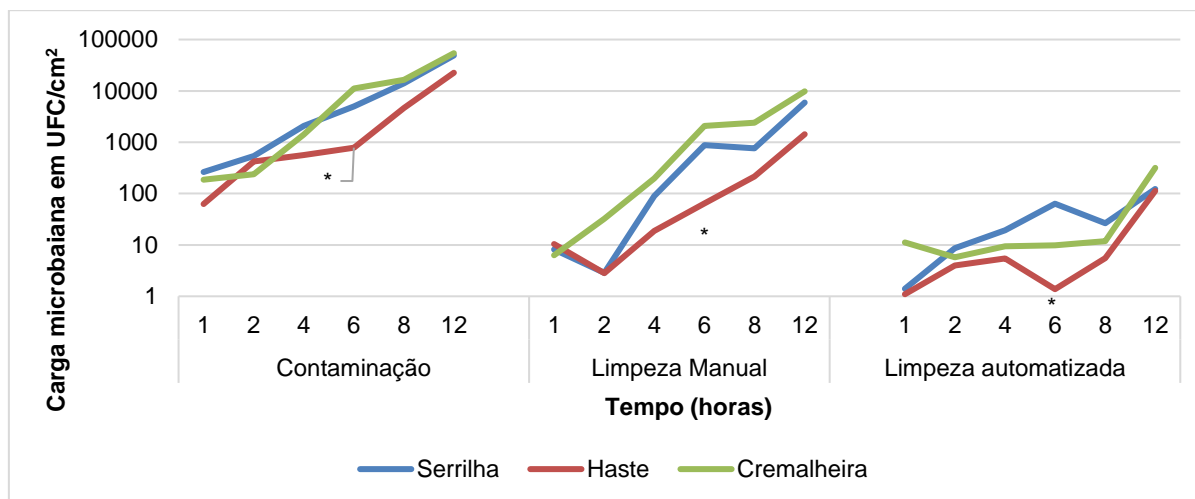
Dano estrutural observado em superfície de serrilha (A) e cremalheira (B). Acúmulo de microrganismo, após contaminação em superfície irregular de cremalheira (C) e sua permanência após limpeza manual em crateras na superfície de serrilha (D). Ampliação original: 1000X, 10000X, 5000X e 10000X.

A presença de poros e crateras na superfície de instrumentais cirúrgicos novos (**Figuras 24 A e B**) representam locais propícios à aderência microbiana em fragmentos expostos à contaminação (**Figura 24 C**). Ao longo das análises, a presença de dano estrutural foi evidenciada, principalmente, em áreas de cremalheira e serrilha. Após limpeza manual, verificou-se a permanência de *S. epidermidis* nestes locais (**Figura 24 D**).

4.3 COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA E REMOÇÃO DE MICRORGANISMOS ENTRE AS DIFERENTES ÁREAS DO INSTRUMENTAL

Três fragmentos, representativos de áreas com diferentes desafios à etapa de limpeza, foram submetidos à contaminação por *S. epidermidis*. A determinação da aderência microbiana após exposição, igualmente, após a limpeza manual e automatizada, para cada tipo de fragmento, está apresentada na **Figura 25**.

Figura 25 -Carga bacteriana recuperada dos fragmentos de serrilha, haste e cremalheira, em UFC/cm², em diferentes tempos de contaminação bacteriana. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.



* Observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os fragmentos de serrilha e cremalheira em relação à haste.

No grupo exposto à contaminação bacteriana, excluindo-se o ponto de 2 horas, as cargas bacterianas recuperadas em haste (superfície lisa) foram inferiores àquelas verificadas em serrilha e cremalheira (superfícies irregulares). Com exceção do ponto de limpeza manual, após 1 hora, as cargas bacterianas recuperadas em serrilha e cremalheira foram maiores em relação às verificadas em haste para os mesmos tempos analisados. Apesar da baixa recuperação de bactérias, nos três fragmentos, após limpeza automatizada, a carga bacteriana da haste ainda manteve-se abaixo daquela verificada em serrilha e em cremalheira.

A diferença entre a média de carga bacteriana de serrilha e cremalheira em relação à haste apresentou significância estatística apenas no momento de 6 horas no grupo de limpeza manual ($p < 0,05$). Em relação ao grupo limpeza automatizada, verificou-se que a média de carga bacteriana, após 1 e 6 horas na cremalheira e serrilha, foi significativamente superior que na haste ($p < 0,05$).

Os resultados deste estudo apontaram que quanto maior o tempo de exposição a microrganismos, maior a aderência microbiana e carga bacteriana recuperada no instrumental cirúrgico ao longo das 12 horas avaliadas. Quando submetidos à limpeza, o método automatizado promoveu redução significativa de carga microbiana neste PPS em todos os intervalos analisados, sendo mais efetivo que o método manual. Características relacionadas ao *design* do instrumental e a

presença de dano microestrutural nestes produtos, no entanto, contribuíram para a manutenção de microrganismos na sua superfície após a limpeza. Assim, áreas de cremalheira e serrilha apresentaram maior aderência microbiana e carga bacteriana mais elevada após a limpeza em relação a superfície lisa da haste.

5 DISCUSSÃO

Evidenciou-se que um tempo de contato de uma hora foi suficiente, para promover a aderência bacteriana, em níveis variando entre 10^1 UFC/cm² e 10^2 UFC/cm² podendo apresentar-se dispostos em multicamadas na superfície de instrumentais cirúrgicos. Considerando que o inóculo contaminante possui uma carga de 10^6 UFC/mL e que a aderência microbiana é um processo contínuo, dinâmico e influenciada por outros fatores que determinam a interação entre o microrganismo e a superfície é esperada uma carga microbiana inicial baixa.

Segundo Roberts (2013), em produtos passíveis de processamento, as condições requeridas para a aderência microbiana e a formação de biofilme incluem: a presença do microrganismo, a superfície a ser colonizada, além da disponibilidade de nutrientes e água, temperatura adequada e tempo de contato. Como ocorre na maioria das superfícies, o aço inoxidável, apesar de apresentar características que podem dificultar a aderência microbiana como hidrofobicidade e menor rugosidade, quando comparado a outros materiais, é passível de colonização e do desenvolvimento de biofilmes (KOSEKI *et al.*, 2014; ROBERTS, 2013; SAITO *et al.*, 2014).

Na prática, durante e depois do uso, instrumentais tornam-se contaminados, variando sua carga microbiana conforme o potencial de contaminação da cirurgia e o sítio abordado, fazendo com que estejam propensos à aderência microbiana e à formação de biofilmes (CHAN-MYERS; MCALISTER; ANTONOPLOS, 1997; PINTO *et al.*, 2010; SAITO *et al.*, 2014). Assim, considerando o seu ciclo de vida, instrumentais cirúrgicos são constantemente expostos à presença de microrganismos após cada uso, sendo eles provenientes do paciente, do ambiente ou das mãos dos profissionais de saúde durante a sua manipulação (CHAN-MYERS; MCALISTER; ANTONOPLOS, 1997; CHU *et al.*, 1999; SAITO *et al.*, 2014; WHO, 2016a). Sua sobrevivência e proliferação podem ser facilitadas pela presença de sangue e outras sujidades, que além de atuarem como nutrientes para os microrganismos, podem também ser adsorvidas à superfície e facilitar a aderência microbiana (ROBERTS, 2013). Quando não removida durante a limpeza, a matéria orgânica residual pode atuar ainda como uma barreira física, protegendo microrganismos presos no seu interior do contato com o agente esterilizante (PENNA; FERRAZ, 2000; RUTALA; WEBER, 2019).

No entanto a taxa de aderência microbiana, como a adsorção da matéria orgânica à superfície, é um processo que ocorre, ao longo do tempo (LIPSCOMB *et al.*, 2007; STOODLEY *et al.*, 2012) e depende das condições em que são mantidos esses materiais, sendo esta uma variável que deve ser controlada, especialmente, em instrumentais que não são prontamente processados após o uso.

Em condições adequadas, a aderência bacteriana pode ocorrer rapidamente. A formação de biofilme foi evidenciada por MEV em drenos inseridos em pacientes submetidos à abdominoplastia e mamoplastia e removidos após duas horas de uso (DOWER; TUNNER, 2012). Esse mesmo tempo foi suficiente também para a recuperação, em malhas de polipropileno experimentalmente contaminadas, por uma carga microbiana de $6,2 \times 10^2$ UFC de *S. aureus* e $6,5 \times 10^3$ UFC de *Enterococcus faecalis*, de *clusters* de biofilmes medindo $50 \mu\text{m}$ de espessura e $100 \mu\text{m}$ de extensão (STOODLEY *et al.*, 2012). Os dados apresentados corroboram os achados obtidos no presente estudo que evidenciaram a formação de EPS após duas horas de contato com *S. epidermidis*. Reforça-se, assim, a recomendação de início precoce da limpeza do instrumental, que deve ser iniciada, durante seu uso na mesa cirúrgica, quando a sujidade grosseira deve ser removida (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018).

