Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo

ELISA DONALISIO TEIXEIRA MENDES

Banho de clorexidina para prevenção de colonização e infecção por micro-organismos multirresistentes na unidade de transplante de células tronco e hematopoiéticas.

São Paulo

2015

ELISA DONALISIO TEIXEIRA MENDES

Banho de clorexidina para prevenção de colonização e infecção por micro-organismos multirresistentes na unidade de transplante de células tronco e hematopoiéticas.

São Paulo

2015

ELISA DONALISIO TEIXEIRA MENDES

Banho de clorexidina para prevenção de colonização e infecção por micro-organismos multirresistentes na unidade de transplante de células tronco e hematopoiéticas.

Trabalho apresentado à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para exame de qualificação para obtenção de título de Doutor em Ciências.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Profª Drª Silvia Figueiredo Costa

São Paulo
2015

DEDICATÓRIA

Aos meus amores:
Felipe, Elena e pequeno a caminho
Pela alegria de chegar em casa

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora e amiga Prof.ª Drª Silvia Costa, por ser o melhor exemplo que um aluna pode ter. Por sempre me impulsionar para frente e para cima. Especialmente por mostrar que um professor pode ser academicamente incrível, sem perder a doçura.

À Prof.ª Dra Anna Sara Levin por ser uma verdadeira inspiração de pessoa e profissional para todos à sua volta.

Aos meus amigos da SCIH do HC-FMUSP pelos anos de companheirismo e aprendizado. Vocês foram essenciais para minha caminhada profissional.

Aos meus amigos: Maura Salaroli, Lauro Perdigão e Anna Machado pelo apoio de todas as horas, mas principalmente pelas risadas. Seria impossível sem vocês.

Aos meus pais Rita e Roberto, meus maiores exemplos e incentivadores.

À minha avó Maria Olímpia por tornar sempre tudo possível e mais doce.

RESUMO:

MENDES, E. T. **Banho de clorexidina para prevenção de colonização e infecção por micro-organismos multirresistentes na unidade de transplante de células tronco e hematopoiéticas.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Introdução: Infecções relacionadas à assistência de saúde (IRAS) representam hoje um dos principais desafios da qualidade do cuidado do paciente, principalmente em pacientes submetido a transplante de células tronco e hematopoiéticas (TCTH) O banho diário com a clorexidina (CHG) degermante a 2% tem sido proposto principalmente em unidades de terapia intensivas (UTIs) para diminuir a colonização bacteriana do paciente e assim diminuir IRAS. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do banho com CHG degermante a 2% em unidade de internação de TCTH na incidência de infecção e colonização por patógenos multirresistentes e ainda avaliar seu impacto na sensibilidade das bactérias ao antisséptico.

Métodos: Foi realizado um estudo quasi-experimental, com duração de 9 anos, com início em janeiro/2005 até dezembro/2013. A intervenção foi iniciada em agosto de 2009, sendo que os períodos pré e pós-intervenção tiveram duração de 4,5 anos. As taxas de IRAS, infecção por gram-negativos multirresistentes e infecção e colonização por enterococo resistente a vancomicina (VRE) foram avaliadas através de série temporal, para estudar o impacto da intervenção. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das bactérias para a CHG com e sem o inibidor de bomba de efluxo (CCCP) foram avaliadas nos dois períodos. Os genes de resistência a CHG foram estudados por meio da PCR e a clonalidade

dos isolados por eletroforese em campo pulsátil. **Resultados:** Foi observada redução significativa na incidência de infecção e colonização de VRE na unidade no período pós-intervenção (*p*: 0,001). Essa taxa permaneceu estável em outras UTIs clínicas do hospital. Contudo as taxas de infecção por Gram-negativos multirresistentes aumentou nos últimos anos na unidade. Não ocorreu diminuição na taxa de IRAS na unidade. As CIMs testadas de CHG aumentaram nas amostras de VRE e *K. pneumoniae* após o período de exposição ao antisséptico, com queda importante da CIM após o uso do CCCP, revelando ser a bomba de efluxo, um importante mecanismo de resistência à CHG. As amostras de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* não apresentaram aumento da CIM após período de exposição à clorexidina. As bombas de efluxo Ade A, B e C estiveram presentes na maioria dos *A. baumannii* do grupo controle (66%). A bomba c*epA* foi encontrada em 67% de todas as *K. pneumoniae* testadas e em 44,5% das *P. aeruginosas* do grupo pré-intervenção. Observamos uma relação positiva entre a presença da CepA nas amostras de *K. pneumoniae* e a resposta ao CCCP: de todas as 49 amostras CepA positivas 67,3% obtiveram redução do seu MIC em 4 diluições após adição do CCCP.

A avaliação de clonalidade demonstrou padrão policlonal das amostras de VRE, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* avaliadas. Em relação às amostras de *P. aeruginosa* foi observado que no período pós-intervenção ocorreu predominância de um clone com >80% semelhança em 10 das 22 amostras avaliadas pelo dendrograma.

Conclusões: O banho de clorexidina teve impacto na redução da incidência de infecção e colonização por VRE na unidade de TCTH, e não teve o mesmo

impacto nas bactérias gram-negativas. Os mecanismos moleculares de resistência à clorexidina estão intimamente ligados à presença de bomba de efluxo, sendo provavelmente o principal mecanismo de resistência e tolerância das bactérias ao antisséptico.

ABSTRACT

MENDES, E.T. **Chlorhexidine daily bath for prevention multiresistant microorganisms (MR) colonization and infection in Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) unit in a nine years period.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ABSTRACT:

Background and objectives: Daily skin cleansing with 2% chlorhexidine gluconate (CHG) in patients in intensive care unit is associated with reduction in incidence of multiresistant microorganisms (MR). Data in Hematological Steam Cell Transplant (HSCT), however, is scarce, and studies addressing the impact of this intervention in this population are needed. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of daily bathing with CHG in reducing infection and colonization by MR (vancomycin resistance *Enterococcus* -VRE, *P. aeruginosa, A. baumannii* and *K. pneumoniae*) in HSCT patients and also evaluated the antiseptic susceptibility comparing pre and post intervention period.

Methods: We perform a 9 year pre and post interventional study. In August 2009, was implemented daily bathing with CHG, replacing regular soap in all patients in a 12 beds HSCT ward, located in a tertiary reference hospital in Sao Paulo/Brazil. The goal of the intervention was decreasing MR prevalence in the unit. Therefore we evaluated the incidence-density (ID=cases/1000 patient days) of MR colonization and infection in periods of 4.5 years before and 4.5 years after intervention. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were tested for CHG using Muller-Hinton agar dilution in MR strains isolated pre and post intervention period. The behavior of the strains after introduction of an efflux pump inhibitor (CCCP) was also assessed to study the importance of this

resistance mechanism in relation to CHG. Statistical analyzes were performed using time-series analyses in ARIMA model, and SPSS program was used. P <0.05 was considered statistically significant.

Results: A significant reduction in infection and colonization VRE incidence was observed in post-intervention period (*p* 0.001). The opposite occurred with gran-negative infection and colonization rates, which had increased in recent years at the unit (*p* <0.001). Rates of blood stream infection (BSI) remained stable in both periods. The VRE and *K. pneumoniae* strains showed two fold MIC 50 increase in in the post exposure period. However the strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii* had no MIC 50 increase after antiseptic exposure period. All MIC 50 strains was significant reduced after using the efflux pump inhibitor (CCCP)

Conclusions: The CHG bath showed to be effective in reducing VRE infection and colonization in HSCT unit, and corroborating the literature the same impact was not taken in gram-negative bacteria. The unit microbiota has been impacted by the CHG massive use, however the increase MIC seemed not influence the efficacy of intervention in VRE cases. Molecular mechanisms of resistance to chlorhexidine are closely linked to the presence of efflux pump.

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA 16
1.1. Estratégias de controle 20
1.2. Clorexidina 21
1.3. Resistência bacteriana 25
2. Justificativa do Estudo 31
3. OBJETIVOS 33
4. MATERIAIS E MÉTODOS 35
4.1. Delineamento do Estudo 36
4.2. Local do estudo 37
4.3. Intervenção 38
4.4. Coleta de dados e variáveis do estudo 38
4.4.1. Desfechos: 39
4.4.2. Definições 39
4.5. Perfil de Sensibilidade da Clorexidina: 41
4.6. Realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM) 43
4.6.1. Ágar diluição para Clorexidina 43
4.6.2. Avaliação da CIM para clorexidina com meio associado a inibidor de bomba de Efluxo (CCCP): 43
4.6.4. Avaliação dos Mecanismos de Resistência antimicrobiana:.. 48
4.7 Análise dos dados 53
5 RESULTADOS 55
5.6 Características Gerais da População Estudada: 56
5.7 Taxas de infecção e colonização da unidade nos períodos pré e pós-intervenção: 58
6 DISCUSSÃO 82
Considerações sobre resistência 90
Limitações 92
7 Considerações Finais ..... Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS 96

TABELAS

Tabela 1	Descrição das amostras de bactérias multirresistentes avaliadas no LIM-54 no período do estudo	**42**
Tabela 2.	Iniciadores utilizados para detecção dos genes relacionados às bombas de efluxo: cepA, qacAE, qacE, AdeA, AdeA, AdeB, AdeC e QacAB, associados à resistência à clorexidina.	**44**
Tabela 3.	*Primers* utilizados na PCR para identificação de genes de resistência antimicrobiana	**49**
Tabela 4.	Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes no período pré e pós-intervenção na Enfermaria de TCTH, ICHC-FMUSP, 2005-2013.	**57**
Tabela 5.	Genes de Resistência Antimicrobiana pesquisados nas amostras PRÉ e PÓS-INTERVENÇÃO.	**70**
Tabela 6.	Descrição do perfil de sensibilidade das bactérias à Clorexidina, nos períodos pré e pós-intervenção e após o uso do inibidor de bomba de efluxo CCCP.	**77**
Tabela 7.	Genes de Resistência à Clorexidina pesquisados nas amostras CONTROLE e PÓS-INTERVENÇÃO	**81**

FIGURAS:

Figura 1	Fluxograma das atividades realizadas no LIM 46 da bacteriologia	**45**
Figura 2.	Distribuição Temporal das taxas de infecção e colonização das UTIs por bactérias MR Clinicas do ICHC-FMUSP nos períodos Pré e Pós-intervenção.	**59**
Figura 3.	Distribuição temporal das taxas de infecção e colonização da Enfermaria de TCTH do ICHC-FMUSP nos períodos PRÉ e PÓS intervenção.	**60**
Figura 4.	Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por VRE nos momentos pré e pós intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP de 2005 à 2013	**62**
Figura 5.	Distribuição temporal das densidades de incidência de colonização por VRE nos momentos pré e pós intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP de 2005 à 2013	**63**
Figura 6.	Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por Gram-negativos multirresistentes nos momentos pré e pós intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 à 2013	**64**
Figura 7.	Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por Gram-negativos	**65**

	multirresistentes nos momentos pré e pós intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 à 2013, com exclusão do surto de *P. aeruginosa*, ocorrido em 2012	
Figura 8	Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção de corrente sanguínea nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013	**66**
Figura 9	Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção de corrente sanguínea nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013 com exclusão do surto de *P. aeruginosa*, ocorrido em 2012.	**67**
Figura 10	PCR para a detecção de mecanismo de resistência antimicrobiana IMP, VIM e SPM em amostras de *P. aeruginosa.*	**68**
Figura 11	PCR para a detecção de mecanismo de resistência antimicrobiana OXA 23 em amostras de *A. baumannii*	**69**
Figura 12	PCR para a detecção de mecanismo de resistência antimicrobiana VAN A em amostras de *E. faecium*	**69**
Figura 13	PFGE e Dendrograma das amostras de *P. aeruginosas* isoladas na unidade de TCTH nos	**72**

	momentos pré e pós-intervenção	
Figura14	PFGE e Dendrograma das amostras de *A. baumannii* isoladas na unidade de TCTH no momento pós-intervenção	**73**
Figura 15	: PFGE e Dendrograma das *K. pneumoniae* da unidade TCTH do momento pós-intervenção	**73**
Figura 16	PFGE e Dendrograma das amostras de VRE isoladas na unidade de TCTH nos momentos pré e pós-intervenção	**74**
Figura 17	Placa demonstrativa do experimento para determinação da CIM da clorexidina	**75**
Figura 18	PCR para a detecção de bomba de efluxo AdeB	**79**
Figura 19	PCR para a detecção de bomba de efluxo AdeC	**79**
Figura 20	PCR para a detecção de bomba de efluxo CepA em amostras de *A. baumannii*	**80**
Figura 21	PCR para a detecção de bomba de efluxo CepA em amostras de *K.penumoniae*	**80**
Figura 22	Distribuição temporal das densidades de incidência de colonização e infecção por VRE nos momentos pré e pós-intervenção nas UTIs clínicas do ICHC de 2005 a 2013	**105**

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Infecções relacionadas à assistência de saúde (IRAS) representam hoje um dos principais desafios da qualidade do cuidado do paciente internado, especialmente aqueles com tempo de internação prolongado, inúmeros dispositivos invasivos e com comprometimento do sistema imune.

Estas infecções acarretam maior tempo de internação, aumento da mortalidade e custos elevados para o sistema de saúde (1). Inúmeros fatores contribuem para o aumento das IRAS, tais como o aumento da resistência bacteriana, aumento da população de pacientes mais suscetíveis às complicações da internação, como os imunodeprimidos e idosos, além da maior utilização de procedimentos diagnósticos e terapêuticos complexos e invasivos (2).

A resistência bacteriana tem sido um obstáculo cada vez mais frequente neste cenário, responsável por grande proporção das IRAS nestes indivíduos (2). Essas bactérias colonizam e provocam doença em pacientes vulneráveis, principalmente os com dispositivos invasivos e em uso de antibioticoterapia de amplo espectro. Além disso, são capazes de se perpetuar no ambiente por longos períodos, oferecendo risco de transmissão cruzada por meio das mãos dos profissionais de saúde e do contato com o ambiente, equipamentos e aparelhos que auxiliam o cuidado (3). Além disso, sabe-se que a transmissão cruzada pode promover a troca de genes de resistência entre os micro-organismos, principalmente entre bacilos gram-negativos (BGN) (4).

Dentre a população de pacientes imunodeprimidos, os submetidos ao transplante de células tronco e hematopoiéticas (TCTH) são os mais

vulneráveis. Durante o condicionamento e após a infusão da medula, estes pacientes apresentam uma profunda aplasia medular que dura até a pega do enxerto, que ocorre em média após 14 dias nos transplantes autólogos e 21 dias nos alogênicos (5, 6).

Nesta primeira fase, a neutropenia prolongada, a mucosite causada pela terapia mieloablativa, a presença de dispositivos (cateteres de longa permanência) e a doença de enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) aguda levam à quebra de barreira mucocutânea. Esta lesão propicia episódios de bacteremia, infecção fúngica, frequentemente por *Candida* sp. ou *Aspergillus* sp. e a reativação de inúmeros vírus. Além disso, os pacientes recebem antibióticos profiláticos e empíricos que podem, por pressão seletiva, levar ao desenvolvimento de infecção por micro-organismos multirresistentes, especialmente por enterococo resistente à vancomicina (VRE) e gram-negativos sensíveis a apenas polimixinas, aumentando a morbimortalidade associada ao procedimento (7,8).

Estes pacientes apresentam inúmeros fatores que contribuem para colonização e infecção por VRE, tais como o uso frequente e prolongado de glicopeptídeo e as já citadas quebras de barreiras cutâneas e do trato gastrointestinal, como a mucosite e o GVHD. (9,10,11). A doença diarreica por *Clostridium difficile* também foi associada a maior risco de colonização e bacteremia por VRE (12,13)

Nos últimos anos foi observado um aumento da colonização por VRE nesta população, sendo que alguns centros já relatam ser esta a primeira causa de bacteremia no período de aplasia medular, antes da enxertia da medula óssea (7).

Em Chicago (8), Calderwood et al relataram prevalência de 67,3% de colonização por VRE entre pacientes submetidos à TCTH e 24,1% entre pacientes não submetidos a este procedimento. Estudo recente da Universidade de Minessota (2012), demonstrou que a colonização por VRE aumenta o risco de bacteremia por este micro-organismo, principalmente entre os pacientes com persistência da neutropenia (9). Além disso, os autores demonstraram que pacientes com bacteremia por VRE tiveram maior mortalidade em um ano após TCTH, em comparação com pacientes que apresentaram bacteremia por enterococo sensível à vancomicina (VSE). Este pior prognóstico não foi observado neste grupo em curto prazo, o que sugere que a infecção por VRE comporta-se como um marcador de mau prognóstico nestes pacientes.

Outros estudos também demonstraram que a colonização por VRE apresenta-se como preditor de pior prognóstico (10,11), porém sua real influência na mortalidade é questionada devido a diversos fatores confundidores da fase peri-transplante.

Apesar de não existirem estudos controlados específicos para esta população, é recomendado o precaução de contato para pacientes colonizados por VRE, para tentar diminuir a infecção cruzada entre os pacientes internados. (6)

Em estudo retrospectivo de nove anos de TCTH, realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, HCFMUSP, o VRE foi responsável por 18,7% das bacteremias, sendo o terceiro micro-organismo mais comum de bacteremia, atrás da *Pseudomonas aeruginosa* e do estafilococo coagulase negativo (14).