Neste estudo, o tempo de contato entre o instrumental e o contaminante foi uma condição necessária para a aderência microbiana e elevação de sua carga, ao longo do tempo, variando entre 10^1 UFC/cm² no tempo de uma hora até 10^4 UFC/cm² após 12 horas. Resultados similares foram descritos em instrumentais cirúrgicos experimentalmente contaminados por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *S. aureus*, nos quais 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 (LI; JI, 2017; MOHITE *et al.*, 2016; PERCIN *et al.*, 2015). Nas fases iniciais de formação de biofilme, os microrganismos movimentam-se próximo à superfície e se fixam apenas após encontrarem um sítio de colonização adequado (LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001).

Verifica-se que a aderência inicial é uma etapa crítica na colonização da superfície (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; VUONG *et al.*, 2003) e mediada por ligações químicas fracas (DONLAN; COSTERTON, 2002; DUNNE, 2002), contudo suficiente para conferir uma resistência até dez vezes maior em relação à forma planctônica da célula (OTTER *et al.*, 2015). Assim, exige-se uma atuação rápida dos

profissionais após a contaminação desses materiais, a fim de diminuir o tempo de contato entre o instrumental cirúrgico e seu contaminante, reduzindo a possibilidade de aderência e progressão do biofilme (AORN, 2017; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; WHO, 2016a).

O aumento de carga microbiana observada nesses instrumentais pode ser justificado de duas formas. Primeiramente, a aderência microbiana é um processo que depende das características da superfície do instrumental, do microrganismo e do ambiente (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). Desta forma, nem todos os microrganismos irão aderir simultaneamente, assim como nem toda a superfície será colonizada, ao mesmo tempo, uma vez que se trata de um processo dinâmico. Esse fato pode ser constatado pela presença de microrganismos envolvidos em EPS, após duas horas e pela identificação de microrganismos em fase de adesão inicial no tempo de 8 horas.

Uma vez aderido, o microrganismo inicia uma etapa de agregação celular, e a multiplicação resulta em uma estrutura multicamadas de células microbianas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999), como observado por MEV, no grupo de implantação nos tempos de uma hora em serrilha e seis horas em cremalheira. Assim, o aumento da carga bacteriana pode ser explicado pela constante aderência de microrganismos, ao longo do tempo (MOHITE *et al.*, 2016; PERCIN *et al.*, 2015), tal como ao processo de maturação do biofilme que envolve sua multiplicação após aderência à superfície (DONLAN, 2001a; DUNNE, 2002; FLEMMING *et al.*, 2016). Em condições adequadas de crescimento, o tempo de duplicação verificado do *S. epidermidis* aderido à superfície de biomateriais (polímeros e vidro) varia entre 17 a 38 minutos (GOTTENBOS; VAN DER MEI; BUSSCHER, 2000). As recomendações de início precoce da limpeza, durante o uso na mesa cirúrgica com a remoção de sujidade grosseira do instrumental por compressas estéreis umidificadas, em água esterilizada e friccionadas na sua superfície, contribuem para a prevenção da aderência microbiana e, conseqüentemente, formação de biofilme (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018).

Depois de 12 horas de contaminação, uma carga microbiana de 10^4 UFC/cm² foi recuperada em todos os fragmentos analisados. A carga microbiana, em instrumentais cirúrgicos após a limpeza, influencia na segurança da esterilidade desses materiais (RUTALA; WEBER, 2019). Em estudos que avaliaram a recuperação de microrganismos, na superfície de instrumentais cirúrgicos após o uso, foram

verificados níveis de contaminação de até 10^4 UFC/instrumental (CHAN-MYERS; MCALISTER; ANTONOPLOS, 1997; CLOUTMAN-GREEN *et al.*, 2015; PERCIN *et al.*, 2015; PINTO *et al.*, 2010; RUTALA *et al.*, 1998). No presente estudo, mesmo uma carga microbiana de, aproximadamente, 10^2 UFC/cm² foi relacionada à presença de biofilme nos fragmentos de serrilha no tempo de duas horas. Destaca-se, assim, o papel da pré-limpeza na prevenção da sua formação.

Nesta etapa, medidas, para evitar o ressecamento do sangue, a aderência de sujeira e a formação de biofilme, são amplamente recomendadas (AORN, 2017; AAMI, 2011; BRASIL, 2012a; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; FDA, 2018; HOWLIN *et al.*, 2010; RUTALA; WEBER, 2019; WHO, 2016a). Trinta minutos de ressecamento demonstraram ser suficiente para dificultar a remoção da sujeira aderida à superfície de instrumentais cirúrgicos apenas com o uso de água (LIPSCOMB *et al.*, 2007). É válido ressaltar que a prática da aplicação de álcool em instrumentais contaminados, apesar de relacionar-se à redução da carga microbiana, aumenta a fixação de proteínas na superfície desses produtos, especialmente na presença de sangue (COSTA *et al.*, 2017; PRIOR *et al.*, 2004). A adsorção de proteínas, lipídios e minerais, além de tudo, na superfície de aço inoxidável, pode atuar como filme condicionante por alterar características da superfície, facilitando a aderência microbiana e formação de biofilme (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; BOARI *et al.*, 2009). Em se tratando de instrumentais cirúrgicos, o filme condicionante pode ser formado pela presença de sangue, urina ou proteínas.

A manutenção da umidificação nesta etapa tem-se mostrado relevante à qualidade do processamento de PPS (LIPSCOMB *et al.*, 2007; MULLANEY, 2008; RUTALA; WEBER, 2019; SECKER; HERVÉ; KEEVIL, 2011; SHOEMAKE; STOSSEL, 2007), sobretudo, em instrumentais que não são transportados imediatamente após o uso (LUCIANO *et al.*, 2016; SHEITOYAN-PESANT *et al.*, 2017; VICKERY *et al.*, 2009; VICKERY; PAJKOS; COSSART, 2004). No entanto, quando mantidos em imersão, o transporte até a CME deve ser priorizado, uma vez que instrumentais contaminados mantidos em imersão, mesmo em água por tempo prolongado, apresentam aumento de carga microbiana (COSTA *et al.*, 2017; MOHITE *et al.*, 2016; PERCIN *et al.*, 2015).

Assim, o transporte imediato dos instrumentais à CME após o uso é importante para reduzir o tempo de contato com o contaminante (AORN, 2017; CASTON-GAA; RUPARELIA, 2018; INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP, 2017; ROBERTS, 2013; WHO, 2016a). O tempo prolongado de exposição à

contaminação bacteriana pode criar condições favoráveis ao crescimento microbiano, aumentando o desafio, durante as etapas subsequentes, como a de limpeza e esterilização. Um período prolongado de contaminação, antes do processamento (180 minutos), resultou na recuperação de bactérias em *drills*, experimentalmente contaminadas por fragmentos ósseos e microrganismos, ainda que após esterilização a vapor saturado sob pressão (SMITH *et al.*, 2018).

Os fragmentos submetidos à contaminação foram processados por dois diferentes protocolos de limpeza; um manual, com o uso de imersão em solução de detergente enzimático seguido de escovação e outro automatizado, em lavadora ultrassônica. Em geral, comparando-se o mesmo tempo de contaminação e o mesmo tipo de fragmento, a limpeza automatizada resultou em carga microbiana menor em comparação à manual, principalmente, após quatro horas. Essa redução foi de até três ciclos logarítmicos (\log_{10}) após a limpeza automatizada e até dois (\log_{10}) após limpeza manual.

Estudo com o objetivo de determinar a efetividade dos métodos de limpeza, em sua maioria, aponta à maior efetividade da limpeza automatizada em relação à manual (ALFA *et al.*, 2006; ALFA; FATIMA; OLSON, 2013; ALFA; NEMES, 2003, 2004; BATISTA NETO *et al.*, 2010; LOPES *et al.*, 2019; REN-PEI *et al.*, 2014). Quando se considera áreas de difícil acesso, nas quais a escovação é limitada, o emprego do método manual não é suficiente ou é menos efetivo para garantir um nível de limpeza adequado (ALFA *et al.*, 2006).

Em fresas flexíveis e medidores de profundidade submetidos à contaminação e avaliados, após 20 ciclos de processamento experimental, tanto o método manual quanto o automatizado reduziram de forma significativa os níveis de ATP e proteínas recuperados nesses instrumentais, contudo a presença de biofilme foi determinada após limpeza manual (LOPES *et al.*, 2018). Em canetas de bisturi elétricas submetidas à esterilização foi registrado que a probabilidade de falha deste método foi maior naqueles previamente submetidos à limpeza manual em relação àqueles processados em lavadoras ultrassônicas (BATISTA NETO *et al.*, 2010). Esses estudos corroboram a indicação da Resolução da Diretoria Colegiada nº 15 (BRASIL, 2012a) de que os métodos de limpeza manual e automatizado devam ser usados de forma complementar.

Por outro lado, durante a avaliação da carga microbiana de instrumentais cirúrgicos submetidos a duas etapas sequenciais de limpeza, aqueles processados,

inicialmente, por meio manual apresentaram maior redução quanto à verificada naqueles submetidos à limpeza em ultrassônica, no entanto se observou uma queda significativa, após processamento desses produtos, em lavadora termodesinfectora (EVANGELISTA *et al.*, 2015). Embora demonstrada a efetividade do uso automatizado, o equipamento depende de instalação correta, qualificação e manutenção regular, para garantir seu bom e adequado funcionamento, além de um operador para validação, carregamento e retirada de carga, reposição e troca de solução de limpeza e manutenção para que sejam garantidas condições adequadas para o seu funcionamento (AORN, 2017; BRASIL, 2012a; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a; WHO, 2016a).

Apesar do aumento progressivo de carga microbiana observado nos instrumentais, após a contaminação, fragmentos submetidos à limpeza automatizada até o tempo de oito horas apresentaram carga microbiana abaixo de 10^2 UFC/cm². Uma das vantagens do método automatizado em relação ao manual é a possibilidade de validação do processo e sua reprodutibilidade (ALFA; OLSON; DEGANE, 2006; AORN, 2017). O uso de equipamentos facilita a utilização da concentração adequada de detergente, controle de temperatura e facilidade em seu monitoramento contribuindo para a sua validação (ALFA *et al.*, 2013; ALFA; OLSON; DEGAGNE, 2006; AORN, 2017).

Por outro lado, a limpeza manual está sujeita à variação entre profissionais (AORN, 2017) e, ainda que entre lavagens, porque depende da técnica aplicada e da variação da força exercida em cada fricção realizada. Como observado, nos fragmentos de serrilha e haste, quando comparados os tempos de uma e duas horas, apesar do aumento na carga microbiana após a contaminação, eles apresentaram maior redução de carga microbiana, que pode se relacionar à variação de técnica, durante a escovação, apesar do procedimento ter sido realizado pelo mesmo pesquisador. O sucesso do método manual está diretamente relacionado à aderência dos profissionais a protocolos e à uniformidade na sua execução.

Reforça-se, com o exposto, a premissa fundamental do investimento, na capacitação de recursos humanos, como um componente crítico no processamento de PPS. A qualificação de recursos humanos é apontada como um componente essencial para a garantia de qualidade e segurança no processamento dos PPS (ALFA, 2013; DURO, 2013), sendo prevista em *guidelines* (AAMI, 2011; AORN, 2017; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016c) e legislação (BRASIL,

2012a). Como coordenadores de CME, cabe ao enfermeiro exercer atividades técnico - administrativas que englobam emissão de pareceres, treinamento, supervisão, orientação e acompanhamento dos profissionais que executam tais atividades. Neste contexto, cabe a reflexão sobre o espaço que tem sido dedicado à formação acadêmica desses profissionais durante a graduação e sua capacidade de desenvolver tais habilidades durante o curso.

A MEV evidenciou a recuperação de células as quais, embora em estágio de aderência inicial, permaneceram aderidas à superfície de instrumentais cirúrgicos entre 4 e 12 horas de contaminação após limpeza manual. Em contraste, em fragmentos submetidos à limpeza automatizada, apenas a presença de células isoladas foi detectada até o tempo de 6 horas. Lavadoras ultrassônicas são úteis para a remoção de material em áreas de difícil acesso (ALFA et al., 2006; ALFA; NEMES, 2003; AORN, 2017), que, muitas vezes, não podem ser alcançadas pelas cerdas das escovas. A cavitação nesses equipamentos gera microbolhas que, ao se colapsarem, geram áreas de vácuo capazes de promover a remoção dos resíduos de forma efetiva (AORN, 2017; JATZWALK; SCHÖNE; PIETSCH, 2001; KAUFFMAN; JOSEPH, 2011; MASON, 2016; RUTALA; WEBER, 2019; UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH, 2016a).

No entanto, ao longo do processo de maturação, as bactérias aderidas tornam-se imersas em EPS. A presença de contaminação microbiana, na superfície de instrumentais cirúrgicos, aumenta o desafio de sua remoção quando envoltos por matriz formando biofilmes. Esta matriz confere resistência natural que dificulta a remoção do biofilme (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014; DONLAN, 2001a; FLEMMING *et al.*, 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Depois que um biofilme se forma, é necessária a ação mecânica, para a sua remoção (VICKERY *et al.*, 2009), representado neste estudo pela fricção com escova e o uso de sonicação em lavadora ultrassônica. Assim, mesmo com o uso de equipamento de comprovada eficiência, na limpeza de instrumentais cirúrgicos, pode não remover microrganismos agregados em biofilmes. Observou-se, neste estudo que, embora com a redução substancial, na carga bacteriana nas amostras submetidas à limpeza em lavadora ultrassônica, biofilmes foram recuperados logo após oito e 12 horas de incubação.

Entre os diferentes fragmentos, as cargas bacterianas recuperadas, em serrilha e cremalheira, foram superiores às observadas em haste, ao longo do tempo, exceto no tempo de duas horas no grupo submetido à contaminação e duas horas de limpeza manual. Os resultados podem relacionar-se à presença de dano estrutural, observado por meio de MEV, nos instrumentais analisados e verificados, principalmente, nas áreas de cremalheira e serrilha, uma vez que superfícies porosas ou com mais rugosidade são mais susceptíveis à acumulação de resíduos (KOSEKI *et al.*, 2014; SCHEUERMAN; CAMPER; HAMILTON, 1998; YODA *et al.*, 2014), que, por sua vez, podem facilitar a formação de biofilmes (COSTA *et al.*, 2017).

Superfícies mais polidas como a área de haste podem ter a adesão por *S. epidermidis* mais lenta, como observado neste estudo, contudo não é uma condição suficiente, para evitar esse processo, visto que, após 12 horas, a carga microbiana recuperada nos três fragmentos foi de 10^4 UFC/cm² após contaminação, 10^3 UFC/cm² após limpeza manual e 10^2 UFC/cm² após limpeza automatizada. Como demonstrado, a presença de fendas, em instrumentais cirúrgicos novos, antes do uso, pode atuar como sítios potenciais para a aderência microbiana.

As implicações do *design* do instrumental, entretanto puderam ser melhor evidenciadas, durante a etapa de limpeza, em especial, em limpeza automatizada, quando fragmentos de haste exibiram maior redução de carga bacteriana em relação à serrilha e cremalheira. A presença de ranhuras em serrilha e a irregularidade da superfície em cremalheira aumentam o desafio para que possam ser alcançadas, durante a escovação.

O design do instrumental é um aspecto importante a se considerar durante a limpeza. A presença de área no instrumental que não permite ou dificulta o contato com a solução de limpeza e a não aplicação de força mecânica favorece o acúmulo de sujidade (PARADA *et al.*, 2009; STAUBITZ; RAY; HARRIS, 2017; TOSH *et al.*, 2011). Em um único instrumental, podem estar presentes áreas com diferentes desafios ao processo de limpeza, como observado neste estudo. Microrganismos imersos em biofilmes ou abrigados em poros do instrumental podem não ser removidos pelo processo de limpeza tornando-se uma fonte de recontaminação (COSTA *et al.*, 2017, 2018; LOPES *et al.*, 2019; REN-PEI *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2018; STAUBITZ; RAY; HARRIS, 2017; TOSH *et al.*, 2011).

A presença de danos estruturais pode relacionar-se à qualidade da matéria-prima utilizada na fabricação desses instrumentais. Estudo que objetivou elucidar a

qualidade dos instrumentais cirúrgicos utilizados em hospitais demonstrou que o tipo de aço usado na fabricação foi inadequado em todas as amostras analisadas, ademais, houve deterioração provocada pelo contato com detergentes (MAINIER *et al.*, 2013). Assim, considerando o longo ciclo de vida desses instrumentais e a grande rotatividade de muitos deles, alerta-se para o risco de formação de biofilme nesses instrumentais desde o primeiro uso e uma tendência de aumento, ao longo do tempo, relacionado ao desgaste do instrumental, que, muitas vezes, pode ser visualizado a olho nu.

Nos serviços de processamento, os profissionais lidam com a possibilidade de formação de biofilme nos instrumentais, sem, todavia existirem formas de evidenciá-los durante a prática. Neste estudo, observou-se a possibilidade de formação de biofilme, mesmo quando o instrumental apresentou carga bacteriana baixa, em torno de 10^2 UFC/cm² e demonstrou-se a dificuldade de remoção dessas estruturas por métodos de limpeza manual ou automatizados. Embora tenha sido observada a redução de carga bacteriana nos fragmentos, após a limpeza, a presença de biofilme pôde ser detectada após esses procedimentos.

Apesar de se tratar de uma carga microbiana relativamente baixa, esses instrumentais, muitas vezes, são manipulados por profissionais sem o uso de luvas, em especial, logo após a etapa de limpeza, havendo, neste caso, a possibilidade de transferência de microrganismos para as mãos dos profissionais. A presença de biofilme, ainda, pode comprometer a qualidade do processamento por atuar como barreira à penetração do agente esterilizante (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY; 2004).