Em contrapartida, a incidência de infecção por bacilos gram-negativos tanto da família Enterobacteriaceae *(Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, entre outras) como os não fermentadores (*Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*) tem crescido em todo o mundo, com alta mortalidade e escassas opções terapêuticas (15).

No Brasil os bacilos gram-negativos são o principal agente etiológico das infecções relacionadas à assistência de saúde (16). A disseminação e perpetuação desde tipo de patógeno estão diretamente relacionadas à baixa adesão às práticas de higiene e à falta de recursos humanos na assistência ao paciente. (16)

As bacteremias em pacientes hematológicos, antes fortemente associadas às bactérias gram-positivas, têm apresentado mudanças na última década, possivelmente pela emergência destas amostras gram-negativas multirresistentes no ambiente hospitalar (17,18).

Em estudo no HC-FMUSP foram avaliados 429 TCTH (14), sendo que as bactérias gram-negativas foram responsáveis por pouco mais da metade dos casos (52,3%) de bacteremia, sendo *P. aeruginosa* o principal agente etiológico isolado, com 22% dos casos.

1.1. Estratégias de controle

Múltiplas estratégias têm sido propostas para controle das infecções por micro-organismos multirresistentes, usualmente relacionadas à mudança de comportamento dos profissionais de saúde perante o cuidado do paciente durante a internação.

Campanhas para promoção de práticas de higiene das mãos, cuidados na manipulação do cateter venoso central e aplicação de um conjunto de medidas associadas à prevenção de IRAS são recomendadas como intervenções para redução da transmissão cruzada de micro-organismos multirresistentes (19,20). Porém, são necessárias estratégias complementares para a prevenção de IRAS, principalmente em um cenário onde prevalecem pacientes em estado crítico e imunodeprimidos, pois as opções terapêuticas são escassas e a mortalidade é alta. (15, 21)

1.2. Clorexidina

Estudos recentes têm proposto o uso da clorexidina como parte do arsenal de controle de IRAS (22). Trata-se de antisséptico tópico largamente usado nos hospitais há mais de 40 anos, com diversas formulações e concentrações disponíveis, dependendo da indicação do uso.

A clorexidina é uma biguanida catiônica solúvel em água, com atividade contra micro-organismos gram-positivos, gram-negativos, anaeróbios facultativos e leveduras. Não tem ação contra esporos e apresenta pouca atividade antiviral (23).

Em baixas concentrações, a clorexidina altera o equilíbrio osmótico bacteriano e reduz a sua capacidade metabólica e em concentrações mais elevadas, como as disponíveis comercialmente, é capaz de romper a membrana plasmática bacteriana. Este antisséptico tem atividade bactericida residual não sendo inativado na presença de matéria orgânica,

entretanto, apresenta início de ação mais lento quando comparado com outros biocidas (23).

Em meta-análise publicada em 2002, relata-se redução em 49% das taxas de BACTEREMIA relacionadas ao cateter venoso central (ICS-RC) com o uso clorexidina no preparo da pele para inserção do CVC, em comparação com o iodo povidine (24). Dispositivos impregnados com a clorexidina também têm sido usados na tentativa de diminuir a colonização do cateter e em consequência, o risco de ICS-RC. O uso do cateter impregnado de clorexidina e sulfadiazina de prata demonstrou redução nas taxas de ICS-RC, que variaram de 1,5-3 vezes, sendo que os cateteres impregnados com outros tipos de antibióticos/antissépticos não obtiveram o mesmo sucesso. (25).

Com o objetivo de diminuir a colonização da pele no sítio de inserção do cateter, curativos impregnados com clorexidina também foram testados, demonstrando eficácia na diminuição das taxas de ICS-RC, em meta-análise de 2006 (26).

O uso de clorexidina pré-cirúrgico no preparo da pele demonstrou efeito antisséptico residual maior do que o iodo povidine, além de maior poder de descolonização da flora da pele, porém sem claras evidências de diminuição nas taxas de infecção do sítio cirúrgico (27).

A higiene oral com soluções aquosas de clorexidina vem sendo incluída em pacotes de medidas para diminuição das taxas de pneumonia associada à ventilação (PAV). Como medida isolada apresenta apenas uma tendência favorável entre pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (28).

A prática do banho de CHG diário em pacientes internados é mais uma estratégia proposta para redução das taxas de IRAS e tem objetivo de diminuir a carga bacteriana que coloniza a pele dos pacientes críticos internados.

Estudos que avaliam o impacto desta medida nas taxas de infecção em UTIs e na colonização dos pacientes internados têm sido realizados principalmente em delineamento quasi-experimental, tendo como grupo controle a própria unidade no período anterior à intervenção.

Um dos únicos estudos que avaliou o efeito do banho diário de clorexidina nas taxas de IRAS em enfermarias encontrou tendência não significativa de redução de infecção por VRE e MRSA (RR = 0,48; 95% CI, 0,2–1,0; p = 0,06) (29).

Em 2009, um estudo multicêntrico, também com controle histórico, realizado em pacientes internados em UTI demonstrou diminuição de 73% nas taxas de bacteremia por VRE com o uso do banho diário de clorexidina (30).

A diminuição da colonização da pele do paciente por VRE, assim como das mãos dos profissionais de saúde, foram relatadas após banho diário de clorexidina nos pacientes internados na UTI, em um estudo quasi-experimental, em 2006 (31).

Estudo australiano de 2013 (32) avaliou o impacto do banho de clorexidina na enfermaria de pacientes onco-hematológicos, observando as taxas de colonização por VRE três meses antes e três meses depois da implantação do banho na unidade. Observou redução de 8% para

3,8% da taxa de colonização após intervenção, porém sem significância estatística, com RR: 0,48 (0,21-1,09) e p: 0,07.

Outros autores, usando o mesmo desenho de investigação encontraram diminuição na taxa de contaminação de hemoculturas, além da redução na colonização da pele dos pacientes com o uso do banho (33,34).

O primeiro estudo realizado de maneira prospectiva do tipo *cross-over*, foi nos Estados Unidos em 2007, com duração de um ano em UTI clínica. Os autores relataram redução significativa na incidência de ICS-RC e do tempo de internação na UTI no grupo que tomou banho diário com clorexidina (35).

Milstone *et al* (2013), também realizaram estudo prospectivo, cross-over, multicêntrico em 10 unidades de terapia intensiva pediátricas nos Estados Unidos. Observaram que o banho de clorexidina nessa população diminuiu em 36% o risco de bacteremia durante a internação, sendo que esta redução ocorreu às custas de infecções por bactérias gram-positivas. Não foi observada diferença significativa na incidência de ICS por Gram-negativos nos dois períodos (36).

Em estudo da universidade de Harvard (2013), de mesmo desenho epidemiológico (37), foram alocadas 8 UTIs e 1 unidade de TCTH. Observou-se uma redução na colonização por micro-organismos multirresistentes (6,60 versus 5,10 casos/1000 pacientes-dia p = 0.03). A taxa total de bacteremia também teve redução significativa (5,24 versus 3,61 bacteremias/1000 pacientes dia p: 0,01), porém novamente neste estudo, não foi observada diferença na incidência de infecção por bactérias Gram-negativas.

Poucos estudos avaliaram especificamente o impacto do banho de clorexidina nas taxas de IRAS por bacilos gram-negativos multirresistentes em UTIs. Evans *et al* em 2010, analisaram o impacto da medida quanto à colonização e IRAS por MRSA e por *Acinetobacter baumannii* em pacientes de uma UTI de trauma (38), onde foi encontrada tendência de diminuição da taxa de colonização pelo *Acinetobacter baumannii* e redução efetiva ($p < 0,001$) na incidência de PAV por MRSA.

Borer *et al.* relataram em 2007, que o uso do banho de clorexidina diário na UTI diminui em 85% a taxa de ICS-RC por *Acinetobacter baumannii*, com significativa diminuição das taxas de colonização da pele dos pacientes (39). Os autores demonstraram também que as espécies colonizantes da pele eram as mesmas encontradas no sangue periférico, justificando o sucesso da intervenção.

O banho de clorexidina também foi usado com sucesso no controle de surto por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), em hospital de retaguarda em Chicago, EUA (40).

1.3. Resistência bacteriana

O mecanismo molecular da resistência bacteriana aos antissépticos é ainda pouco entendido. Até o momento, faltam estudos clínicos prospectivos que avaliem o impacto do uso prolongado de antissépticos, particularmente da clorexidina no desenvolvimento de resistência.

O próprio termo “resistência” deve ser usado com cautela, já que pontos de corte não são conhecidos e as concentrações disponíveis no mercado são usualmente maiores do que as necessárias para inibir o micro-organismo.

Estudos publicados sobre o tema falham em distinguir a resistência bacteriana ao biocida (fenômeno usualmente irreversível), à adaptação fenotípica do micro-organismo ao antisséptico após exposição prolongada (tolerância). Supõe-se neste caso, que após a retirada do estímulo, as bactérias voltem ao nível basal de resposta ao antisséptico, portanto o real efeito da elevação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) ao biocida continua questionável (41).

A CBM é definida como a concentração mais baixa de antimicrobiano/ antisséptico que reduza em ≥ 99,9% a viabilidade do inócuo bacteriano inicial. (41,42). O fato de a bactéria ter CIM elevada para um biocida, não significa que ela irá sobreviver à desinfecção, pois a CIM é testada em condições de altas concentrações de matéria orgânica. (41)

Sabe-se que alguns fatores como realização de diluições inapropriadas, presença de matéria orgânica, ocorrência de biofilmes e tempo de exposição ao antisséptico, podem gerar tolerância e resistência, criando um problema importante no controle de infecção hospitalar (43).

Casos de tolerância e resistência a esse antisséptico têm sido reportados na literatura com múltiplos mecanismos propostos, incluindo principalmente a bomba de efluxo em gram-negativos e os mecanismos plasmidiais que também codificam bombas de efluxo em bactérias gram-positivas, especialmente MRSA (42).

Os genes qac (*quaternary ammonium compound-resistance protein*) codificam bombas de efluxo próton-dependentes (44). Vários estudos apontaram esses genes, (principalmente gene *qacA/B*) como

responsáveis pelo aumento da CIM de gram-positivos, especialmente MRSA, aos antissépticos (30, 38, 39, 42). No Brasil, 75 amostras de MRSA foram avaliadas em três hospitais do Rio de Janeiro e o gene *qacA/B* foi encontrado em 80% delas (45).

Estudo publicado em 2008 demonstrou que a exposição por 48hs à clorexidina em concentrações sub-ótimas provocou elevação da CIM de MRSA para cefotaxime, vancomicina, gentamicina, cefuroxima e oxacilina (46). Porém não ocorreu a reavaliação das CIMs depois de retirada a exposição à clorexidina.

Em 2010, Batra *et al.* sugeriram que o banho com este antisséptico é medida efetiva para redução de circulação de amostras de MRSA suscetíveis à clorexidina em uma UTI, porém está associado a um aumento da incidência de amostras com CIM elevada à clorexidina (33).

Estudo conduzido no Japão testou a sensibilidade de 283 isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* a vários antissépticos tópicos e registrou redução da CIM da clorexidina em 4,6% dos isolados. Foi observado que as amostras apresentavam maiores CMBs, necessitavam de um tempo de exposição 10 vezes mais longo para atingir a mesma redução bacteriana (47). Outro estudo realizado em UTI da Escócia mostrou redução da prevalência de MRSA de 15% para ≤ 3,5%, após medidas de vigilância de pacientes colonizados e banho diário de clorexidina. Neste estudo não foi observado aumento de resistência desses isolados à clorexidina (48).

Apesar de vários estudos terem sido conduzidos para avaliar mecanismos de resistência entre isolados de *Staphylococcus aureus*, pouco se sabe

sobre o comportamento dos Enterococos e enterobactérias quando expostos à clorexidina.

Estudos na maioria *in vitro* têm sido conduzidos para avaliar mecanismos de resistência destas bactérias à clorexidina. Foi descrito em 2012, a presença do gene qac A/B em 0,7% das 585 amostras de enterococos testadas (49). Em 2012, Abuzaid *et al.* (43) avaliaram 64 isolados de *Klebsiella pneumoniae* identificando redução da sensibilidade à clorexidina em 50 amostras (78,1%). A presença de genes associados à resistência de antisséptico (*cepA*, *qacAE qacE*) foi pesquisada por meio de Reação de Cadeia de Polimerase (PCR), sendo identificada em 56 (87,5%) dos 64 isolados. Apenas cinco isolados com CIM elevada para clorexidina não foram positivos para o gene *cepA*.

O mecanismo de efluxo é expresso em todas as células com a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multirresistentes (50). O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, porém, não ocasiona nenhuma alteração ou degradação da droga (50).

Abuzaid et al.(43) avaliaram os efeitos de um inibidor de bomba de efluxo (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona - CCCP) em uma concentração de 10mg/L nas CIMs das amostras à clorexidina. Obtiveram uma diminuição de 8 -128 diluições nas CIMs do antisséptico, concluindo que a presença da bomba de efluxo parece ser o principal mecanismo de aumento da CIM da clorexidina. Definiu em seu estudo que a diminuição de 4 diluições ou mais da CIM da bactéria na presença do CCCP, sugere a atuação da bomba de efluxo como mecanismo de resistência.

Estudo *in vitro* de *Serratia marcescens* também demonstrou que a exposição prolongada a antissépticos pode estimular o surgimento de amostras resistentes a vários tipos de biocidas e também a antibióticos. Neste estudo essa resistência foi associada ao gene *hasF*, sabidamente codificador de uma bomba de efluxo (51).

Kõljalg *et al.* também sugerem que a resistência antimicrobiana está associada à tolerância aos biocidas e após avaliar 70 amostras, descreveu maior resistência entre as bactérias Gram-negativas não fermentadoras, em comparação com as enterobactérias e Gram-positivas (52).

É descrito em *Pseudomonas aeruginosa* que a expressão da bomba de efluxo *mexCD-oprJ* pode ser um determinante da resistência desta bactéria à clorexidina (53). Porém, pouco se sabe sobre mecanismos de resistência das Pseudomonas específicos aos antissépticos.

Entretanto, vale novamente ressaltar que a evidência de tais achados laboratoriais de resistência a antissépticos e sua correlação com evidências clínicas, ainda não está estabelecida, visto que as concentrações recomendadas de clorexidina são mais elevadas do que as concentrações testadas por *Batra e colaboradores* (33).

Estudos que avaliem o custo/efetividade do uso da clorexidina para prevenção de IRAS já foram realizados principalmente em serviços norte-americanos, porém foram estimados apenas em curativos e cateteres impregnados com o antisséptico na prevenção de ICS-RC (54). Ainda não foi avaliado o banho de clorexidina como medida de prevenção de IRAS.

De maneira geral, o uso de clorexidina é seguro e bem tolerado, associado a poucos eventos adversos. A dermatite de contato é a ocorrência mais comum, com alguns relatos de reações anafiláticas mais graves e de ototoxidade (22). O baixo custo do banho diário na unidade de terapia intensiva também é uma vantagem, com gasto de US$ 1- 5,0 por dia, dependendo da preparação comercial disponível (55), sendo praticamente o mesmo preço do sabonete comum.

Por motivos citados acima, a implementação do banho de clorexidina na rotina de uma unidade de internação representa uma das possíveis intervenções para prevenção de IRAS por bactérias multirresistentes. Trata-se de intervenção relativamente simples, de baixo risco, baixo custo e com potencial benefício na batalha contra as IRAS.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

No Brasil, e também particularmente no Hospital das Clínicas da FMUSP, as infecções por bactérias multirresistentes têm sido o principal desafio do controle de IRAS.

Além das medidas educacionais que devem sempre ser consideradas na tentativa de controle das taxas de infecção, colonização e transmissão cruzada dos patógenos, o banho de clorexidina parece ser uma medida promissora, de fácil adesão, baixo custo e poucos efeitos adversos.

Porém, ainda faltam evidências para seu emprego na rotina, principalmente em relação ao impacto desta medida em unidades com predomínio de gram-negativos, como ocorre no Brasil.

Além disso, há uma escassez de estudos que avaliem a emergência de resistência bacteriana a este antisséptico, principalmente em um cenário de multirresistência como o brasileiro. Esse aspecto precisa ser estudado para que se tenha mais segurança no uso da clorexidina em estratégias de controle de IRAS no país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Principal

Avaliar o impacto do banho de clorexidina na infecção e colonização por bactérias multirresistentes (gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos e VRE) na enfermaria do TCTH.

3.2. Objetivos Secundários

Avaliar o impacto do uso da clorexidina no banho diário de pacientes na incidência de IRAS na enfermaria do TCTH.

Avaliar a concentração inibitória mínima da clorexidina das bactérias multirresistentes antes e após a implementação do uso de clorexidina no banho diário do paciente.