Verifica-se, assim, que a abordagem do biofilme, em instrumentais cirúrgicos, deve estar voltada à prevenção de sua formação, sendo falha a aplicação de métodos tanto manual quanto automatizado, rotineiramente empregados em sua limpeza. Dessa forma, instrumentais utilizados devem ser limpos o mais precocemente possível, para impedir a formação de biofilmes, já que os microrganismos aderem rapidamente formando biofilmes ainda que apresentem baixa carga microbiana.

Este estudo apresenta algumas limitações. A impossibilidade de visualização de toda a superfície do fragmento tanto pela sua extensão quanto pela fixação de uma de suas faces, nos *stubs* (suporte utilizados para realização da MEV), pode levar a não detecção de microrganismos, ainda que eles estejam presentes.

Apenas um microrganismo foi utilizado, no entanto a maioria dos biofilmes podem ser formados por múltiplas espécies que estabelecem relações mútuas entre si. O desafio da limpeza de instrumentais cirúrgicos inclui a remoção de outros resíduos, como hemoglobina e proteínas, todavia apenas um tipo de resíduo foi avaliado, a presença de microrganismo. Além disso, foram avaliados instrumentais novos, o que não reflete a realidade enfrentada, nos serviços de processamento, uma vez que o desgaste provocado pelos sucessivos reúsos, ao longo da vida do instrumental, pode refletir na maior dificuldade da limpeza.

6 CONCLUSÃO

A qualidade do processamento de PPS reutilizáveis tem reflexos diretos na assistência prestada e na garantia da segurança do paciente. A limpeza, dentro do conjunto de etapas necessárias para o seu reuso seguro, é um processo extremamente complexo e envolve fatores diversos, como rotinas dos serviços de referência, fator humano e *design* dos instrumentais, tornando-se importante refletir sobre essa prática.

Nos instrumentais contaminados por *S. epidermidis*, a análise de carga microbiana demonstra que o tempo de contato de uma hora é suficiente para a ocorrência de aderência bacteriana à superfície desses materiais, sendo observado seu aumento ao longo do tempo. Além do mais, a formação de biofilme ocorre, nas primeiras duas horas de contaminação, ressaltando-se o papel crucial da pré-limpeza na prevenção da formação de biofilme.

Comparando-se os dois diferentes métodos de limpeza, o automatizado apresentou maior efetividade, durante a remoção de bactérias, em relação ao manual, visto que possibilitou maior redução na carga bacteriana. No entanto, a presença de biofilme foi detectada, após oito horas de contaminação, seguida de processamento em ambos os protocolos.

Os resultados demonstram a capacidade de *S. epidermidis* formar biofilme e os desafios de remoção por métodos de limpeza convencionais, reforçando a importância em investir em boas práticas no processamento de PPS, desenvolvimento de protocolos de limpeza adequados e adesão dos profissionais a essas recomendações.

As áreas de serrilha e cremalheira apresentaram maior dificuldade, para a remoção de bactérias em relação à haste, provavelmente, relacionado à conformação desses fragmentos. A presença em regiões de difícil acesso, como cremalheira e serrilha, são fatores críticos à qualidade do processamento de instrumentais cirúrgicos.

Associado a isso, a presença de danos estruturais em instrumentais pode representar um desafio adicional à etapa de limpeza, durante o processamento de instrumentais cirúrgicos. Todavia, a exata extensão deste problema não pode ser evidenciada neste estudo, havendo a necessidade de novas investigações quanto à temática para a sua elucidação.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, T. E. F. *et al.* Frequency of surgical treatment and related hospital procedures in the UK: a national ecological study using hospital episode statistics. **British Journal of Anaesthesia**, London, v. 119, n. 2, p. 249–257, Aug. 2017.

ALFA, M. J. Biofilms on instruments and environmental surfaces: do they interfere with instrument reprocessing and surface disinfection? Review of the literature. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 47, p. A39-A45, June 2019.

_____. Current issues result in a paradigm shift in reprocessing medical and surgical instruments. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 44, p. 41-45, May 2016. Suppl. 5.

_____. Monitoring and improving the effectiveness of cleaning medical and surgical devices. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 41, n. 5, p. 56-59, 2013. Suppl.

ALFA, M. J. *et al.* Manual methods are suboptimal compared with automated methods for cleaning of single-use biopsy forceps. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 27, n. 8, p. 841-846, Aug. 2006.

ALFA, M. J.; FATIMA, I.; OLSON, N. The adenosine triphosphate test is a rapid and reliable audit tool to assess manual cleaning adequacy of flexible endoscope channels. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 41, n. 3, p. 249-53, Mar. 2013.

ALFA, M. J.; NEMES, R. Inadequacy of manual cleaning for reprocessing single-use, triple-lumen sphinctertomes: simulated-use testing comparing manual with automated cleaning methods. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 31, n. 4, p. 193-207, June 2003.

_____. Manual versus automated methods for cleaning reusable accessory devices used for minimally invasive surgical procedures. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 58, n. 1, p. 50-58, Sept. 2004.

ALFA, M. J.; OLSON, N.; AL-FADHALY, A. Cleaning efficacy of medical device washers in North American healthcare facilities. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 74, n. 2, p. 168-177, Feb. 2010.

ALFA, M. J.; OLSON, N. Comparison of washer-disinfector cleaning indicators: Impact of temperature and cleaning cycle parameters. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, 42, n. 2, p. e23-e26, Feb. 2014.

ALFA, M. J.; OLSON, N.; DEGAGNE, P. Automated washing with the Reliance Endoscope Processing System and its equivalence to optimal manual cleaning. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 34, n. 9, p. 561-70, Nov. 2006.

- ALLEGIANZI, B. *et al.* Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, London, v. 377, n. 9761, p. 228-241, Jan. 2011.
- ANDERSON, D. J. *et al.* Strategies to prevent surgical site infections in acute care hospitals: 2014 update. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 35, n. 6, p. 605-627, June 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ISO 7153-1**: Instrumental cirúrgico - materiais metálicos: parte 1: aço inoxidável. Rio de Janeiro: ABNT, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **ISO 15883-1**: 2006: lavadoras desinfetadoras. Parte 1: requisitos gerais, termos, definições e ensaios. Rio de Janeiro: ABNT, 2013.
- ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - (AAMI). **AAMI/FDA Medical Device Reprocessing Summit**. Arlington: AAMI, 2011.
- _____. **AAMI TIR34**: 2007: water for reprocessing of medical devices. Arlington: AAMI, 2007.
- ASSOCIATION OF PERIOPERATIVE REGISTERED NURSES (AORN). **Guidelines for perioperative practice**. Denver: AORN, 2017.
- BATISTA NETO, S. *et al.* The sterilization efficacy of reprocessed single use diathermy pencils. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 1, p. 81-86, jan./fev. 2010.
- BAXTER, R. L. *et al.* Quantitative analysis of residual protein contamination on reprocessed surgical instruments. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 63, n. 4, p.439-44, Aug. 2006.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 4, p. 870-926, Oct. 2014.
- BHAGAVAN, N. V. Amino acids. *In*: _____. **Medical biochemistry**. New York: Academic Press, 2002. p. 17–33.
- BOARI, C. A. *et al.* Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, dez. 2009.
- BOMMARITO, M.; WITCHER, K.; THORNHILL, G. The utility of an ATP System for monitoring the cleanliness of surgical instruments. **3M Infection Prevention**, Saint Paul, 2011. Poster presented in Instrumental to Patient Care Annual Meeting in Louisville, KY. Disponível em: <http://multimedia.3m.com/mws/media/720676O/utility-of-an-atp-system-for-monitoring-surgical-instruments.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016.** Brasília, DF: Anvisa, 2017a.

_____. **Medidas de prevenção de endoftalmites e de síndrome tóxica do segmento anterior relacionadas a procedimentos oftalmológicos invasivos.** Brasília: Anvisa, 2017b.

_____. **Micobactérias - Nota técnica.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

_____. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 39-46, 14 dez. 2011.

_____. Princípios básicos para limpeza de instrumental cirúrgico em serviços de saúde. **Informe Técnico,** Brasília, n. 1, p. 4-12, fev. 2009.

_____. **Procedimentos hospitalares do SUS - por local de internação - Brasil. Datasus,** Brasília, DF, 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>. Acesso em: 14 ago. 2019.

_____. Resolução - RDC 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. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, p. 43, 19 mar. 2012a.

_____. Resolução - RDC nº 55, de 14 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médico e dá outras providências. **Diário Oficial da União,** Brasília, DF, 21 nov. 2012b.

CASTON-GAA, A.; RUPARELIA, C. S. **Infection prevention and control. Module 6: processing surgical instruments and medical device.** Baltimore: Jhpiego, 2018.

CHAN-MYERS, H.; MCALISTER, D.; ANTONOPLOS, P. Natural bioburden levels detected on rigid lumened medical devices before and after cleaning. **American Journal of Infection Control,** Saint Louis, v. 25, n. 6, p. 471-476, Dec. 1997.

CHEHUEN NETO, J. A. **Metodologia da pesquisa científica: da graduação à pós-graduação.** Curitiba: CRV, 2012.

CHU, N. S. *et al.* Levels of naturally occurring microorganisms on surgical instruments after clinical use and after washing. **American Journal of Infection Control,** Saint Louis, v. 27, n. 4, p. 315-319, Aug. 1999.

CLOUTMAN-GREEN, E. *et al.* Biochemical and microbial contamination of surgical devices: a quantitative analysis. **American Journal of Infection Control,** Saint Louis, v. 43, n. 6, p. 659-661, June 2015.

COENYE, T.; NELIS, H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 89–105, Nov. 2010.

COOPER, K. *et al.* **Surveillance of surgical site infections in NHS hospitals in England, 2017 to 2018**. London: Public Health England, 2018.

COSTA, D. D. M. *et al.* Alcohol fixation of bacteria to surgical instruments increases cleaning difficulty and may contribute to sterilization inefficacy. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 45, n. 8, p. e81-e86, Aug. 2017.

_____. Evaluation of stainless steel surgical instruments subjected to multiple use/processing. **Infection, Disease & Health**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 3-9, Mar. 2018.

DANCER, S. J. *et al.* Surgical site infections linked to contaminated surgical instruments. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 81, n. 4, p. 231-238, Aug. 2012.

DAVIS, J. Retained bioburden on surgical instruments after reprocessing: are we just scraping the surface. **Pennsylvania Patient Safety Authority**, Harrisburg, v. 14, n. 2, p. 71-75, June 2017.

DESCÔTEAUX, J. G. *et al.* Residual organic debris on processed surgical instruments. **AORN Journal**, Denver, v. 62, n. 1, p. 23-30, July 1995.

DEVA, A. K.; ADAMS, W. P. J.; VICKERY, K. The role of bacterial biofilms in device-associated infection. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 132, n. 5, p. 1319-1328, Nov. 2013.

DIETRICH, M. *et al.* Staphylococcus epidermidis in biomaterial-associated infections. *In*: MORIARTY, F.; ZAAT, S. A. J. (ed.). **Biomaterials associated infection: immunological aspects and antimicrobial strategies**. New York: Springer, 2013. p. 25-56.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 33, n. 8, p. 1387-1392, Oct. 2001a.

_____. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 277-281, Mar./Apr. 2001b.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

DOWER, R.; TURNER, M. L. Pilot study of timing of biofilm formation on closed suction wound drains. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 130, n. 5, p. 1141-1146, Nov. 2012.

DUNNE, W. M. J. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, Apr. 2002.

DURO, M. In focus: post-procedure reprocessing steps to eliminate bioburden from surgical instruments. **AORN Connections**, Denver, v. 98, n. 3, p. C7-C8, Sept. 2013.

EHLERS, M. M. *et al.* Molecular epidemiology of staphylococcus epidermidis implicated in catheter-related bloodstream infections at an academic hospital in Pretoria, South Africa. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 417, Mar. 2018.

EVANGELISTA, S. S. *et al.* Analysis of microbial load on surgical instruments after clinical use and following manual and automated cleaning. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 43, n. 5, p. 522-527, May 2015.

FAST, O. *et al.* Limited sterile processing capabilities for safe surgery in low-income and middle-income countries: experience in the Republic of Congo, Madagascar and Benin. **BMJ Global Health**, London, v. 2, p. 1-8, Sept. 2017. Suppl. 4.

FLEMMING, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 14, n. 9, p. 563-75, Aug. 2016.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, n. 9, p. 623-633, Sept. 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Reprocessing medical devices in health care settings**: validation methods and labeling: guidance for industry and food drug administration staff. Rockville: FDA, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Reprocessing of reusable medical devices**. Rockville: FDA, 2018. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/products-and-medical-procedures/reprocessing-reusable-medical-devices>>. Acesso em: 22 maio 2019.

FUX, C. A. *et al.* Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 34-40, Jan. 2005.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, Sept. 2008.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 5. ed. São Paulo: Atlas, 2010.

GOLDBERG, J. L. What the perioperative nurse needs to know about cleaning, disinfection, and sterilization. **Perioperative Nursing Clinics**, New York, v. 5, n. 3, p. 263-272, Sept. 2010.

GOTTENBOS, B.; VAN DER MEI, H. C.; BUSSCHER, H. J. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 50, n. 2, p. 208-14, May 2000.

GRIFFITH C. J. *et al.* An evaluation of hospital cleaning regimes and standards. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 45, n. 1, p. 19-28, May 2000.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 95-108, Feb. 2004.

HALL-STOODLEY, L. *et al.* Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 65, n. 2012, p. 127–145, 2012.

HANSEN, D.; HILGENHONER, M.; POPP, W. ATP bioluminescence – for kitchen hygiene and cleaning control of surgical instruments. **International Journal of Infection Control**, U.K., v. 4, n. 1, p. 1-4, Oct. 2008.

HEATHCOTE, R.; STADELMANN, B. Measuring of ATP bioluminescence as a means of assessing washer disinfectant performance and potentially as a means of validating the decontamination process. **Healthcare Infection**, Ottawa, v. 14, n. 4, p. 147-151, Dec. 2009.

HIDRON, A. I. *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 29, n. 11, p. 996-1011, Nov. 2008.

HOWLIN, R. P. *et al.* Acquisition of proteinaceous contamination through the handling of surgical instruments by hospital staff in sterile service departments. **Journal of Infection Prevention**, London, v. 10, n. 3, p. 106-111, May 2009.

_____. Application of a fluorescent dual stain to assess decontamination of tissue protein and prion amyloid from surgical stainless steel during simulated washer-disinfectant cycles. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 75, n. 1, p. 66-71, May 2010.

INSTRUMENT REPROCESSING WORKING GROUP. **Reprocessing of instruments to retain value**. 11. ed. Gütersloh: Instrument Reprocessing Working Group, 2017.

JATZWAUK, L.; SCHÖNE, H.; PIETSCH, H. How to improve instrument disinfection by ultrasound. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 48, p. 80-83, 2001. Suppl. A.

JAYARAMAN, A.; WOOD, T. K. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 10, p. 145-67, 2008.

KAUFFMAN, M.; JOSEPH, C. Ultrasonic cleaning in the healthcare setting. **Healthc Purchasing News**, New York, v. 35, n. 1, p. 30-33, 2011.

KOSEKI, H. *et al.* Early staphylococcal biofilm formation on solid orthopaedic implant materials: in vitro study. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e107588, Oct. 2014.

KULKARNI, K. *et al.* Safe to handle? Comparing manually and machine-washed medical devices. **Biomedical Instrumentation & Technology**, Philadelphia, v. 50, p. 18-22, Spring 2016. Suppl.

LAPPIN-SCOTT, H. M.; BASS, C. Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 29, n. 4, p. 250-251, Aug. 2001.

LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**, London, v. 17, n. 6, p. 280-285, Dec. 2011.

LI, X.-L.; JI, G.-Y. 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. **Biomedical Research**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 4680-4687, Mar. 2017.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 64, n. 4, p. 313-325, Dec. 2006.

LING, M. L. *et al.* APSIC guidelines for disinfection and sterilization of instruments in health care facilities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, London, n. 7, p. 25, Feb. 2018.

LING, M. L.; LIM, J. T.; GOH, M. M. Cleaning verification in medical device reprocessing: Is this required? **Canadian Journal of Infection Control**, Toronto, v. 30, n. 4, p. 237-238, May 2015.

LIPSCOMB, I. P. *et al.* Rapid method for the sensitive detection of protein contamination on surgical instruments. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 62, n. 2, p. 141-148, Feb. 2006a.

_____. The sensitivity of approved Ninhydrin and Biuret tests in the assessment of protein contamination on surgical steel as an aid to prevent iatrogenic prion transmission. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 64, n. 3, p. 288-292, Nov. 2006b.

_____. 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. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 65, n. 1, p. 72-77, Jan. 2007.

LIPSCOMB, I. P.; SIHOTA, A. K.; KEEVIL, C. W. Comparative study of surgical instruments from sterile-service departments for presence of residual gram-negative endotoxin and proteinaceous deposits. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 10, p. 3728-3733, Oct. 2006.

_____. Comparison between visual analysis and microscope assessment of surgical instrument cleanliness from sterile service departments. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 68, n. 1, p. 52-58, Jan. 2008.

LOPES, L. K. O. *et al.* Complex design of surgical instruments as barrier for cleaning effectiveness, favouring biofilm formation. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 103, n. 1, p. e53-e60, Sept. 2019.

LUCIANO, C. C. *et al.* Evaluation of the ability of different detergents and disinfectants to remove and kill organisms in traditional biofilm. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 44, n. 11, p. e243-e249, Nov. 2016.

LYON, S. Water quality and its impact on the decontamination process. **Managing Infection Control**, Scottsdale, v. 8, p. 82-97, Oct. 2008.

MACEDO, A.; ABRAHAM, W.-R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 5, n. 6, p. 517-528, Nov. 2009.