Avaliar a clonalidade das bactérias multirresistentes e os mecanismo de resistência à clorexidina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

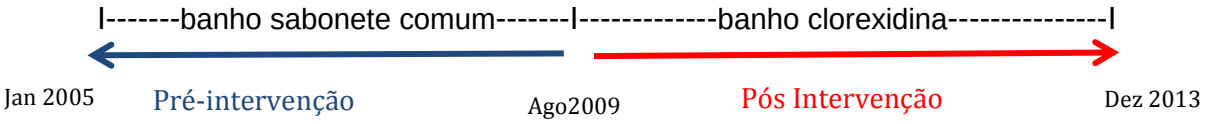
4.1. Delineamento do Estudo

Foi realizado um estudo de intervenção *quasi-experimental*, sendo padronizado em agosto de 2009 o banho diário de clorexidina degermante (digluconato de clorexidina 2%), nos pacientes internados na enfermaria de TMO do Hospital das Clínicas da FMUSP substituindo o sabão líquido usado até então.

Foram avaliadas diversas variáveis nos dois períodos "pré-intervenção" (Jan/2005-Jul/2009) e "pós-intervenção" (Ago/2009-Dez/2013).

As variáveis em questão foram: densidades de incidência mensais de IRAS por sítio, densidades de incidência das infecções por micro-organismos multirresistentes gram-negativos (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos) e ainda densidade de incidência de infecção e colonização por *E. faecium* resistentes aos glicopeptídeos (VRE). As características clínicas e epidemiológicas dos pacientes internados na unidade também foram analisadas.

O período total do estudo foi de 9 anos, sendo 4,5 anos pré-intervenção (controle histórico) e 4,5 anos após a intervenção.



Além destas variáveis foi avaliado o perfil de sensibilidade (concentração inibitória mínima-CIM) de clorexidina das amostras multirresistentes (*P. aeruginosa, A. baumannii, K. pneumoniae* e VRE) isoladas na unidade no

período pós-intervenção, comparando com amostras isoladas na unidade no período pré-intervenção.

Em relação à *K. pneumoniae* e *A. baumannii* não foram encontradas amostras armazenadas no laboratório de pesquisa LIM 54 no período pré-intervenção, pois tais bactérias ganharam importância epidemiológica no HCFMUSP apenas a partir de 2010. Foram portanto, avaliadas como amostras comparativas, amostras de outras unidades do hospital e ainda de outro serviço (Hospital Universidade Estadual de Londrina).

Todas estas amostras também foram mensuradas quanto à resposta ao inibidor de bomba de efluxo (CCCP), para avaliar a importância deste mecanismo de resistência neste cenário.

Os mecanismos de resistência à clorexidina e aos antimicrobianos foram avaliados nestas amostras através da reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), para determinar genes de resistência. Foi também realizado o PFGE (pulsed-field gel eletroforesis) e dendrograma para analisar a clonalidade das amostras.

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

4.2. Local do estudo

O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Trata-se de um hospital de 2.200 leitos, sendo que 1.000 deles estão localizados no Instituto Central, onde o estudo foi conduzido. A enfermaria de TCTH dispõe de oito leitos sendo realizados em média 10-12 novos transplantes por mês.

4.3. Intervenção

O banho com clorexidina (digluconato de clorexidina 2% - Riorex®), foi padronizado pela equipe de enfermagem da enfermaria de Transplante de Medula Óssea (ETMO) juntamente com a Subcomissão de Controle de Infecção Hospitalar (SCCIH) no mês de agosto de 2009, com orientação de que o produto não deve ser aplicado na cabeça, por toxidade em ouvidos e olhos, assim como em pele não íntegra.

Esta intervenção foi mantida durante todo o período do estudo a partir da implantação, sendo importante ressaltar que as chefias de enfermagem permaneceram inalteradas no período descrito. Não foi realizado período de “washout” pois a intervenção não foi interrompida.

A clorexidina é amplamente utilizada em meio hospitalar desde 1950, e já era utilizada no HC-FMUSP para degermação de sítio cirúrgico, inserção de cateter venoso central entre outros procedimentos invasivos.

4.4. Coleta de dados e variáveis do estudo

Os dados utilizados referentes aos pacientes, taxas de infecção e colonização foram coletados na rotina diária pela equipe da SCCIH, como realizado nas demais unidades do hospital.

As variáveis de estudo foram constituídas por indicadores, taxas e percentuais, analisando-se as tendências temporais e resultados antes e após a intervenção.

4.4.1. Desfechos:

- O desfecho primário foi a densidade de incidência de infecção pelas bactérias multirresistentes: VRE, *Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, e densidade de incidência de colonização por VRE em qualquer sítio no período do estudo.

Também foram analisados os desfechos:

- Densidade (ou taxas) de incidência de IRAS por qualquer micro-organismo, em qualquer sítio, notificadas pela equipe de SCCIH, dos períodos de 4,5 anos com e sem intervenção.
- Proporção de sensibilidade à clorexidina das bactérias isoladas antes e após a intervenção.

4.4.2. Definições

As densidades de incidência (DI) de infecção foram construídas segundo a fórmula:

- DI IRAS = Casos de IRAS/paciente-dia do mês x 1000
- DI de colonização por VRE= Número de pacientes colonizados/pacientes-dia x 1000
- DI de infecção por patógeno específico = Infecção em qualquer sítio por gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos /paciente dia no mês x 1000

- DI de infecção por VRE = Infecção em qualquer sítio por VRE /paciente dia no mês x 1000

Foram utilizadas as definições dos CDC (*Centers for Disease Control and Prevention)* para infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (56).

Foram considerados bacilos gram-negativos multirresistentes (BGN-MR) pela SCCIH do HC-FMUSP, BGNs resistentes ou com sensibilidade intermediária a qualquer um dos carbapenêmicos. As densidades de incidência de IRAS em geral e as taxas de infecção por BGN-MR foram construídas a partir de dados coletados diariamente na rotina e registrados pela equipe da SCCIH.

Também foi realizada a descrição da população internada na unidade nos períodos avaliados (sexo, idade, doenças hematológicas de base, tipos de transplantes, comorbidades, mortalidade em 30 dias e 1 ano pós TCTH)

Na unidade de TMO, é realizada vigilância de colonização por VRE com coleta de *swab* anal semanal em todos os pacientes internados na unidade, semeado em meio enriquecido com 16µg/ml de vancomicina. Eram realizados pelo laboratório de microbiologia do ICHC (DLC) desde o início do estudo. Todos os pacientes diagnosticados como colonizados ou infectados por micro-organismos multirresistentes, eram mantidos em isolamento de contato até a alta hospitalar.

4.5. Perfil de Sensibilidade da Clorexidina:

Foi avaliada a concentração inibitória mínima da clorexidina das bactérias isoladas no período pré e pós-intervenção, e com isso avaliamos o impacto do uso maciço deste antisséptico na microbiota da unidade. O grupo comparativo de amostras foi formado por bactérias isoladas no período pré-intervenção da unidade de TMO, por bactérias de outras unidades do Hospital das Clínicas e bactérias de outro hospital (HU/UEL).

As amostras utilizadas estão descritas na Tabela 1

Foram incluídos tanto espécimes clínicos das IRAS no período pré e pós-intervenção como das amostras isoladas por cultura de vigilância (*swabs* retais ou coprocultura) colhidas semanalmente na unidade para VRE e apenas em situação de surto para os BGN-MR, armazenados no LIM-54.

A análise foi realizada a partir de amostras já armazenadas do laboratório de pesquisa LIM-54 (Laboratório de Microbiologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP). Por ser um laboratório de pesquisa, disponibilizava armazenamento das amostras isoladas e utilizadas por demanda acadêmica.

Tabela 1: Descrição das amostras de bactérias multirresistentes avaliadas no LIM-54 no período do estudo

	A. baumannii	***K. pneumoniae***	***P. aeruginosa***	**VRE**
	Total: 24	Total: 88	Total: 46	Total: 48
Pré-intervenção (TMO)	-	-	18	28
Pós-intervenção (TMO)	6	27	28	20
HC-FMUSP (outras unidades)	18	30	-	-
Hospital de Londrina	0	31	-	-

TMO: transplante de medula óssea

4.6. Realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.6.1. Ágar diluição para Clorexidina:

O teste de ágar-diluição foi realizado conforme descrito por Abuzaid et al (43).

As concentrações testadas foram 0–256 mg/l e foram incluídas em cada experimento os controles *K. pneumoniae* ATCC13883 (CIM de clorexidina de 16ug/ml) e *E. coli* ATCC25922 (CIM de clorexidina de 2ug/ml).

Cada experimento foi repetido por três vezes e descartado caso as ATCCs tivessem variação >1 diluição.

O experimento era considerado válido, no caso de: a placa de controle de crescimento (concentração de clorexidina ZERO) fosse totalmente positiva, se os resultados das ATCCs variassem no máximo 1 diluição do valor padronizado, se as três CIMs obtidas fossem iguais, ou se apenas uma das CIMs testadas variasse uma diluição (p.ex.: teste 1: CIM 2ug/ml, teste 2: CIM 2ug/ml; teste 3: CIM 1ug/ml). Nesse caso o teste 3 seria descartado e o valor da CIM considerado para a amostra seria 2 µg/ml.

4.6.2. Avaliação da CIM para clorexidina com meio associado a inibidor de bomba de Efluxo (CCCP):

Com o objetivo de avaliar o papel da bomba de efluxo no perfil de sensibilidade das amostras à clorexidina, foi realizada a avaliação das CIM em associação do inibidor da bomba de efluxo CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona - Sigma®) ao meio de cultura.

O produto foi diluído em 1 ml de água destilada, e adicionada às placas de Muller Hilton na concentração final de 10mg/l (43), sendo que as

placas apresentavam as mesmas concentrações crescentes de clorexidina dos testes anteriormente descritos (variando de 0- 256), determinando assim a CIM das amostras nestas condições. Uma diminuição de no mínimo 4x a CIM das amostras indicou a presença de alguma bomba de efluxo (43).

4.6.3. Avaliação dos Mecanismos de Resistência à Clorexidina:

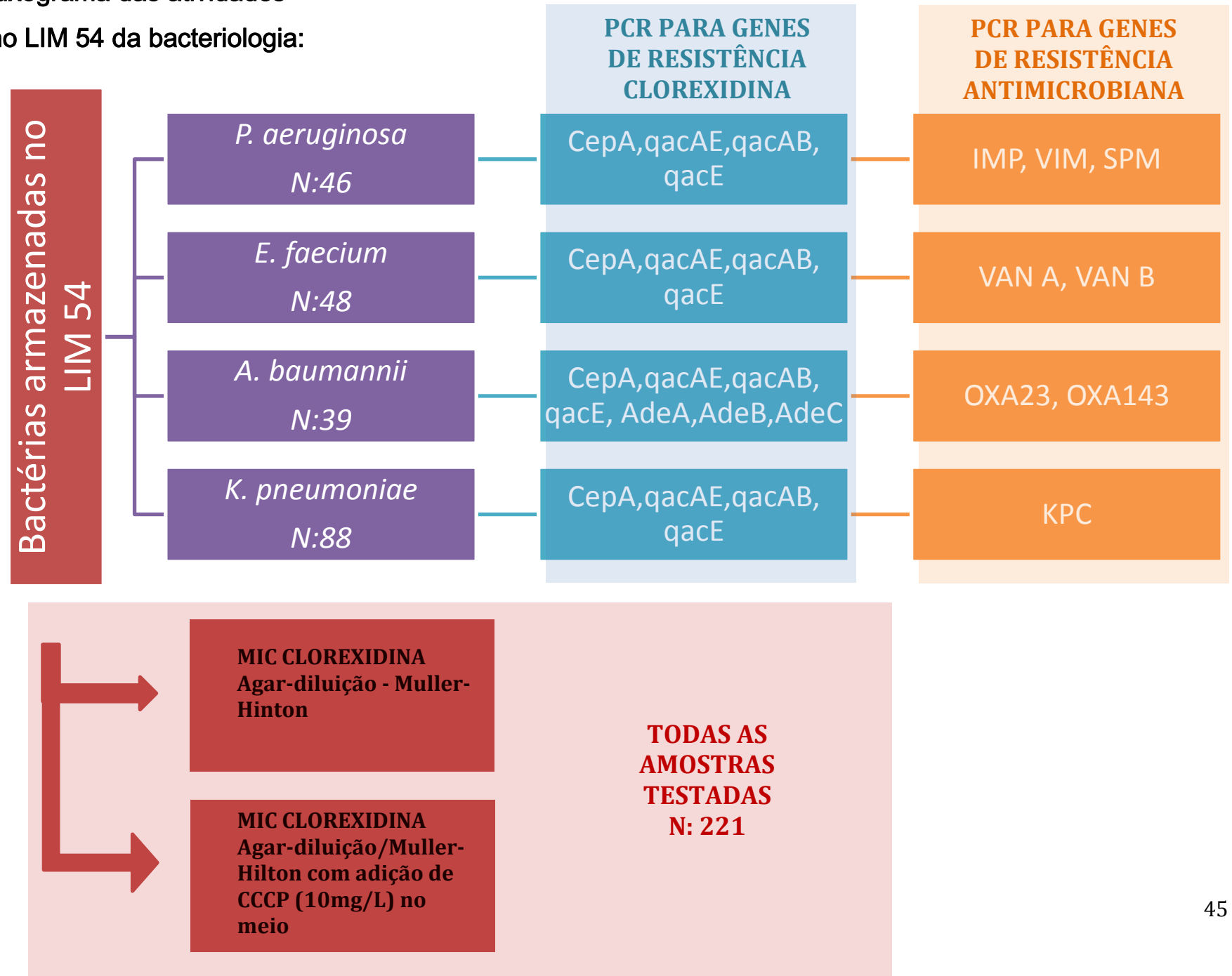
Os mecanismos de resistência de clorexidina foram avaliados pela amplificação em cadeia da polimerase (PCR) de genes específicos associados à resistência aos antissépticos. As PCRs e *primers* utilizados com as suas respectivas referência estão descritos na Tabela 2

Tabela 2 – *Primers* utilizados para detecção dos genes relacionados às bombas de efluxo: cepA, qacAE, qacE, AdeA, AdeA, AdeB, AdeC e QacAB, associados à resistência à clorexidina (43, 57)

Gene	Iniciador	Sequência (5' – 3')	Tamanho do produto da reação
cepA (43)	cepA-F cepA-R	CAACTCCTTCGCCTATCCCG TCAGGTCAGACCAAACGGCG	1051pb
QacAE (43)	qacAE-F qacAE-R	GCCCTACACAAATTGGGAGA CTGCGGTACCACTGCCACAA	370pb
QacE (43)	qacE-F qacE-R	GCCCTACACAAATTGGGAGA TTAGTGGGCACTTGCTTTGG	350pb
AdeA (57)	adeA-F adeA-R	ATCTTCCTGCACGTGTACAT GGCGTTCATACTCACTAACC	513pb
AdeB (57)	adeB-F adeB-R	TTAACGATAGCGTTGTAACC TGAGCAGACAATGGAATAGT	541pb
AdeC (61)	adeC-F adeC-R	AGCCTGCAATTACATCTCAT TGGCACTTCACTATCAATAC	560pb
QacAB (43)	qacAB-F qacAB-R	GCAGAAAGTGCAGAGTTCG CCAGTCCAATCATGCCTG	300pb

A descrição dos procedimentos realizados com as amostras no laboratório LIM 54 está descrito no FLUXOGRAMA a seguir.

Figura 1: Fluxograma das atividades realizadas no LIM 54 da bacteriologia:



4.6.3.1. **Detecção dos Genes relacionados à Bomba Efluxo em *Klebsiella pneumoniae*: cepA, qacAE e qacE**

De acordo com Abuzaid et al(43), para detectar a presença dos genes cepA, qacAE e qacE (Tabela 2) relacionados a bomba de efluxo em *Klebsiella pneumonie*, foi realizada uma reação de cadeia de polimerase (PCR), onde para cada reação foi utilizado 04 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 21 µL de mix de PCR contendo 1,00 µL primer cepA e 1,00µL dos *primers* qacAE e qacE, 1,00 U da enzima Taq polimerase, 200 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5 mM de MgCl2.

Para o gene cepA, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 40 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (66°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 07 minutos.

Para a detecção dos genes qacAE e qacE as amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 40 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (49°C por 40 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 07 minutos (43).

4.6.3.2. **Detecção dos Genes relacionados à Bomba Efluxo em *Acinetobacter baumannii*: AdeA, AdeB e AdeC**

De acordo com LIN, 2009 a detecção dos genes AdeA, AdeB e AdeC (tabela 2) relacionados à bomba de efluxo em *Acinetobacter baumannii*, foi realizado através do PCR, onde para cada reação foi utilizado 02 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 23 µL de mix de PCR contendo 0,10 µL primer AdeA e 0,30 µL do primer AdeB e 0,50 µL do primer AdeC, 1,00 U da enzima Taq polimerase, 200 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5 mM de MgCl2. Para a detecção dos genes AdeA e AdeB, as amostras foram submetidas, a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (57°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 7 minutos. Já para detecção do gene AdeC, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 40 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (57°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 7 minutos (58)

4.6.3.3. **Detecção do Gene qacA/B relacionado à resistência a Clorexidina em *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter***

***baumanii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus resistente à Vancomicina* (VRE):**

A presença do gene de resistência à clorexidina qacA foi descrita por Bischoff, 2012 (49). Para a detecção deste gene (tabela 7) foi realizada uma reação de PCR, e para cada reação foi utilizado 5 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 20 µL de mix de PCR contendo 0,4 µL primer, 2,5 U da enzima Taq polimerase, 200 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5 mM de MgCl2. As amostras foram submetidas, a uma temperatura de 94°C por 3 minutos e 25 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 5 minutos (49).