MAINIER, F. B. *et al.* Corrosion in surgical instruments. **IOSR Journal of Engineering**, Ghaziabad, v. 3, n. 10, p. 25-31, Oct. 2013.

MANGRAM, A. J. *et al.* Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 27, n. 2, p. 250-280, Apr. 1999.

MASON, T. J. Ultrasonic cleaning: an historical perspective. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 29, p. 519-523, Mar. 2016.

MASSICOTTE, R. **Désinfectants et désinfection en hygiène et salubrité: principes fondamentaux**. Québec: Santé et Services Sociaux Québec, 2009.

MATI, M. L. M. **Reutilização do detergente enzimático: avaliação do impacto da contaminação microbiana da solução na efetividade da limpeza de aparelhos endoscópicos gastrointestinais**. 2018. 92 p. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

MENDONÇA, A. C. C. *et al.* Indicadores de qualidade de processamento de produtos para a saúde em autoclaves a vapor. **Revista de Enfermagem UFPE**, Recife, v. 11, p. 906-914, fev. 2017. Supl. 2.

- MOHITE, S. T. *et al.* Effect of holding time on the bacterial load of surgical instruments. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, Mysore, v. 5, n. 16, p. 763-765, Feb. 2016.
- MONSEN, T. *et al.* In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 8, p. 2496-2501, Aug. 2009.
- MULLANEY, K. Sterilization and disinfection in the operating room. **Perioperative Nursing Clinics**, New York, v. 3, n. 2, p. 127-135, June 2008.
- MUQBIL, I. *et al.* Antimicrobial activity of ultrasonic cleaners. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 60, n. 3, p. 249-255, July 2005.
- MURDOCH, H. *et al.* Surface decontamination of surgical instruments: an ongoing dilemma. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 63, n. 4, p. 432-438, Aug. 2006.
- NAYUNI, N. K. *et al.* Critical evaluation of ninhydrin for monitoring surgical instrument decontamination. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 84, n. 2, p. 97-102, June 2013.
- O'GARA, J. P.; HUMPHREYS, H. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 7, p. 582-587, July 2001.
- O'HARA, N. N. *et al.* Sterile reprocessing of surgical instruments in low- and middle-income countries: a multicenter pilot study. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 43, n. 11, p. 1197-1200, Nov 2015.
- OLIVEIRA, A. C.; MATI, M. L. Indicações e limitações dos diferentes detergentes utilizados no processamento de produtos para a saúde. **Revista SOBECC**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 106-114, abr./jun. 2017.
- OLSEN, H.; FALHOLT, P. The role of enzymes in modern detergency. **Journal of Surfactants and Detergents**, Heidelberg, v. 1, n. 4, p. 555-567, Oct. 1998.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 49-79, 2000.
- OTTER, J. A. *et al.* Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 89, n. 1, p. 16-27, Jan. 2015.
- OTTO, M. Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 7, n. 8, p. 555-567, Aug. 2009.
- PARADA, S. A. *et al.* Instrumentation-specific infection after anterior cruciate ligament reconstruction. **Sports Health**, Thousand Oaks, v. 1, n. 6, p. 481-485, Nov. 2009.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 14, n. 9, p. 576-588, Aug. 2016.

PENNA, T. C.; FERRAZ, C. A. Cleaning of blood-contaminated reprocessed angiographic catheters and spinal needles. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 21, n. 8, p. 499-504, Aug. 2000.

PERCIN, D. *et al.* The relationship between holding time and the bacterial load on surgical instruments. **The Indian Journal of Surgery**, Madras, v. 77, n. 1, p. 16-18, Feb. 2015.

PERRETT, D.; NAYUNI, N. K. Efficacy of current and novel cleaning technologies (ProReveal) for assessing protein contamination on surgical instruments. *In*: WALKER, J. T. (ed.). **Decontamination in hospitals and healthcare**. Cambridge: Woodhead, 2014. p. 598–619.

PFIEDLER ENTERPRISES. **The role fo detergents and desinfectants in instrument cleaning and reprocessing**. Aurora: Pfiedler Enterprises, 2014.

PINTO, F. M. G. *et al.* Analysis of the microbial load in instruments used in orthopedic surgeries. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 38, n. 3, p. 229-233, Apr. 2010.

PRIOR, F. *et al.* Alcoholic fixation of blood to surgical instruments—a possible factor in the surgical transmission of CJD? **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 58, n. 1, p. 78-80, Sept. 2004.

REN-PEI, W. *et al.* Correlation between the growth of bacterial biofilm in flexible endoscopes and endoscope reprocessing methods. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 42, n. 11, p. 1203-1206, Nov. 2014.

REVDIWALA, S.; RAJDEV, B. M.; MULLA, S. Characterization of bacterial etiologic agents of biofilm formation in medical devices in critical care setup. **Critical care Research and Practice**, Cairo, p. 945805, Jan. 2012.

ROBERTS, C. G. The role of biofilms in reprocessing medical devices. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 41, n. 5, p. 77-80, May 2013. Suppl.

ROHM-RODOWALD, E. *et al.* Recommendations for thermal disinfection based on the A0 concept according to EN ISO 15883. **Przegląd Epidemiologiczny**, Warszawa, v. 67, n. 4, p. 687-690, 2013.

RUTALA, W. A. *et al.* Levels of microbial contamination on surgical instruments. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 26, n. 2, p. 143-145, Apr. 1998.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J.; HICPAC. **Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008**. Atlanta: CDC, 2019.

SAITO, Y. *et al.* Microbial contamination of surgical instruments used for laparotomy. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 42, n. 1, p. 43-47, Jan. 2014.

SCHEUERMAN, T. R.; CAMPER, A. K.; HAMILTON, M. A. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 208, n. 1, p. 23-33, Dec. 1998.

SCHWERING, M. *et al.* Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. **Biofouling**, Chur, v. 29, n. 8, p. 917-928, Sept. 2013.

SECKER, T. J.; HERVÉ, R.; KEEVIL, C. W. Adsorption of prion and tissue proteins to surgical stainless steel surfaces and the efficacy of decontamination following dry and wet storage conditions. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 78, n. 4, p. 251-255, Aug. 2011.

SHAMA, G.; MALIK, D. J. The use and abuses of rapid bioluminescence –based ATP assays. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 216, n. 2, p. 115-125, Mar. 2013.

SHEITTOYAN-PESANT, C. *et al.* An outbreak of surgical site infections following craniotomy procedures associated with a change in the ultrasonic surgical aspirator decontamination process. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 45, n. 4, p. 433-435, Apr. 2017.

SHOEMAKE, S.; STOESSEL, K. Cleaning reusable medical devices: a critical first step. **The Clinical Issue**, Oxford, n. 2, p. 1-12, 2007.

SMITH, K. *et al.* Is retained bone debris in cannulated orthopedic instruments sterile after autoclaving? **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 46, n. 9, p. 1009-1013, Sept. 2018.

SMITH, G. W. *et al.* In vitro evaluation of cleaning efficacy of detergents recommended for use on dental instruments. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 40, n. 9, p. e255-259, Nov. 2012.

SOBECC NACIONAL. **Diretrizes de práticas em enfermagem cirúrgica e processamento de produtos para a saúde**. 7. ed. São Paulo: Sobecc Nacional, 2017.

SOUTHWORTH, P. M. Infections and exposures: reported incidents associated with unsuccessful decontamination of reusable surgical instruments. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 88, n. 3, p. 127-131, Nov. 2014.

SPRY, C. C. Care and handling of basic surgical instruments. **AORN Journal**, Denver, v. 86, p. 77-81, 2007.

STAUBITZ, L. E.; RAY, M.; HARRIS, J. J. Cleaning challenges associated with surgical instrument design: a proactive approach. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 45, n. 6, p. S7, June 2017.

STOODLEY, P. et al. Kinetics and morphology of polymicrobial biofilm formation on polypropylene mesh. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 283-290, July 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbial growth. *In*: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (ed.). **Microbiology: an introduction**. 11. ed. Boston: Pearson, 2013. cap. 6, 817 p.

TOSH, P. K. *et al.* Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* surgical site infections after arthroscopic procedures: Texas, 2009. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v. 32, n. 12, p. 1179-1186, Dec. 2011.

TRAMPUZ, A. *et al.* Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 357, n. 7, p. 654-63, Aug 2007.

TRENTIN, D. S.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: Aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

TRIOLA, M. F. **Introdução a estatística**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011. 690 p.

UNITED KINGDOM DEPARTMENT OF HEALTH. **Health Technical Memorandum 01-01: management and decontamination of surgical instruments (medical devices) used in acute care. Part D: washer disinfectant**. United Kingdom: Crown, 2016a.

_____. **Health Technical Memorandum 01-01: management and decontamination of surgical instruments (medical devices) used in acute care. Part B: common elements**. United Kingdom: Crown, 2016b.

_____. **Health Technical Memorandum 01-01: management and decontamination of surgical instruments (medical devices) used in acute care. Part A: management and provision**. United Kingdom: Crown, 2016c.

VEIGA-MALTA, I. Preventing healthcare-associated infections by monitoring the cleanliness of medical devices and other critical points in a sterilization service. **Biomedical Instrumentation & Technology**, Philadelphia, v. 50, p. 45-52, Apr. 2016. Suppl. 3.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VESCAN, A. T. *et al.* Water hardness key element in choosing between washing efficiency with enzyme detergent and the lifespan of the washing machine. **Revista de Chimie**, Bucuresti, v. 69, n. 12, p. 3393-3399, 2018.

VICKERY, K. *et al.* The effect of multiple cycles of contamination, detergent washing, and disinfection on the development of biofilm in endoscope tubing. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 37, n. 6, p. 470-475, Aug. 2009.

VICKERY, K.; PAJKOS, A.; COSSART, Y. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 32, n. 3, p. 170-176, May 2004.

VILAS-BOAS, V. A.; LEVY, C. E.; FREITAS, M. I. P. D. Carga microbiana de trocartes reprocessáveis após laparoscopias ginecológicas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 12, p. 586-591, dez. 2009.

VUONG, C. *et al.* Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Infectious Diseases**, London, v. 188, n. 5, p. 706-718, Sept. 2003.

WEISER, T. G. *et al.* An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. **Lancet**, London, v. 372, n. 9633, p. 139-144, July 2008.

WHITELEY, G. S.; GLASBEY, T. O.; FAHEY, P. P. A suggested sampling algorithm for use with ATP testing in cleanliness measurement. *Infection, Disease & Health*, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 169-175, Dec. 2016.

WHITELEY, M.; DIGGLE, S. P.; GREENBERG, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. **Nature**, London, v. 551, n. 7680, p. 313-320, Nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Decontamination and reprocessing of medical devices for health-care facilities**. Switzerland: WHO, 2016a.

_____. **Global Guideline for the prevention of surgical site infection**. Switzerland: WHO, 2016b.

_____. **WHO guidelines for safe surgery: safe surgery saves lives**. Switzerland: WHO, 2009.

YODA, I. *et al.* Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. **BMC Microbiology**, London, v. 14, p. 234, Sept. 2014.

APÊNDICE A - Carga Microbiana em UFC/50µL de *Staphylococcus epidermidis*. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.

Ensaio	Tempo (horas)	Serrilha						Haste						Cremalheira					
		Contaminação		Limpeza Manual		Limpeza Automatizada		Contaminação		Limpeza Manual		Limpeza Automatizada		Contaminação		Limpeza Manual		Limpeza Automatizada	
1	1	20	15	0	0	0	0	8	6	0	0	0	1	26	18	0	0	4	4
	2	179	110	0	0	0	0	58	37	0	0	0	1	12	12	0	0	0	3
	4	1880	1530	48	66	25	17	149	156	1	7	2	5	142	220	30	23	2	0
	6	1920	2090	207	129	78	73	258	260	45	44	1	1	5740	5600	350	360	2	2
	8	6460	3810	99	100	40	35	1268	1222	132	280	48	49	5970	6780	323	310	22	17
	12	14500	10000	1430	2120	49	60	5060	3400	246	270	36	30	22100	12000	2320	1590	109	87
2	1	193	268	3	4	1	1	58	51	2	5	0	0	41	25	2	4	5	2
	2	101	108	9	8	8	0	258	256	8	9	6	3	50	43	18	7	1	4
	4	270	276	23	17	10	12	121	114	0	0	9	1	184	160	12	17	9	11
	6	760	810	439	414	9	5	210	80	20	34	0	0	1330	1340	993	1029	4	5
	8	2140	2260	444	501	2	3	450	510	6	21	1	0	1780	1650	850	882	9	4
	12	9800	9700	590	900	14	7	4000	3000	1630	1900	134	115	9800	11400	560	7300	218	197
3	1	221	215	2	3	0	0	27	43	6	3	0	0	316	354	0	3	0	0
	2	564	448	0	0	5	0	336	332	0	0	0	0	897	950	9	10	0	0
	4	850	1040	30	32	2	1	440	640	12	14	1	0	3720	3030	778	729	0	0
	6	3640	3810	478	425	0	0	670	710	7	17	0	0	7330	6800	898	973	4	4
	8	11750	11540	499	412	0	0	8180	9700	201	179	0	0	15100	16300	1838	1991	0	1
	12	50900	44200	6600	8400	163	146	48500	35100	380	300	20	17	33300	33900	4900	4600	56	64

APÊNDICE B - Análise comparativa entre as médias de carga bacteriana (Log_{10} UFC/cm²), nos grupos contaminação, relação à limpeza manual e automatizada. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2019.

Área do instrumental	Tempo (horas)	Média Log UFC/cm			Valor P		
		Contaminação	Limpeza Manual	Limpeza automatizada	Contaminação X Limpeza Manual	Contaminação X Limpeza Automatizada	Limpeza Manual X Limpeza Automatizada
Serrilha	1	2,42	0,91	0,15	0,015	0,00	0,007
	2	2,73	0,46	0,94	0,011	0,00	0,352
	4	3,32	1,96	1,29	0,007	0,01	0,144
	6	3,70	2,94	1,80	0,035	0,01	0,025
	8	4,15	2,88	1,43	0,014	0,00	0,022
	12	4,69	3,77	2,09	0,064	0,00	0,019
Haste	1	1,80	1,01	0,045	0,04	0,00	0,000
	2	2,63	0,45	0,014	0,60	0,01	0,792
	4	2,75	1,27	0,004	0,74	0,01	0,195
	6	2,89	1,81	0,069	0,14	0,00	0,001
	8	3,67	2,33	0,069	0,74	0,02	0,113
	12	4,35	3,15	0,050	2,05	0,01	0,036
Cremalheira	1	2,27	0,80	0,018	1,05	0,03	0,049
	2	2,38	1,51	0,196	0,76	0,04	0,000
	4	3,15	2,29	0,280	0,97	0,01	0,095
	6	4,05	3,32	0,053	0,99	0,00	0,000
	8	4,22	3,38	0,080	1,07	0,00	0,011
	12	4,73	3,99	0,017	2,50	0,00	0,001

Fonte: dados da pesquisa; Teste: t-student.

ANEXO A - Laudo Identificação do Microrganismo (D12)

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project Name: 20190327 Natalia IC B
 Project Description:
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2019-03-27T10:56:38.940
 Project Analyte Count: 2
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
D11 (++) (A)	amostra1	Staphylococcus epidermidis	2.201	Staphylococcus epidermidis	1.981
D12 (++) (A)	amostra2	Staphylococcus epidermidis	2.112	Staphylococcus epidermidis	2.098



Matching Hints

Matched Pattern	Comment
-----------------	---------

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte2

Analyte Name: D12
Analyte Description:
Analyte ID: amostra2
Analyte Creation Date/Time: 2019-03-27T10:56:56.960
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Staphylococcus epidermidis DSM 3269 DSM	2.12	1282
2 (++)	Staphylococcus epidermidis DSM 1798 DSM	2.098	1282
3 (++)	Staphylococcus epidermidis DSM 4851 DSM	2.091	1282
4 (++)	Staphylococcus epidermidis 4b_s ESL	2.082	1282
5 (++)	Staphylococcus epidermidis 10547 CHB	2.02	1282
6 (+)	Staphylococcus epidermidis 4b_r ESL	1.884	1282
7 (+)	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 THL	1.823	1282
8 (+)	Staphylococcus epidermidis ATCC 14990T THL	1.739	1282
9 (-)	Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 CHB	1.656	1282
10 (-)	Staphylococcus caprae CCUG 38378 CCUG	1.542	29380

ANEXO B - Protocolo da Microscopia



IT PBIO 020. Rev. 00. Pág.: 2 de 6

Direção: designar os técnicos e viabilizar o funcionamento do laboratório de química com o auxílio do coordenador.