4.6.4. Avaliação dos Mecanismos de Resistência antimicrobiana:

Foi também investigada por técnica de detecção de PCR a presença de mecanismos de resistência antimicrobiana nas amostras testadas, sendo que os *primers* utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência antimicrobiana: (resistência aos carbapenêmicos OXA 23, OXA143, KPC, VIM, IMP, SPM) e resistência a vancomicina (vanA e vanB) (58, 59, 60)

Gene	**Iniciador**	**Sequência (5' – 3')**	**Tamanho do produto da reação**
Oxa-23 (58)	blaoxa23 – F blaoxa23 – R	AACGATTGCGAGCATC GTCAACCAGCCCACTT	501 pb
Oxa-143 (58)	blaoxa143 – F blaoxa143 – R	AGTTAACTTTCAATAATTG TTGGAAAATTATATAATCCC	149 pb
*van*A (59)	vanA-F vanA-R	GCTGCGATATTCAAAGCTCA CAGTACAATGCGGCCGTTA	545pb
*van*B (59)	vanB-F vanB-R	ATGGGAAGCCGATAGTCTC GTTACGCCAAAGGACGAAC	368pb
blaKPC(60)	KPC – F KPC - R	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893pb
blaIMP (60)	blaIMP – F blaIMP – R	GAATAGAATGGCTTAACTCTC CCAAACCACTAGGTTATC	188 pb
blaVIM(60)	blaVIM – F blaVIM – R	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382 pb
blaSPM(57)	blaSPM – F blaSPM – R	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG CCTTTTCCGCGACCTTGATC	798 pb

4.6.4.1. **Detecção dos Genes relacionados à resistência a Metalo-β-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa*: IMP, VIM e SPM**

Para detecção dos genes de resistência aos carbapenêmicos foi realizado um PCR multiplex (57) onde para cada reação foi utilizado 4µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 46 µL de mix de PCR contendo 1 µL de primer para IMP e 0,5 µL primer para VIM e SPM , 1 U da enzima Taq polimerase, 150 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5mM de MgCl2. As amostras foram submetidas, a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 33 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 25 segundos),

anelamento (52°C por 40 segundos) e extensão (72°C por 50 segundos) em uma temperatura final de 72°C por 6 minutos (57).

4.6.4.2. **Detecção dos Genes relacionados a resistência a Oxacilinase em *Acinetobacter baumanii*:OXA-23 e OXA-143**

Para detecção dos genes de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter baumanii* (58), foi realizado um PCR onde para cada reação foi utilizado 3 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 22 µL de mix de PCR para Oxa-23 contendo 5 µL de primer, 1,25 U da enzima Taq polimerase, 100 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5mM de MgCl2. As amostras foram submetidas, a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (52°C por 40 segundos) e extensão (72°C por 50 segundos) em uma temperatura final de 72°C por 6 minutos. Para Oxa-143 foi utilizado 22 µL de mix de PCR contendo 1 µL de primer, 2 U da enzima Taq polimerase, 100 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e 1,5mM de MgCl2. As amostras foram submetidas, a uma temperatura de 94°C por 5 minutos e 30 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (52°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos) em uma temperatura final de 72°C por 7 minutos.

4.6.4.3. **Detecção dos Genes relacionados à resistência VAN A e VAN B:**

Segundo Montecalvo et al,(63) para detectar a presença dos genes *van*A e *van*B foi realizado um PCR multiplex onde para cada reação foi adicionado 1 µL de DNA extraído através de kit comercial (KIT illustraTM bactéria genomicPrep Mini Spin Kit GE Helathcare – UK) em 24 µl de mix de PCR contendo 0,15 µM primer vanA e 0,30 µM do iniciador vanB 1,25 U da enzima Taq polimerase, 200 µM de desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM MgCl2. As amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 10 minutos e 45 ciclos de amplificação compreendendo a desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (50°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto) em uma temperatura final de 72°C por 10 minutos (63). O experimento foi realizado em todas as amostras de VRE.

4.6.4.4. Detecção dos Genes relacionados à resistência antimicrobiana *bla* KPC

Para a detecção do gene *bla* KPC (64) foi realizado um PCR multiplex onde, para cada reação, foi adicionado 1 µL de DNA extraído segundo o protocolo proposto pelo Kit do fabricante da Amersham Pharmacia Biotech, para realização de extração de DNA de bactérias Gram-negativas, nomeado como: GenomicPrepTM and Tissue DNA Isolation Kit.

Após a identificação do gene por meio da PCR, pelo menos um dos produtos gerados para cada reação foi submetido a uma nova reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores de interesse para sequenciamento do gene. O gene amplificado foi submetido a uma purificação pelo kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (Ge-

healthcare- Reino Unido) conforme instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi estimada através de uma corrida de eletroforese em um gel de agarose a 2% utilizando o peso Low DNA Mass Ladder (Invitrogen-EUA) e depois enviado para sequenciamento.

4.6.5 A avaliação de clonalidade:

A clonalidade foi avaliada nas amostras de VRE e *P. aeruginosa* pré e pós-intervenção e nas *K. pneumoniae* e *A. baumannii* pós intervenção, esse agentes não eram frequentes no período pre-intrevenção .

Foi realizada avaliação da clonalidade das amostras utilizando Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), como descrito por Padoveze et al (61). Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente curados e normalizados usando o peso Lambda Marker presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 0,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes amostras.

O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade. Para definir os PFT (Pulsed Field Type) e subtipos encontrados, três níveis de cutoff foram seguidos: isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes PFT. Os subtipos foram definidos a partir daqueles PFT com coeficiente Dice

entre 80-95%. Isolados com similaridade >90% foram considerados idênticos (62)

4.7 Análise dos dados

O efeito da intervenção foi avaliado temporalmente. Para analisar uma possível associação entre a implementação do banho e os desfechos, levando em conta as mudanças relacionados com o tempo, seja melhoria do cuidado geral e tendências naturais, foi utilizada a análise de Séries Temporais Interruptas (ou com regressão segmentar). Este método é o mais eficiente para avaliar estudos quasi-experimentais que avaliem intervenções com tempo bem delimitado (63,64). Para isso, foram usados os Modelos ARIMA (autorregressivos integrados e de médias móveis). Após correta especificação, foram obtidos três valores de coeficiente Betta (slope) e suas respectivas significâncias. O valor de Betta 1 correspondeu ao efeito tempo por si só; Betta 2 ao efeito imediato da intervenção nos desfechos maiores, como dias de internação, e, finalmente, o Betta 3, que representou o efeito da intervenção a longo prazo após sua implementação. Para o Modelo ARIMA, foram verificadas suas assumpções de Estacionariedade da Série Temporal, através da análise gráfica dos plots de Autocorrelação e através dos testes de Unit of Root. Para variáveis de dados inteiros no tempo, foi usada a Regressão de Poisson.

Para a comparação entre as proporções das características clínicas e epidemiológicas nos períodos com e sem intervenção foi utilizado o

teste qui-quadrado, considerando-se o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Para armazenamento das informações, manejo e organização do banco de dados foi utilizado o programa Microsoft-Excel-2010 e para análise estatística e das séries temporais, o programa Epi.Info 3.5.3. e SPSS.

5 RESULTADOS

5.6 Características Gerais da População Estudada:

No período dos 9 anos observados (4,5 anos antes e 4,5 após a intervenção), foram realizados 1.393 transplantes de células tronco e hematopoiéticas no serviço, sendo 870 no período antes e 523 no período após intervenção.

As características clínicas e epidemiológicas estão descritas na Tabela 4.

A população no período pós-intervenção, foi mais idosa ($p<0,001$). Isso ocorreu, porque até o ano de 2011 uma grande parte dos transplantes autólogos não complicados era realizada no Instituto do Coração (INCOR), e após essa data foram em sua totalidade realizados no Instituto Central do HC-FMUSP. Além disso, no segundo período os transplantes em crianças passaram a ser realizados no ITACI (Instituto de Tratamento do Câncer Infantil).

Percebemos também aumento de transplante alogênico e diminuição do número de pacientes com o diagnóstico de mieloma múltiplo e linfomas no período pós-intervenção, todos com *p* significativo.

Apesar dessas diferenças epidemiológicas, a mortalidade, tanto em 30 dias, como em 1 ano, não diferiu nos dois grupos.

Observamos que a taxa de IRAS gerais se manteve estável nos períodos de estudo.

Tabela 4: Características clínicas e epidemiológicas dos 1393 pacientes no período pré e pós-intervenção na Enfermaria de TCTH, ICHC-FMUSP, 2005-2013.

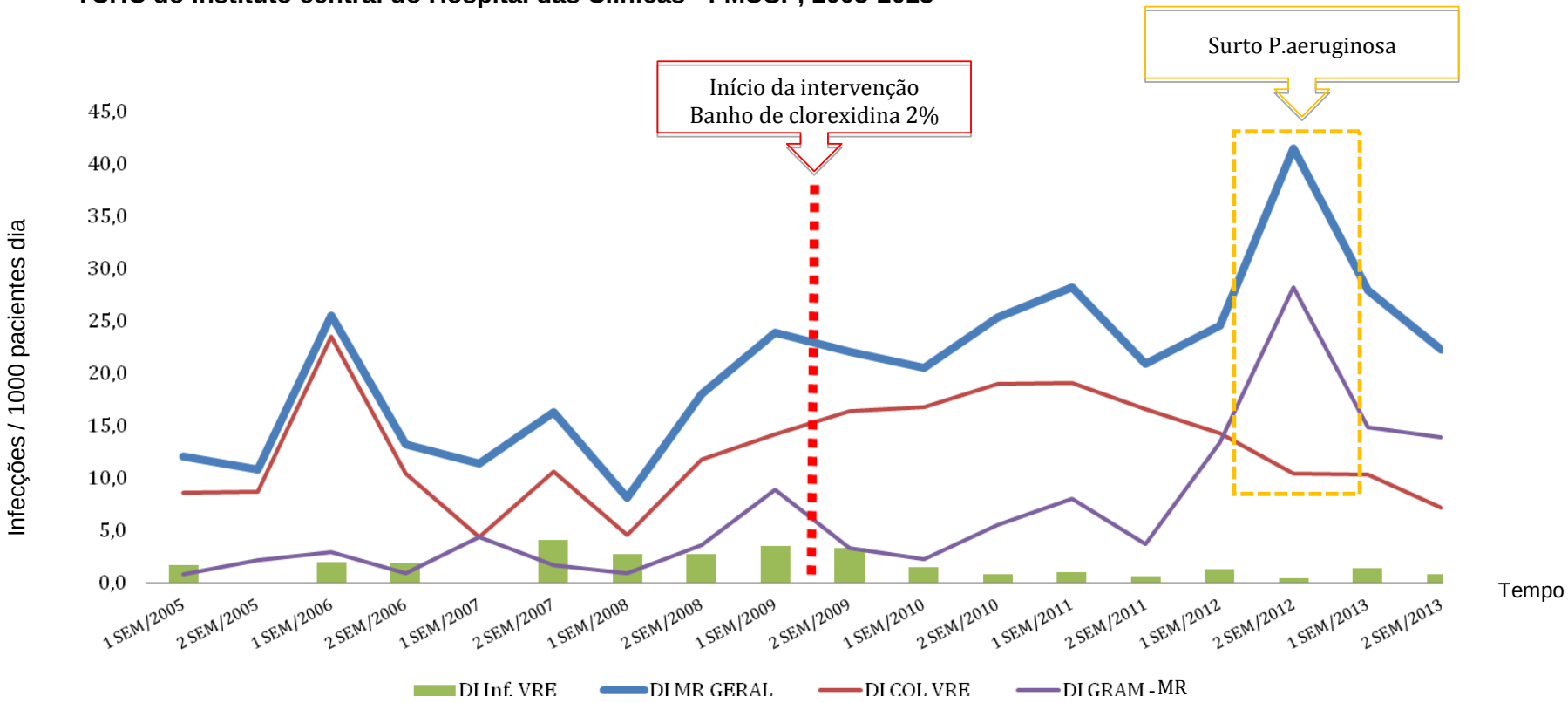
Variável (%)	Pré-intervenção N (%)	Pós-intervenção N(%)	P*
N (1393)	870	523	
Sexo M:F (%)	58,4 : 41,6	53 : 47	0,054
Idade (anos)	40 (1-71)	49 (15-72)	<0,001
Média (variação)			
Idade >60 anos (%)	47(5,4)	126(24,3)	<0,001
Idade <15 anos	60(6,8)	0	<0,001
Leucemias Agudas (%)	179 (20,6)	123 (23,5)	0,09
Linfomas (%)	310 (35,6)	159 (30,4)	0,02
Mieloma Múltiplo(%)	205 (23,6)	157 (20)	0,04
Anemia Aplásica (%)	64(7,4)	36 (6,9)	0,41
TMO Alogênico (%)	330(37,9)	230(44)	0,013
Tipo de transplantes:			
Cordão umbilical (%)	9 (1)	1(0,2)	-
Não aparentado (%)	31(3,6)	22(4,2)	-
Aparentado (%)	290(33,3)	207(39,5)	-
TMO Autólogo (%)	540 (62,1)	293 (56)	-
Óbito em 30 dias (%)	93 (10,7)	65(12,4)	0,18
TMO Alogênico	54	38	0,52
TMO Autólogo	39	27	0,20
Óbito em 1 ano (%)	204(23,4)	115(22,0)	0,28
TMO Alogênico	129 (63,2)	80(69,5)	0,16
TMO Autólogo	75 (58,1)	35 (30,4)	0,22
IRAS geral (%)	14,8	16,4	0,24

*P: estatísticas obtidas por meio do teste qui-quadrado e teste t. TMO: Transplante de Medula Óssea; IRAS: Infecção associada à assistência à saúde;

5.7 Taxas de infecção e colonização da unidade nos períodos pré e pós-intervenção:

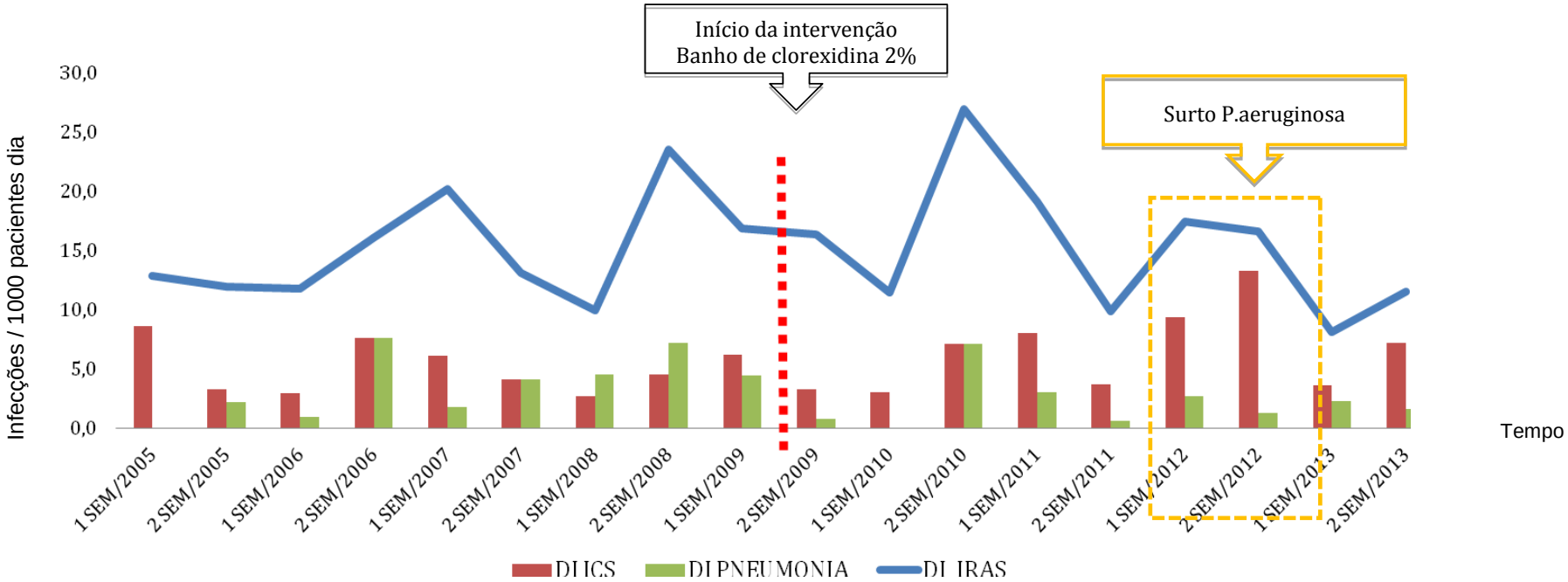
A distribuição semestral das taxas de infecção por micro-organismos multirresistentes e as taxas de infecção por topografia, são descritas nas duas figuras a seguir, sendo que na primeira (Figura 2), observamos claramente um aumento das taxas de infecção por micro-organismos gram-negativos, justificados principalmente por um surto de ICS por *P. aeruginosa* ocorrido na unidade no período de dezembro de 2011 até janeiro de 2013. Neste surto, detectamos 29 casos de bacteremia por *P. aeruginosa*, principalmente nos primeiros dias pós TCTH (65) com uma letalidade de 65%. No gráfico seguinte (Figura 2), observamos a distribuição de IRAS semestralmente nos períodos pré e pós-intervenção, e ainda segundo as topografias bacteremia e pneumonia. Neste gráfico também é possível observar aumento da incidência de ICS neste período do surto descrito

Figura 2: Densidade de Incidência de Infecção e Colonização por microrganismos Multirresistentes na Enfermaria de TCHC do Instituto central do Hospital das Clínicas - FMUSP, 2005-2013



TCTH: Transplante de células tronco e hematopoiéticas; DI: Densidade de Incidência; COL: colonização; Inf: infecção; VRE: Enterococo resistente à vancomicina; MR GERAL todas as bactérias multirresistentes; GRAM-: Bactérias gram-negativas; MR

Figura 3: Densidade de Incidência de Infecção relacionadas à assistência de saúde (IRAS), Infecção de corrente sanguínea e pneumonia na Enfermaria de TCTH do ICHC-FMUSP, 2005-2013



TCHC: Transplante de células tronco e hematopoiéticas. DI: densidade de incidência, IRAS: Infecções Relacionadas à assistência de saúde (ICS+PNEUMONIA), ICS: infecção de corrente sanguínea.