6 DESCRIÇÃO DO PROCESSO

6.1 REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

6.1.1 Reagente

Solução tampão fosfato de sódio 0,2M ou solução tampão cacodilato 0,2M

Solução tampão fosfato de sódio 0,1M ou solução tampão cacodilato 0,1 M

Solução de tetróxido de ósmio 4% em água

Solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato

Solução de ácido tânico 1% em tampão fosfato

Água destilada

Álcool etílico 35%, 50%, 70%, 85% e 95% em água destilada

Álcool etílico absoluto P.A marca Merck

6.1.2 Materiais

Placa de cultura de células de 24 poços com tampa

Pinça de ponta fina curva

Palito de madeira

Pipeta de transferência descartável com capacidade para 7 mL

Tubos tipo Falcon de 15 ou 30 mL

Espátula para pesagem

Papel alumínio

Pipeta automática

Ponteira

6.1.3 Equipamentos

Balança

Capela de exaustão de gases

6.2 CUIDADOS

1. Usar jaleco e luvas descartáveis e prender os cabelos durante todo o processamento;
2. As amostras devem ser manipuladas com cautela para evitar danos estruturais;
3. O procedimento deve ser executado sob a capela pois o tampão cacodilato e o tetróxido de ósmio são tóxicos. Durante a fixação secundária com tetróxido de ósmio a luz da capela deve permanecer desligada e as placas contendo as amostras devem ser tampadas com papel alumínio. Somente durante a desidratação a capela pode ser mantida desligada;
4. Cada tipo de solução ou material tem seu próprio recipiente de descarte. As pipetas Pasteur, ponteiros, tubos tipo Eppendorf, luvas e papel utilizado para forrar a capela são descartáveis;
5. As amostras fixadas recebidas em tubo tipo Eppendorf podem ser processadas no próprio tubo ou transferidas para uma placa de cultura de células de 24 poços. Aquelas recebidas em outros tipos de frascos devem ser transferidas para placas antes do início do processamento;
6. Todas as retiradas e adições de soluções geralmente são feitas com pipeta de transferência, exceto a adição de solução de tetróxido de ósmio 1% que é feita com a pipeta automática.
7. As quantidades de solução de tetróxido de ósmio 1%, e ácido tânico 1% podem variar um pouco em relação aos volumes sugeridos em função do tamanho e quantidade de fragmentos recebidos e da placa utilizada. Os fragmentos devem estar totalmente cobertos/imersos nessas soluções.

6.3 Preparo da solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão 0,1M a partir da solução estoque 4% em água (em capela de exaustão de gases)

1. Calcular a quantidade de solução de tetróxido de ósmio necessária para cobrir todo o material, geralmente 0,5 a 2 mL por amostra, dependendo do tamanho das mesmas.
2. Em um tubo tipo Falcon, adicionar metade do volume calculado no item anterior (item 1) de tampão (fosfato ou cacodilato) 0,2M. Para preparação dessa solução deve-se utilizar o mesmo tampão utilizado na etapa de fixação das amostras.
3. Acrescentar $\frac{1}{4}$ do volume calculado no item 1 de solução de tetróxido de ósmio 4% em água destilada.
4. Acrescentar água destilada até atingir o volume total calculado no item 1.
5. Tampar bem o tubo e, certificando-se de que não há risco de vazamentos, homogeneizar a solução vertendo cuidadosamente o tubo. Cobrir com papel alumínio, para evitar incidência de luz direta.

Exemplo: 20 amostras

Volume total de OsO₄ 1% = 20 x 0,5 mL = 10 mL

Volume de Tampão 0,2 M = 5 mL

Volume de solução estoque de OsO₄ 4% = 2,5 mL

Volume de água destilada = 2,5 mL

6.4 Preparo da solução de ácido tânico 1% em tampão 0,1 M

1. Calcular a quantidade de solução de ácido tânico 1% necessária para cobrir todo o material, geralmente 0,5 mL a 2 mL por amostra, dependendo do tamanho das mesmas;
2. Calcular a quantidade de ácido tânico necessária para o volume calculado no item 1. Deve-se utilizar a proporção de 0,1g para cada 10 mL do volume final da solução;
3. Pesar a quantidade de ácido tânico calculada no item 2, utilizando para isto uma espátula e um pedaço de papel alumínio;
4. Em um tubo tipo Falcon, adicionar metade do volume calculado no item 1 de tampão (fosfato ou cacodilato) 0,2 M. Para preparação dessa solução deve-se utilizar o mesmo tampão utilizado na etapa de fixação das amostras;
5. Acrescentar o ácido tânico;
6. Acrescentar água destilada até atingir o volume total calculado no item 1.
7. Fechar o tubo e homogeneizar.

Exemplo: 20 amostras

Volume total de ácido tânico 1% = 20 x 0,5 mL = 10 mL

Volume de tampão 0,2 M = 5mL

Quantidade de ácido tânico a ser pesado = 0,1g/10 mL = 0,1g

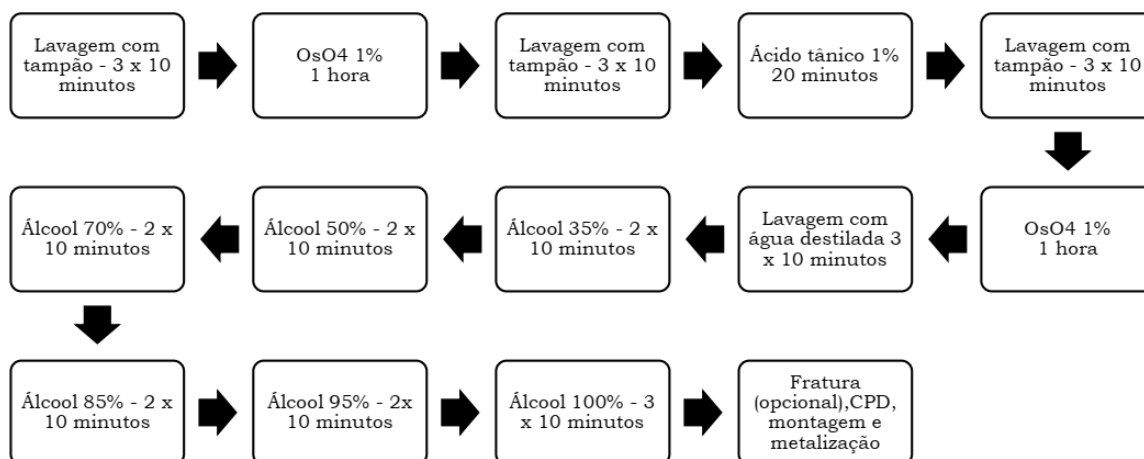
Completar o volume para 10 mL com água destilada

6.5 Procedimentos

1. Retirar a solução em que a amostra está mergulhada com auxílio de uma pipeta de transferência e encher o tubo com tampão fosfato 0,1M ou tampão cacodilato 0,1M (usar o mesmo tampão utilizado na fixação) com outra pipeta. Tampar o tubo e deixar a solução tampão por 10 minutos. Repetir o procedimento por mais duas vezes;
2. Retirar a solução tampão e adicionar cerca de 0,5 – 2 mL de solução de tetróxido de ósmio 1% (dependendo do tamanho das amostras) em tampão 0,1M, utilizando uma pipeta automática. Deixar por 1 hora, à temperatura ambiente, protegido da luz. Manter a capela ligada durante todas as etapas que antecedem a desidratação.
3. Retirar a solução de tetróxido de ósmio com uma pipeta de transferência e adicionar tampão 0,1 M até cobrir completamente as amostras. Descartar a pipeta utilizada para o ósmio. Tampar o tubo e agitar cuidadosamente para facilitar a exclusão do tetróxido de ósmio. Deixar o tubo em repouso por 10 minutos. Repetir a lavagem mais duas vezes;

4. Retirar o tampão e imergir a amostra em solução de ácido tânico 1%. São necessários aproximadamente 0,5 – 2 mL para a imersão, dependendo do tamanho das amostras. Tampar o tubo, e deixar por 20 minutos à temperatura ambiente;
5. Retirar a solução de ácido tânico e adicionar tampão 0,1 M. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir a lavagem das amostras mais duas vezes.
6. Retirar o tampão e adicionar 0,5 a 2 mL de solução de tetróxido de ósmio 1%, com auxílio de uma pipeta automática. Tampar o tubo e deixar por 1 hora, à temperatura ambiente, protegido da luz.
7. Retirar a solução de tetróxido de ósmio com uma pipeta de transferência e adicionar água destilada. Descartar a pipeta utilizada para o ósmio. Tampar o tubo e agitar cuidadosamente para facilitar a exclusão do tetróxido de ósmio. Deixar o tubo em repouso por 10 minutos. Repetir a lavagem mais duas vezes;
8. Retirar a água destilada e adicionar álcool 35%. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento;
9. Retirar o álcool 35% e adicionar álcool 50%. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento;
10. Retirar o álcool 50% e adicionar álcool 70%. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento;
11. Retirar o álcool 70% e adicionar álcool 85%. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento;
12. Retirar o álcool 85% e adicionar álcool 95%. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento;
13. Retirar o álcool 95% e adicionar álcool absoluto da marca MERCK. Tampar o tubo e deixar por 10 minutos. Repetir o procedimento mais duas vezes;
14. Realizar fratura com nitrogênio líquido (opcional – a critério do usuário).
15. As amostras devem ser mantidas em álcool 100%, até que seja possível a realização da secagem em ponto crítico de CO₂. Caso fiquem armazenadas, mantê-las em geladeira e antes de realizar secagem, fazer mais duas trocas de álcool absoluto com duração de 10 minutos cada.
16. Realizar fratura em nitrogênio líquido (opcional para o usuário – IT PBIO 026), secagem em ponto crítico de CO₂ (IT PBIO 025), montagem em stubs (IT PBIO 021), e metalização com ouro (IT PBIO 024).

6.6 Fluxograma



7 REGISTROS

RPA PBIO 002 Recebimento e Processamento de Amostras Biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura.

Histórico das Revisões

Rev.	Data	Itens revisados
00	13/05/2016	Emissão inicial.