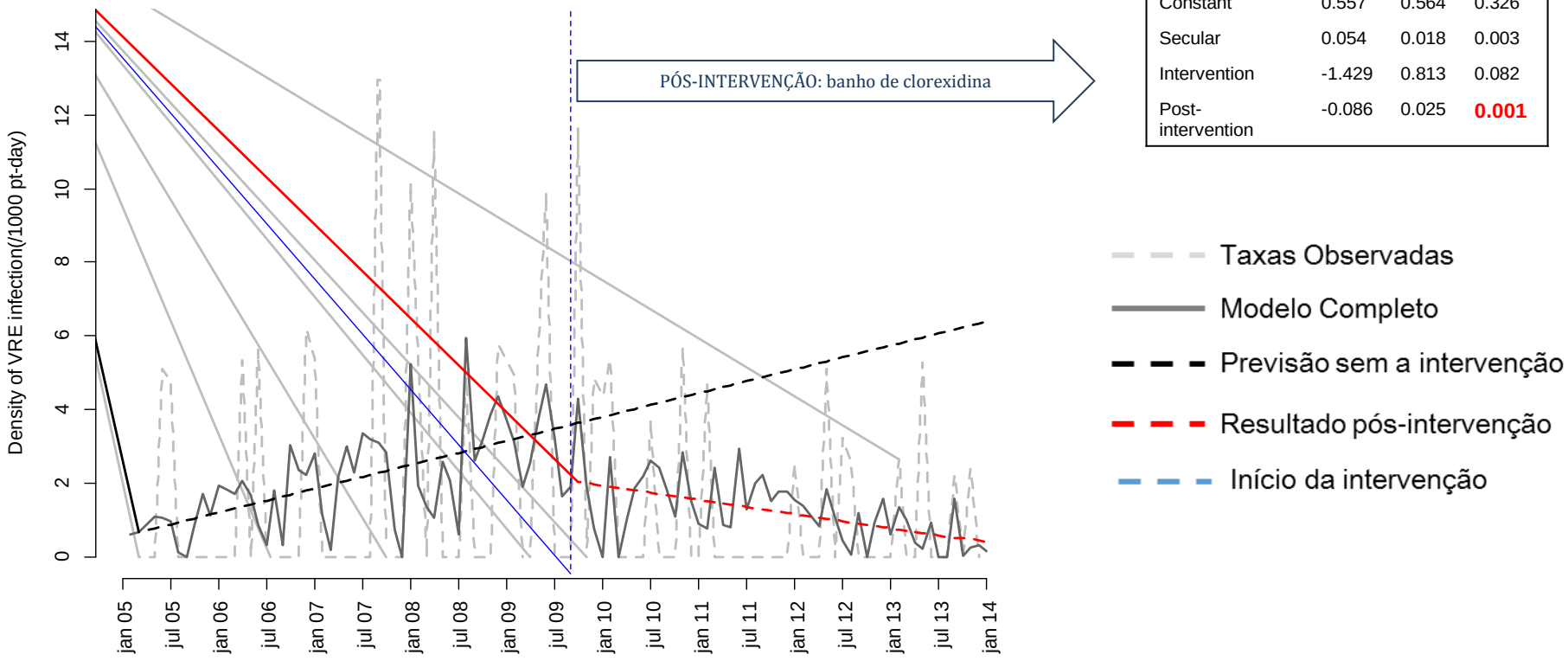
Os resultados da análise temporal das densidades de incidência de colonização e infecção por bactérias multirresistentes nos momentos pré e pós-intervenção estão demonstrados nas figuras 4 a 8 a seguir.

A figura 4 demonstra a distribuição das taxas de incidência de infecção por VRE na enfermaria de TCTH, e a análise da série temporal mostra que no período após a intervenção ocorreu uma queda significativa na incidência de infecção VRE com *p*: 0.001. A mesma tendência foi observada na taxa de colonização por VRE na unidade, que também sofreu uma redução significativa (*p*: 0,001) após início da intervenção (Figura 5).

Em contrapartida, observamos na figura 6 um aumento importante das infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes nos últimos dois anos na unidade, com taxas maiores no período pós-intervenção ($p<0,001$). A análise temporal da incidência de infecção por gram-negativos após a exclusão do surto de *P. aeruginosa* mostra um aumento significativo das taxas de infecção de gram-negativos multirresistentes na unidade. (Figura 7).

A densidade de incidência de bacteremia teve aumento significativo (Figura 8), que desapareceu se excluído o surto de *P. aeruginosa* (Figura 9).

Figura 4: Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por VRE nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP de 2005 a 2013



Model (0,0,4) (0,0,1)			
Variable	Betta	SE	P value
Constant	0.557	0.564	0.326
Secular	0.054	0.018	0.003
Intervention	-1.429	0.813	0.082
Post-intervention	-0.086	0.025	**0.001**

Figura 5: Distribuição temporal das densidades de incidência de colonização por VRE nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP de 2005 a 2013

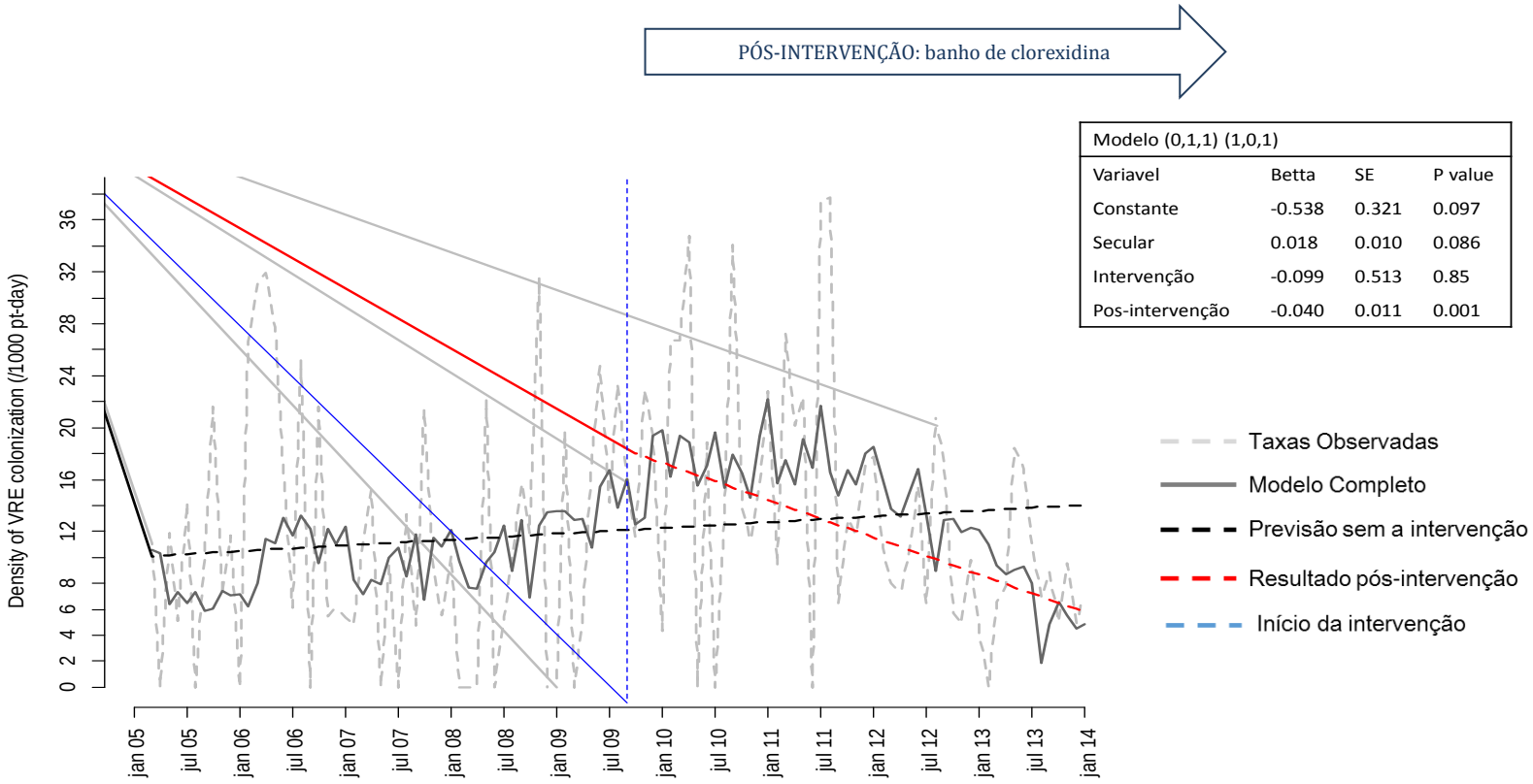
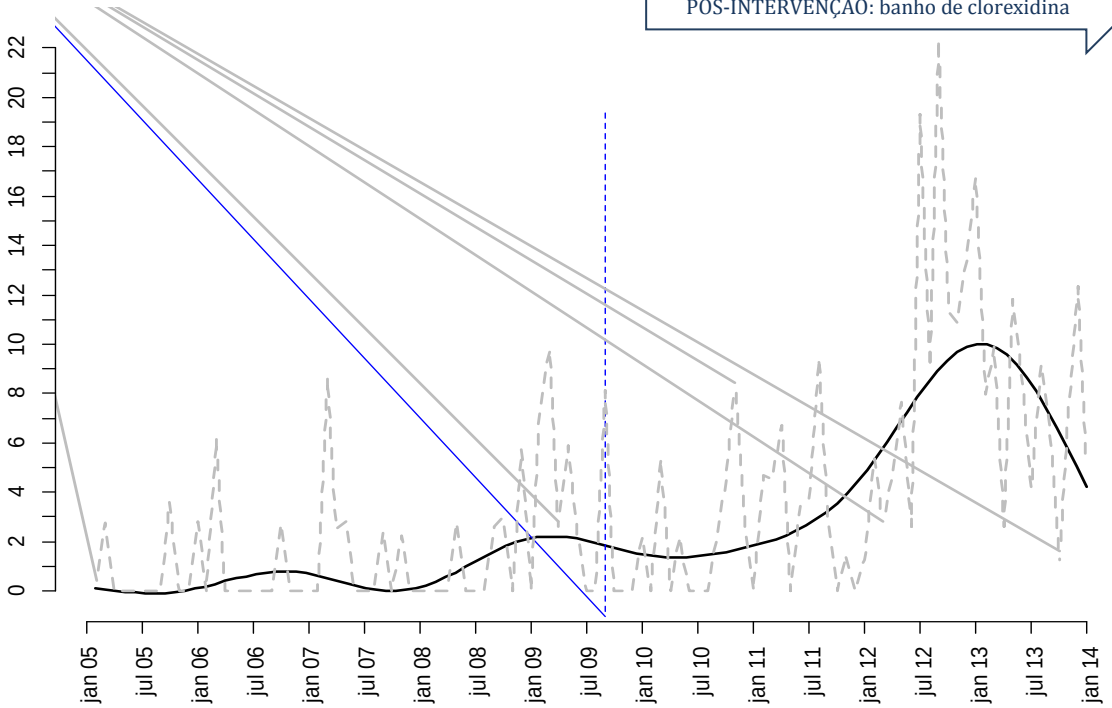
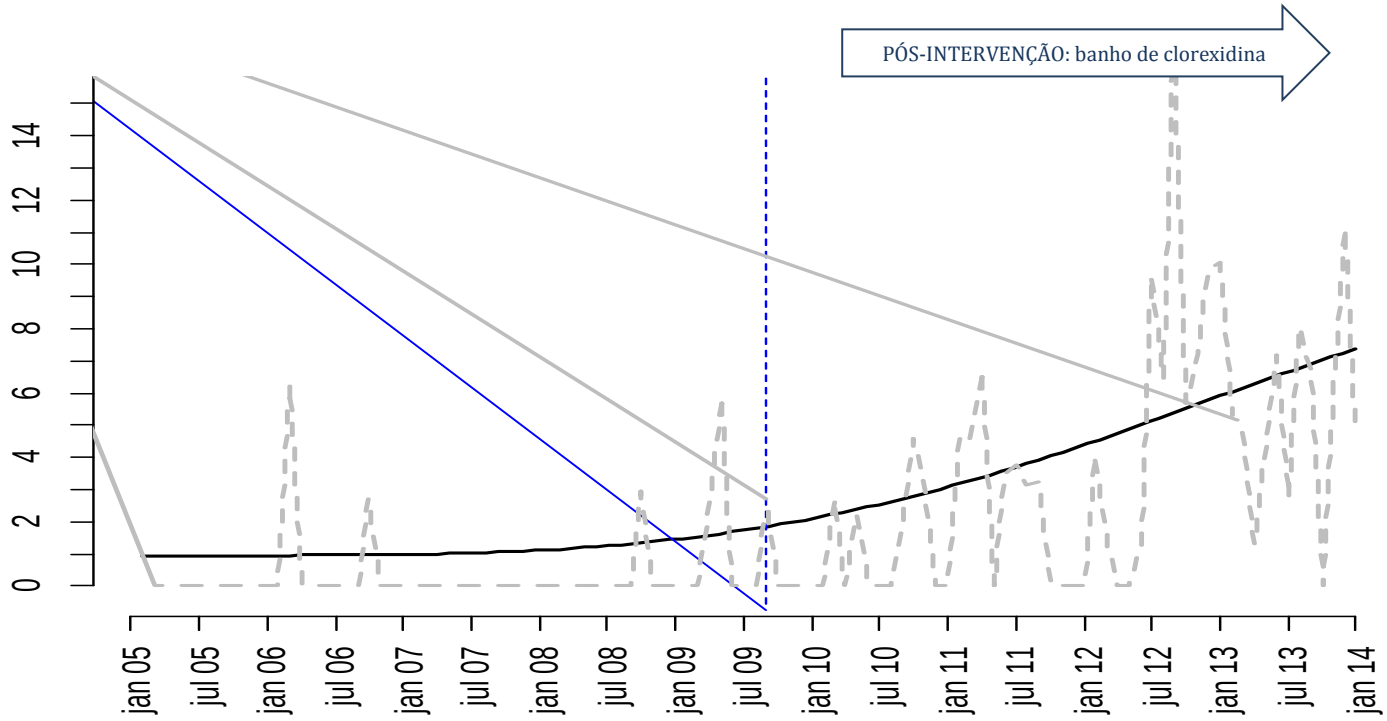


Figura 6: Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por Gram-negativos multirresistentes nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013



Modelo (0,0,1) GAM não linear			
Variável		SE	P value
Constante	5.373	2.466	0.0318
Secular	1.00	0.018	0.0474
Intervenção	2.872	4.926	0.5612
Pos-intervenção	7.324	0.025	<0.001

Figura 7: Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção por Gram-negativos multirresistentes nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013, com exclusão do surto de *P. aeruginosa*, ocorrido em 2012.



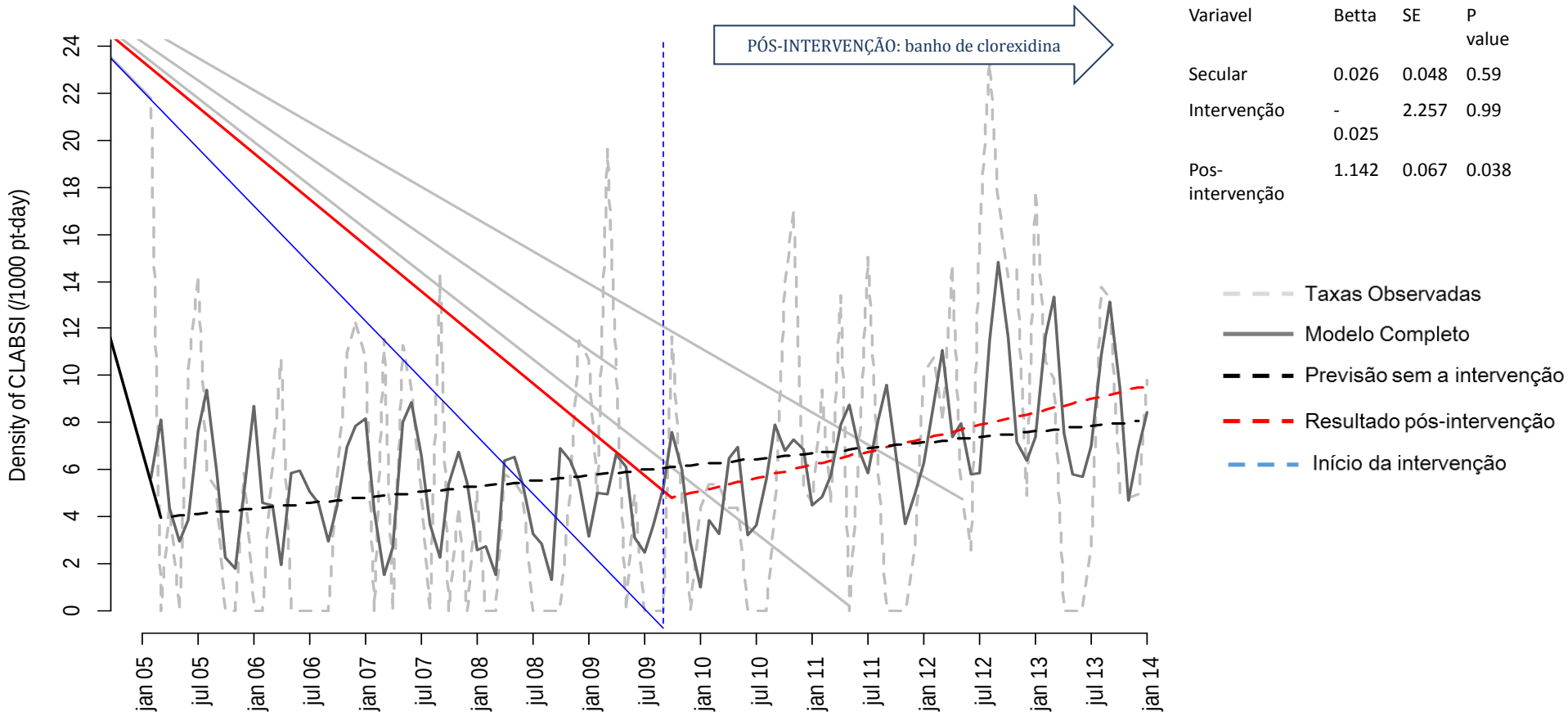
Modelo (0,0,1) GAM não linear

Variável	Betta	SE	P value
Secular	0.018	0.04	0.698
Intervenção	-1.16	2.11	0.585
Pos-intervenção	1.08	0.03	<0.001

Taxas Observadas

Modelo Completo

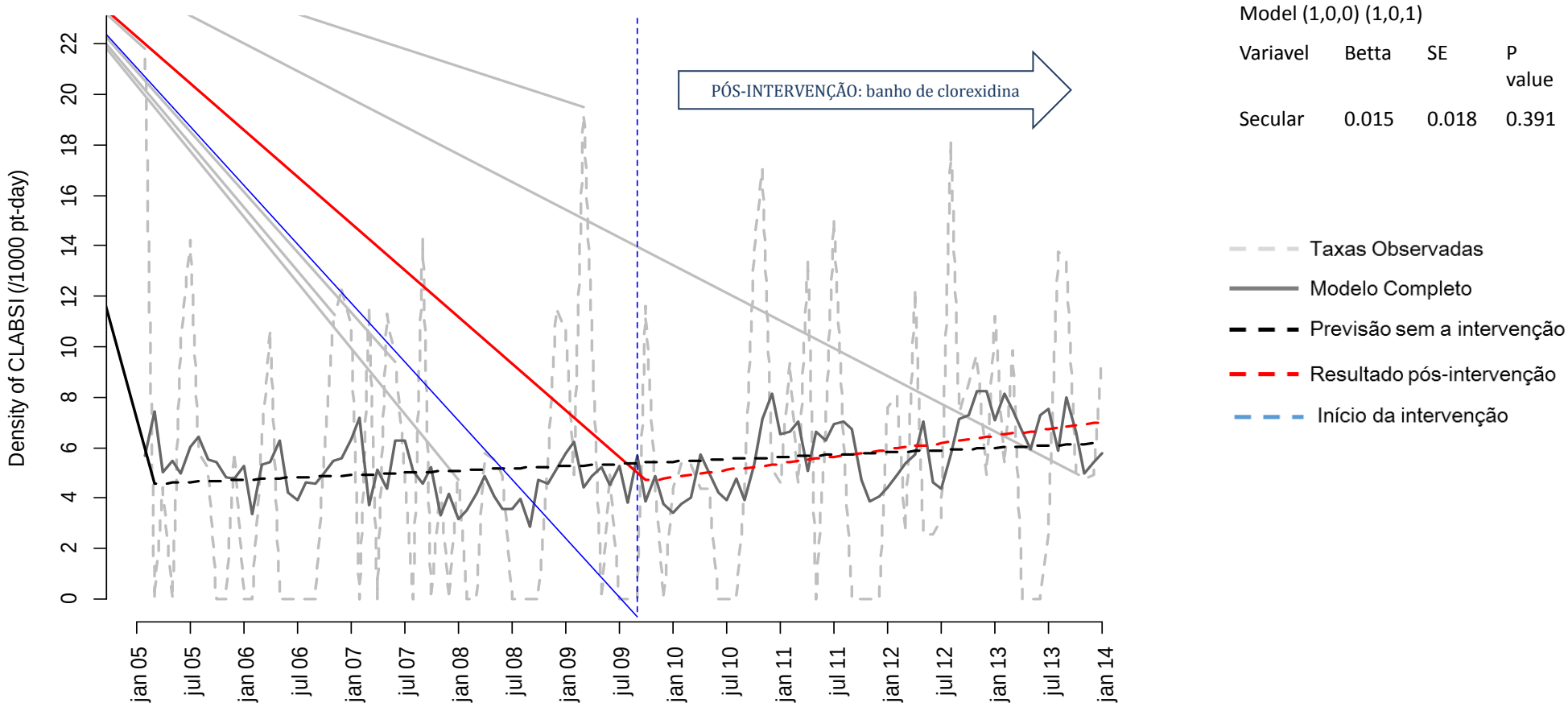
Figura 8: Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção de corrente sanguínea nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013



Modelo (2,0,2) (1,0,1)

Variavel	Betta	SE	P value
Secular	0.026	0.048	0.59
Intervenção	-0.025	2.257	0.99
Pos-intervenção	1.142	0.067	0.038

Figura 9: Distribuição temporal das densidades de incidência de infecção de corrente sanguínea nos momentos pré e pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos períodos de 2005 a 2013 com exclusão do surto de *P. aeruginosa*, ocorrido em 2012.



Model (1,0,0) (1,0,1)

Variavel	Betta	SE	P value
Secular	0.015	0.018	0.391

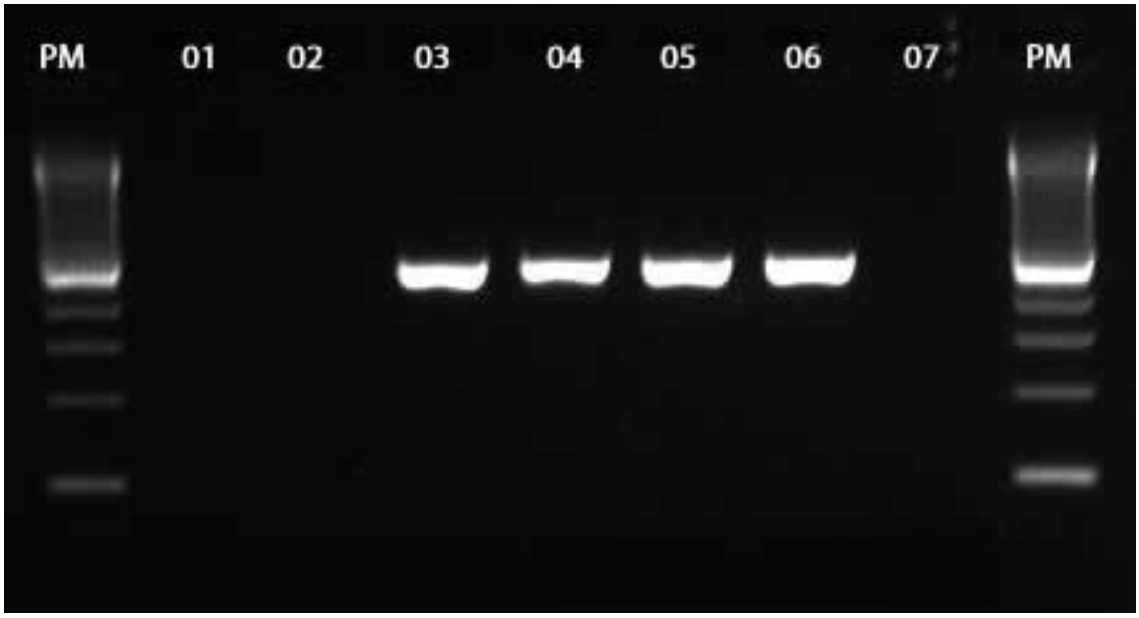
5.7.5 Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

Os genes de resistência antimicrobiana avaliados estão descritos na Tabela 2.

As figuras 10-12 ilustram resultados de PCRs obtidos das amostras testadas.

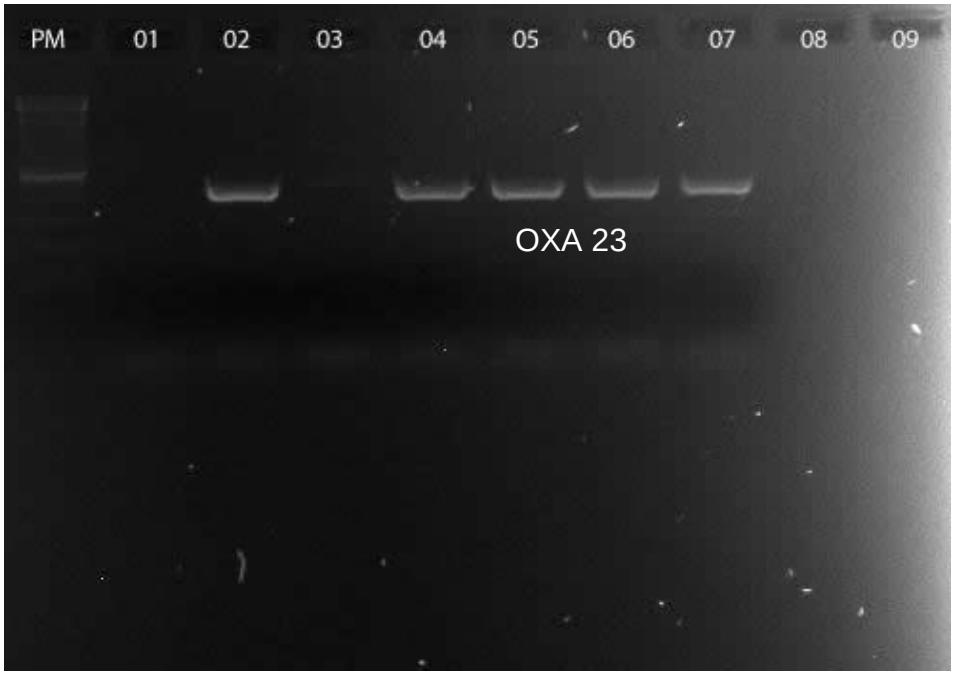
Todos os isolados de VRE avaliados continham o gene *VanA* e eram da espécie *E. faecium* (Figura 10)

Figura 10 – Foto de PCR para detecção do gene *van*A em isolados de *E. faecium* no momento pré intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP.



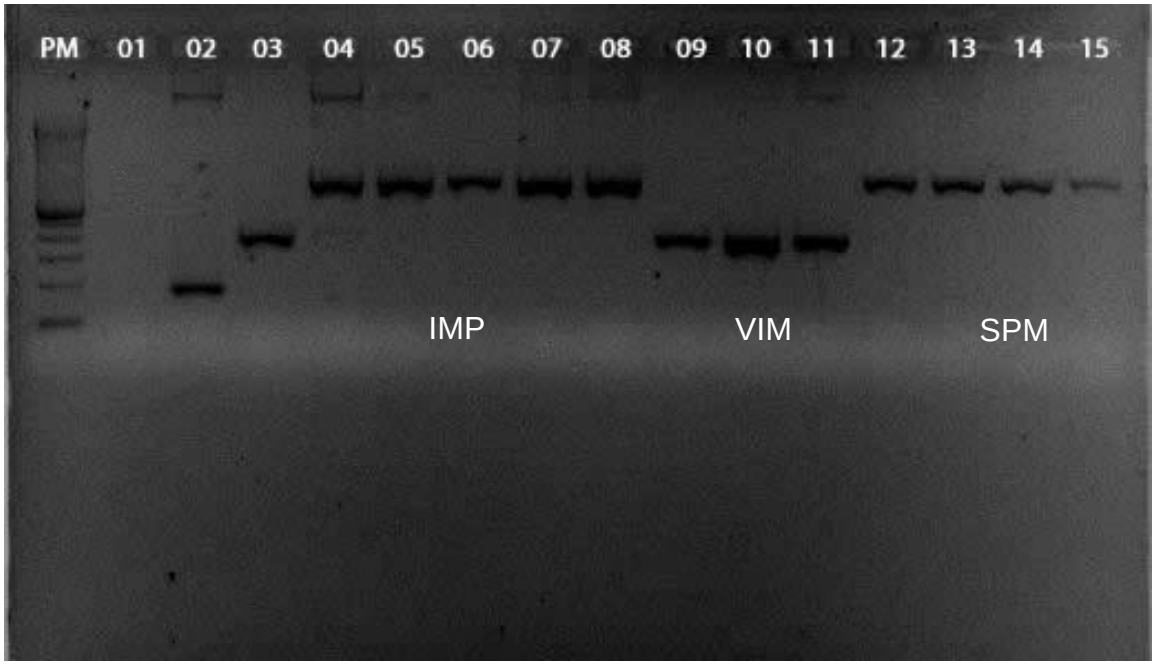
PM: Peso molecular 100bp (InVitrogen, USA); 02 controle de H2O; 3 controle positivo 4- 6 isolados positivos; 7 controle final

Figura 11: Foto de PCR para a detecção de gene OXA 23 em amostras de *A. baumannii* no momento pós-intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP



PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), Colunas 1: controle inicial, 02 controle positivo. 03,08 e 09: amostras negativas; 04-07: amostras positivas.

Figura 12: Foto de PCR para a detecção de carbapenemase IMP,VIM e SPM em amostras de *P. aeruginosa* nos momentos pré e pós intervenção na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP



PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), Colunas 1: controle inicial, 02 controle positivo IMP; 03 Controle positivo VIM; 04 Controle positivo SPM. 05 a 15 amostras positivas.

Tabela 5: Genes de Resistência Antimicrobiana pesquisados nas amostras PÓS-INTERVENÇÃO isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP e amostras CONTROLE isoladas no HC-FMUSP e no Hospital de Londrina.

Amostras	*P. aeruginosa*		*K. pneumoniae*			*A. baumannii*		*E. faecium*		TOTAL
	PRÉ CONTROLES	PÓS INTERVENÇÃO	LONDRINA CONTROLE)	KPC HC CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO	HC CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO	PRÉ CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO	
CIM50/CIM90	32/64	32/64	8/32	16/32	64/128	32/64	32/64	2/16	8/32	
N (%)	18 (100)	28(100)	30 (100)	31(100)	27(100)	33(100)	6(100)	28(100)	20(100)	219(100)
OXA 23(%)	-	-	-	-	-	20(60,6)	5 (83,3)	-	-	
OXA 143(%)	-	-	-	-	-	1 (3)	0	-	-	
KPC(%)	-	-	30(100)	33(100)	27(100)	-	-	-	-	
IMP(%)	0	0	-	-	-	-	-	-	-	
VIM(%)	4 (22,2)	0	-	-	-	-	-	-	-	
SPM(%)	8(44,4)	6 (21,4)	-	-	-	-	-	-	-	
VAN A(%)	-	-	-	-	-	-	-	28(100)	20(100)	
VAN B(%)	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-

CIM: Concentração inibitória mínima

PFGE e Dendrograma: As amostras de VRE, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* avaliadas foram policlonais nos dois momentos do estudo. Em relação às amostras de *P. aeruginosa,* foi observado que no período pós-intervenção ocorreu predominância de um clone com >80% semelhança em 10 das 22 amostras avaliadas pele dendrograma. Todos os dendrogramas e PFGEs estão demonstrados a seguir nas figuras 13-16.

Não foram observados clones que permaneceram na unidade de um período para o outro na avaliação do dendrograma do VRE e *P. aeruginosa*.

Figura 13: PFGE e Dendrograma das amostras de *P. aeruginosas* isoladas na enfermaria de TCTH do FMUSP nos momentos pré e pós-intervenção.

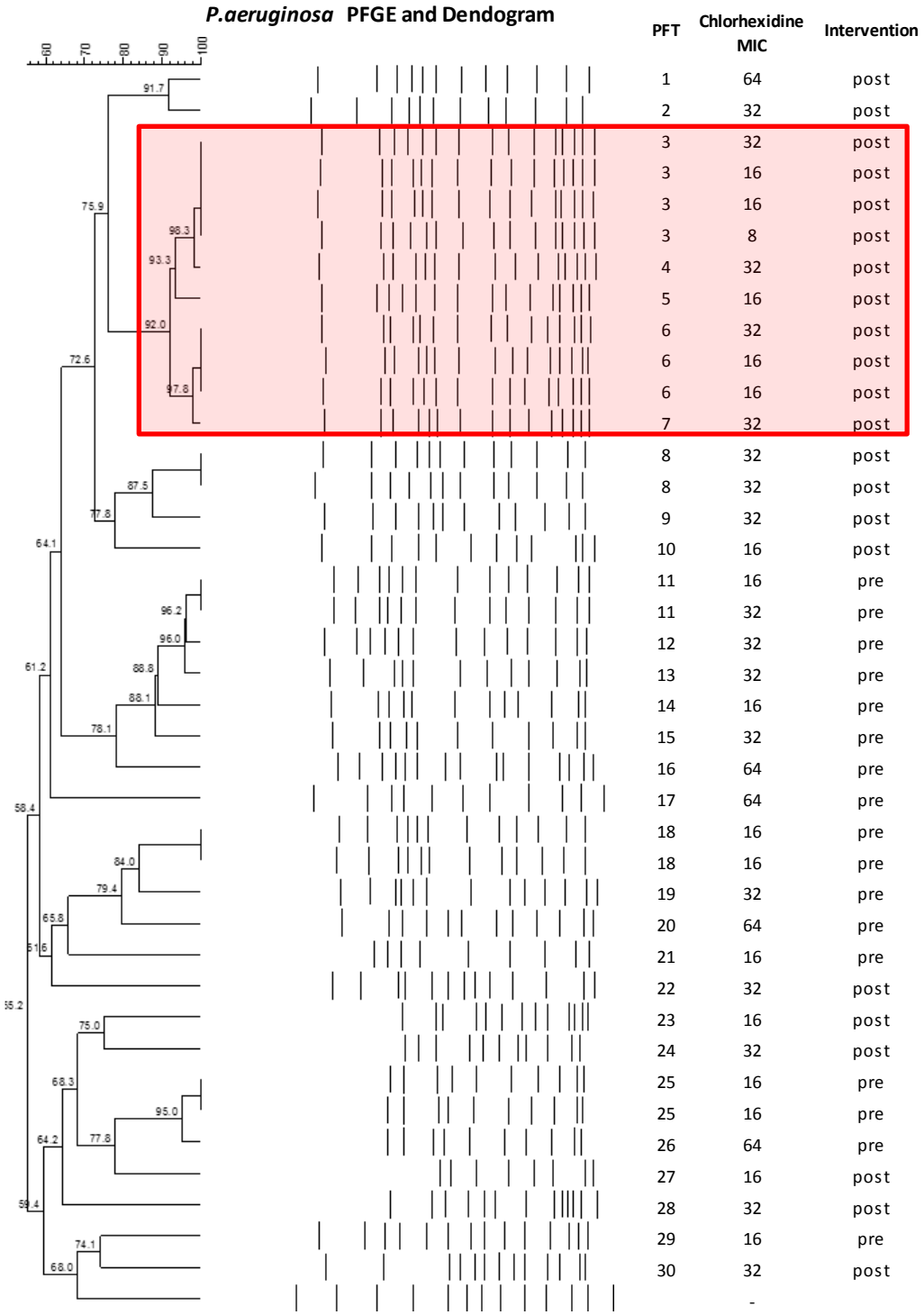


Figura 14: PFGE e Dendrograma das amostras de *A. baumannii* isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP no momento pós-intervenção

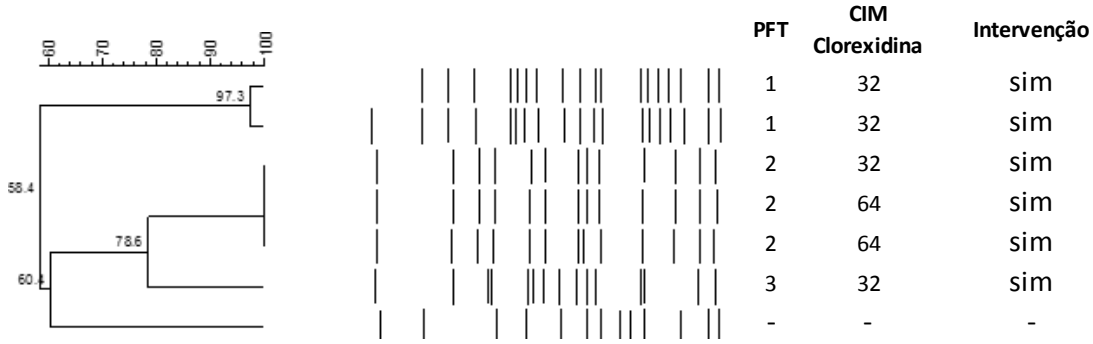


Figura 15: PFGE e Dendrograma das *K. pneumoniae* isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP do momento pós-intervenção

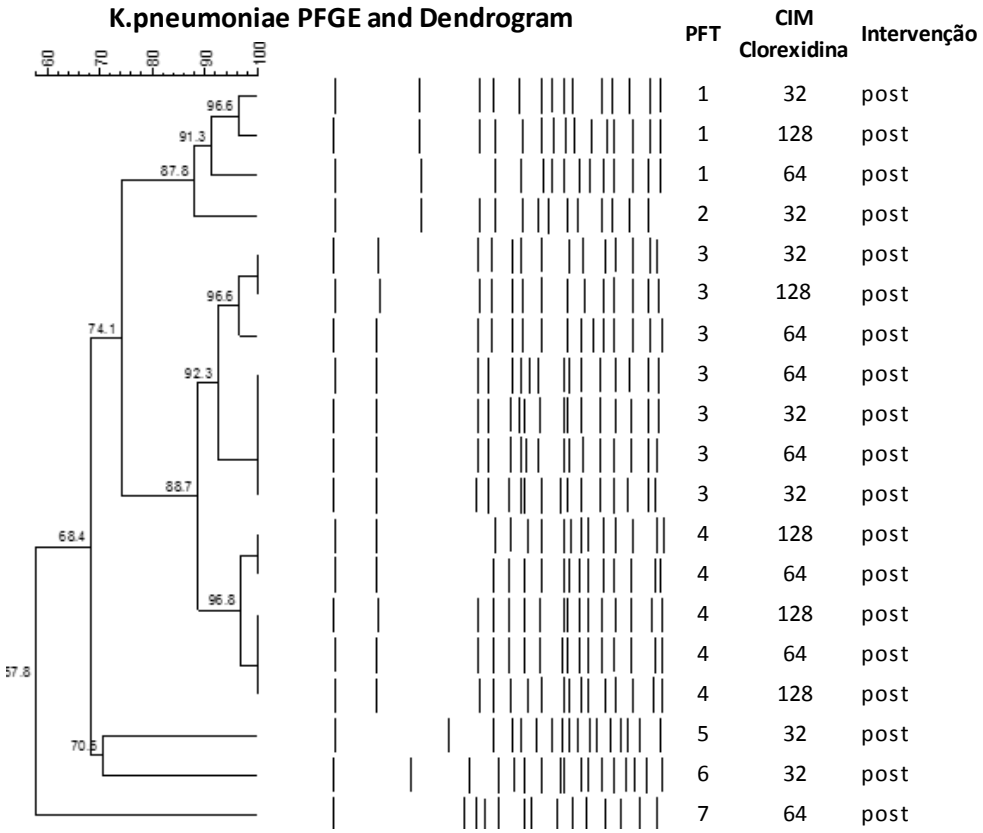
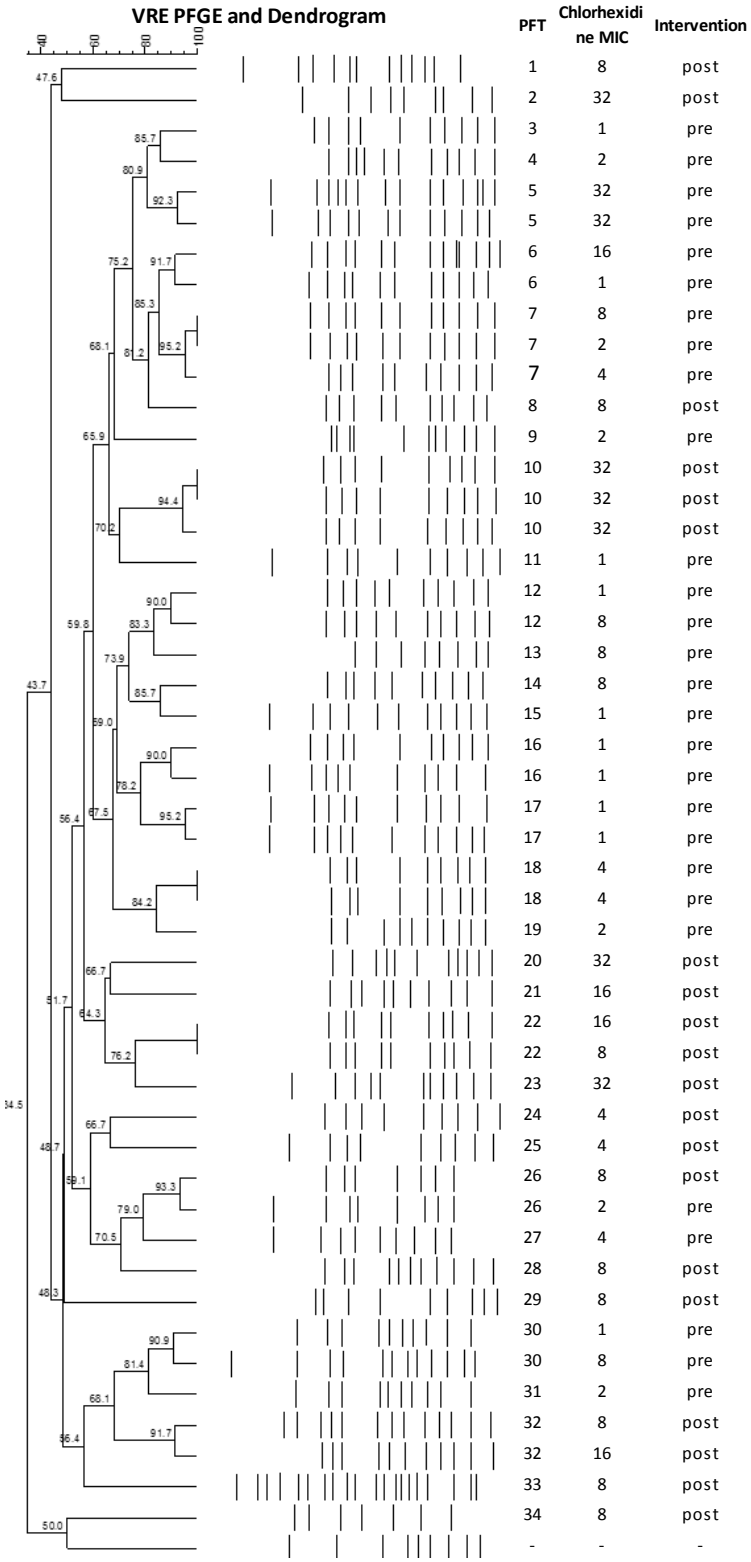


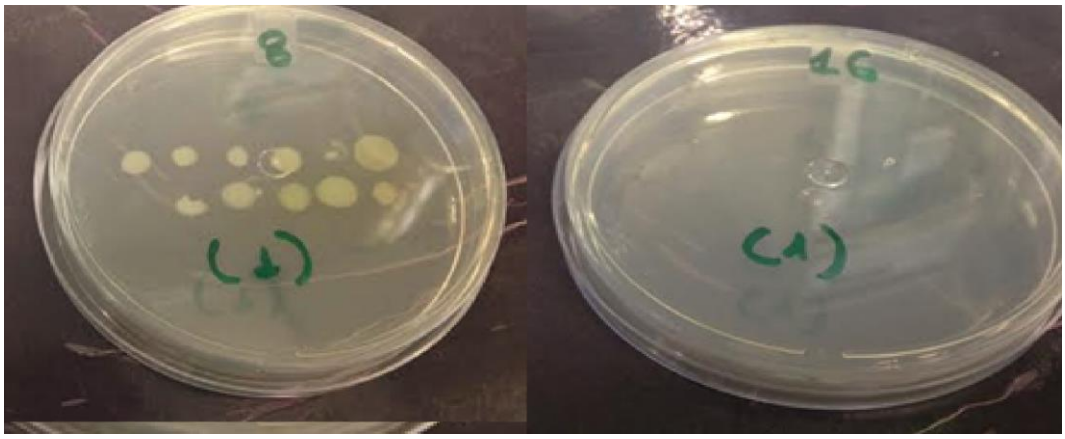
Figura 16: PFGE e Dendrograma das amostras de VRE isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP nos momentos pré e pós-intervenção-



Avaliação do perfil de sensibilidade dos micro-organismos à clorexidina e mecanismos de Resistência:

Na figura 17 observamos um exemplo de placas com concentração de clorexidina de 8 e de 16 µg /ml com as amostras de *K. pneumoniae* mostrando crescimento apenas na placa 8µg/ml CHG. Neste caso a CIM definida deste experimento foi de 16 µg /ml.

Figura 17: Foto de placa de diluição em agar de clorexidina com concentração de 8µg/ml e 16 µg/ml



Na Tabela 5 é apresentado a CIM da clorexidina entre as amostras do grupo pré e pós-intervenção, e amostras comparativas de outras unidades: *P. aeruginosa, A. baumannii, K. pneumoniae* e *E. faecium*, com e sem a adição do inibidor da bomba de efluxo CCCP.

Em relação às amostras de *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, as CIM50 pré e pós-intervenção permaneceram exatamente iguais (32 µg/ml), porém apenas 1 cepa (5%) das *P. aeruginosa* do grupo pré-intervenção diminuiu sua CIM após uso de CCCP enquanto 39,1% sofreram essa diminuição no grupo pós-intervenção.

Já as amostras de *A. baumannii* apresentaram em ambos os períodos uma proporção importante de queda da CIM após uso do inibidor, com queda em 66,7% e 42% respectivamente nos períodos pré e pós-intervenção.

As amostras de *K. pneumoniae* apresentaram aumento de 2 diluições na CIM50 testadas no período pós-intervenção. Observou-se ainda que após uso do CCCP houve diminuição da CIM nos dois grupos, porém com maior importância no grupo pós intervenção que apresentou queda de 5 diluições na CIM50 em 85,7% das amostras testadas.

Quando as amostras controles de *K. pneumoniae* do Hospital das Clínicas e do Hospital de Londrina (HU/UEL) foram avaliadas separadamente, notou-se que os controles de Londrina (n=30) apresentaram CIM50 de 8 µg/ml sem CCCP e 2 µg/ml com o uso do inibidor, enquanto os controles HC apresentaram CIM50 de 16 µcg/ml com queda mais importante após CCCP (CIM50 de 2 µg/ml).

Em relação aos VREs, claramente observa-se uma menor CIM basal em relação aos gram-negativos. Entre as amostras do período pré-intervenção, ocorreu uma diminuição de 2 diluições na CIM50 após o uso de CCCP. Porém observou-se um aumento em 2 diluições da CIM50 dessas amostras do período pós-intervenção, e efeito importante após inibidor de bomba de efluxo, com queda da CIM em no mínimo 4 diluições em 90% das amostras testadas.

Tabela 6: Descrição do perfil de sensibilidade das bactérias à Clorexidina por diluição em ágar, nos períodos Pré e pós Intervenção, antes e após o uso do inibidor de bomba de efluxo CCCP, HC-FMUSP, 2005-2013.

	Pré- Intervenção/Controle					**Pós- Intervenção**				
Bactérias N = 221	**N**	**CIM 50 (min-máx.)**	**CIM 90**	**CIM 50 CCCP (min-máx)**	**Queda 4 diluições CCCP(%)**	**N**	**CIM 50 (variação)**	**CIM 90**	**CIM 50 CCCP (min-máx)**	**Queda 4 diluições CCCP (%)**
P. aeruginosa TMO: 46	18	32 (16-64)	64	4 (2 -8)	1 (5%)	28	32 (4-64)	64	4 (1-8)	9 (39,1%)
A. baumannii HC: 33 TMO: 6	33	32 (4-64)	64	4 (0,5-16)	24 (66,7%)	6	32 (8-64)	64	4 (0,5-8)	3 (42,8%)
K. pneumoniae Londrina: 30 HC: 31 TMO: 27	61	16 (0,5-128)	32	2 (0,5-16)	20 (31,7%)	27	64 (16-128)	128	2 (0,5-8)	24 (85,7%)
E. faecium TMO: 38	28	2 (1-32)	16	0,5 (0,25-4)	7 (25%)	20	8 (4-32)	32	0,5 (0,125-4)	18 (90%)

CIM: concentração inibitória mínima; CCCP: inibidor de bomba de efluxo (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)
Min-máx: Variação da CIM mínina e máxima

5.7.6 Mecanismos de Resistência à Clorexidina:

Os mecanismos de resistência à clorexidina foram avaliados por meio da detecção de genes codificadores de bombas de efluxo (AdeA, AdeB, AdeC, cepA, qacAE e qacE e qacAB) por PCR, os resultados estão descritos na Tabela 7.

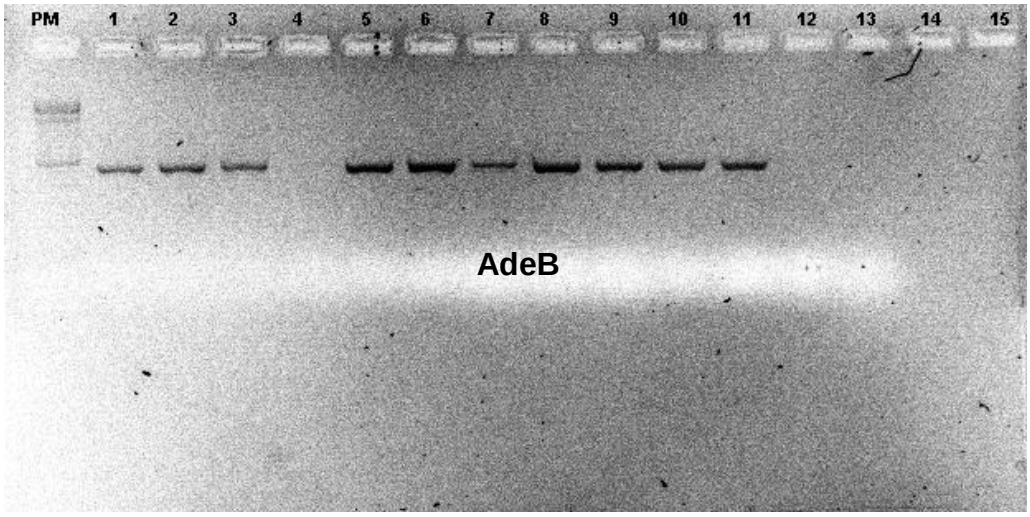
Abaixo as figuras 20 a 23 ilustram os PCRs de bomba de efluxo.

A bomba de efluxo cepA foi encontrada em 44,5% das *P. aeruginosas* do grupo pré-intervenção, e em zero das amostras pós-intervenção. Em relação às *K. pneumoniae* cepA foi positiva em 22,9% do grupo pré e 62,9% do grupo pós-intervenção. Já em relação aos *A. baumannii*, foram encontrados em 42,4% do grupo pré e em nenhuma amostra do grupo pós.

Observamos associação entre a presença da CepA nas amostras de *K. pneumoniae* e a resposta ao CCCP, de todas as 49 amostras CepA positivas, 67,3% obtiveram redução da CIM em 4 diluições após adição do CCCP.

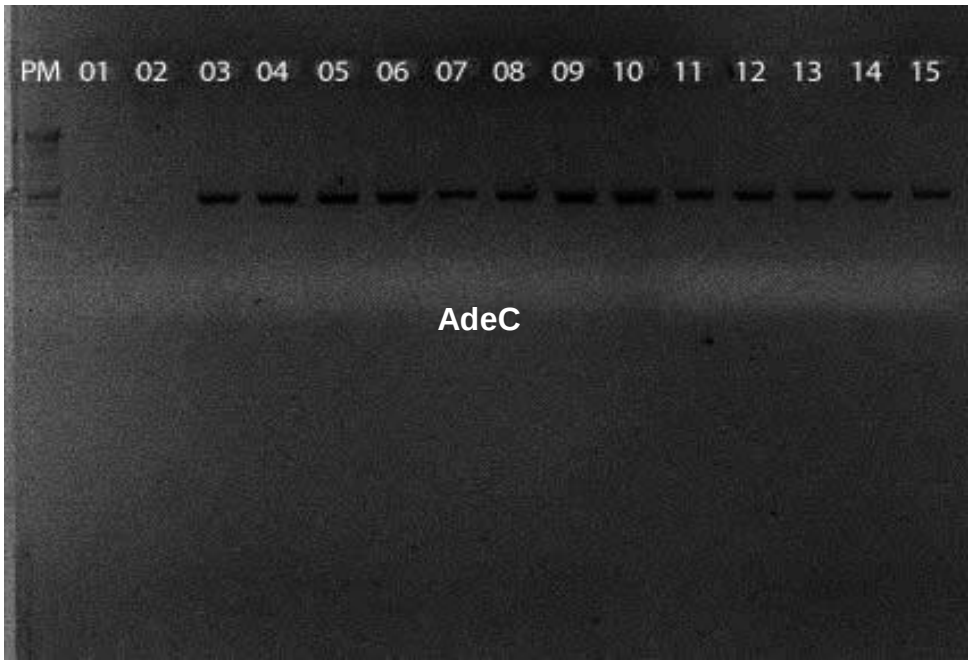
As bombas Ade A, B e C foram testadas nas amostras de *A. baumannii*, sendo AdeB e C encontrados em todas as amostras do grupo pós e em apenas metade do grupo pré-intervenção. O gene AdeA foi apenas encontrado no grupo pré-intervenção (51%).

Figura 18: PCR para a detecção de genes de bomba de efluxo de clorexidina: AdeB nas amostras de *A. baumannii* isoladas na unidade de TCTH do HC-FMUSP nos momentos pré e pós-intervenção



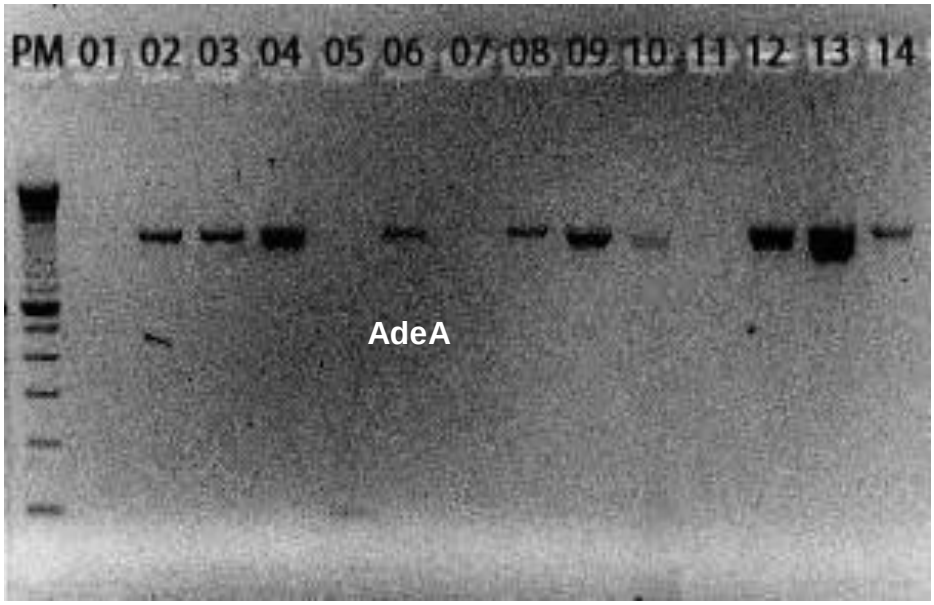
PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), Colunas 1: controle positivo; 2 3,5-11 amostras positivas para Ade B; 12 controle final e 13 controle de água

Figura 19: PCR para a detecção de genes de bomba de efluxo de clorexidina: AdeC amostras de *A. baumannii* isoladas na unidade de TCTH do HC-FMUSP nos momentos pré e pós-intervenção



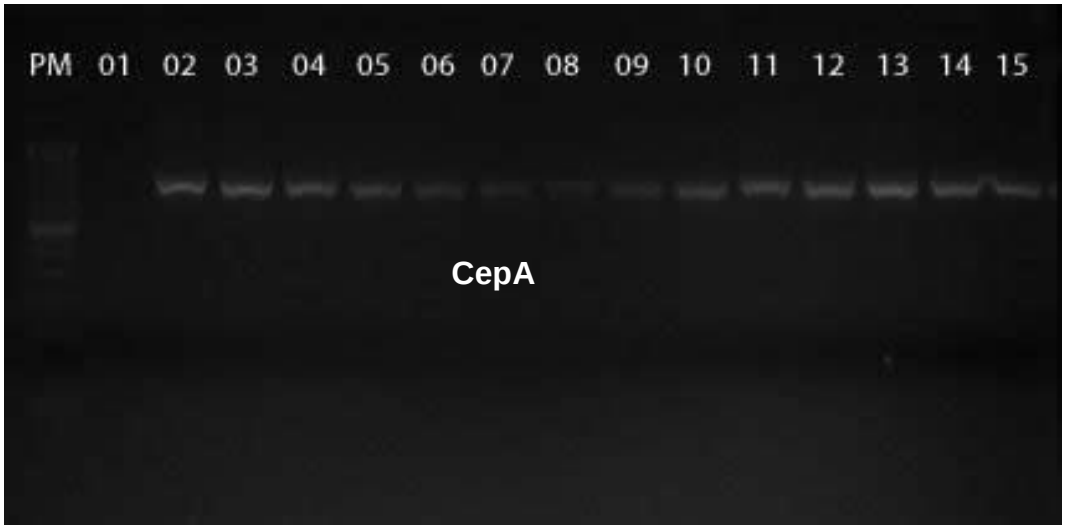
PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), 01 Ci; 02 H2O; 03 controle positivo; 04 à 15 amostras positivas .

Figura 20: PCR para a detecção de genes de bomba de efluxo Ade A em amostras de *A. baumannii* isoladas na unidade de TCTH do HC-FMUSP nos momentos pré e pós-intervenção



PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), coluna 01 Controle inicial; 02 Controle positivo; 03 à 14 amostras positivas e negativas.

Figura 21: PCR para a detecção de gene de bomba de efluxo de clorexidina em amostras de *K. pneumoniae*: cepA A isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP



PM: peso molecular 100bp (InVitrogen, USA), coluna 01 Controle inicial; 02 Controle positivo; 03 à 15 amostras positivas.

Tabela 7: Genes de Resistência à Clorexidina pesquisados nas amostras CONTROLE e PÓS-INTERVENÇÃO, isoladas na enfermaria de TCTH do HC-FMUSP, 2005-2013:

AMOSTRAS	*P. aeruginosa*		*K. pneumoniae*			*A. baumannii*		*E. faecium*	
	PRÉ CONTROLES	PÓS INTERVENÇÃO	LONDRINA CONTROLE	KPC HC CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO	HC CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO	PRÉ CONTROLE	PÓS INTERVENÇÃO
CIM50/CIM90 CHG	32/64	32/64	8/32	16/32	64/128	32/64	32/64	2/16	8/32
N (%)	18 (100)	28(100)	30 (100)	31(100)	27(100)	33(100)	6(100)	28(100)	20(100)
AdeA	-	-	-	-	-	17(51,5)	0	-	-
AdeB	-	-	-	-	-	17(51,5)	6(100)	-	-
AdeC	-	-	-	-	-	15(45,5)	6(100)	-	-
cepA	8(44,5)	0	15 (46,8)	17 (54)	17(62,9)	14(42,4)	0	0	0
qacAE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
qacE	0	0	1 (3)	3(9,6)	0	0	0	3 (10,7)	0
qacAB	0	0	0	0	0	0	0	0	0

CIM: Concentração inibitória mínima CHG: Clorexidina

6 DISCUSSÃO

.

Neste estudo, foi demonstrado que o uso do banho diário de clorexidina levou a diminuição significativa da densidade de incidência tanto de colonização (*p*: 0,001), quanto de infecção por VRE (*p*: 0,001) na unidade de TCTH. Como controle, analisamos a densidade de incidência de colonização e infecção por VRE em 5 unidades de terapia intensiva clínicas do HC-FMUSP no mesmo período, e observamos que não ocorreu diferença significativa das taxas nos dois períodos (Anexo). Essa análise nos permite considerar que a redução significativa ocorreu especificamente na unidade de estudo.

É sabido que a infecção por VRE aumenta o tempo de internação, custo e morbimortalidade associada ao paciente internado (66). A colonização e infecção por esse agente ocorrem predominantemente em pacientes imunodeprimidos, sendo que pacientes onco-hematológicos representam um grupo especialmente suscetível. Estudos apontam que aproximadamente 12% dos pacientes colonizados por VRE desenvolverão infecção clínica (66).

O banho de clorexidina tem sido associado à diminuição da incidência de VRE em unidades de terapia intensiva (30 e 31). Vernon *et al* em 2006 acreditaram que o banho de clorexidina diminuiria a carga bacteriana presente na pele dos pacientes colonizados, e com isso reduziria a chance da transmissão do patógeno para as mãos do profissional de saúde e consequentemente para outros pacientes. Neste estudo, realizado em uma UTI em Chicago, os autores demonstraram uma diminuição no risco

de contaminação das mãos do profissional, do ambiente e da aquisição do VRE pelo paciente na unidade após início do banho com clorexidina (31).

Em 2009, um estudo multicêntrico em 6 UTIs, também com controle histórico demonstrou diminuição de 73% nas taxas de bacteremia por VRE e diminuição significativa no risco de colonização por esse micro-organismo (*p*: 0.008) com o banho diário de clorexidina (30).

Estudo "quasi-experimental" realizado na Austrália em 2013 (32), demonstrou que o banho diário da clorexidina diminuiu as taxas de colonização e infecção por VRE em uma unidade onco-hematológica, (8,7 *vs* 4,6 colonizados por 1000/pacientes dia), porém sem significância estatística (IC: 0,23-1,23 *p*:0,14). Os próprios autores argumentam que o tempo de observação foi curto (3 meses antes e 3 meses pós) e que isso pode ter enfraquecido o poder da amostra.

Outro estudo que avaliou esta medida em unidade de TCTH foi publicado em 2013 (37). Multicêntrico e prospectivo incluiu 8 UTIs e apenas uma enfermaria de TCTH e não demonstrou queda global significativa nas taxas de infecção e colonização por VRE. Quando observada a unidade hematológica isoladamente, a redução de ICS não foi significativa no período do uso do antisséptico,

Estudos que avaliem o impacto desta intervenção na população submetida à TCTH ainda são escassos na literatura, sendo que estes citados acima apresentam um tempo de segmento curto para avaliar o real impacto microbiológico da intervenção. Nosso estudo demonstrou que o

banho de clorexidina teve impacto positivo na redução na incidência de colonização e infecção por VRE na unidade de TCTH.

O tempo de observação de 9 anos do presente estudo (4,5 anos nos períodos pré e pós-intervenção) fortalece os achados encontrados, pois atenua o efeito imediato da intervenção, iguala as possíveis mudanças epidemiológicas ocorridas no decorrer dos anos e avalia a intervenção sob aspecto da “vida real”.

A maioria dos estudos publicados sobre o tema foi realizada em pacientes internados em UTIs, recebendo “banho no leito”, poucos avaliaram o efeito em unidades de internação, como o presente estudo, onde pacientes tomaram banho muitas vezes sem auxílio, após orientação realizada pela equipe de assistência. Outro estudo realizado nos Estados Unidos foi um dos poucos que avaliou a intervenção em uma unidade de internação clínica (29). Nesse estudo o banho de clorexidina foi considerado um fator protetor para infecção por MRSA e VRE no período da intervenção (RR 0,36; 95% CI 0,2- 0,8; *p*= 0,01) (29).

Em relação à técnica ideal para a realização da intervenção, vemos que a maioria dos estudos em terapia intensiva, faz uso da toalha impregnada com clorexidina 2%, e encontramos poucos estudos que validassem o banho com a formulação líquida degermante. Um estudo publicado em 2012 (67) mostrou que o banho com clorexidina teve efeito protetor (OR: 0.44, CI 95% 0,32-0,59, *p*: 0,00001) em bacteremia hospitalar, independente da formulação e técnica usadas (toalha impregnada ou a formulação degermante líquida). Outro estudo de 2012, também realizado

em enfermaria de pacientes onco-hematológicos, comparou as duas formulações de clorexidina e demonstrou que as duas técnicas apresentaram impacto e diminuíram as taxas de VRE e MRSA, porém o uso da toalha impregnada aumentou o custo da intervenção (68), enquanto a formulação líquida degermante apresentou custos baixíssimos, comparáveis até ao gasto com o sabonete comum. Esse achado é de extrema importância para definir a viabilidade de uma intervenção no nosso país, e ainda em nosso hospital, sendo que a formulação líquida degermante já faz parte do arsenal do Hospital das Clínicas, pois é usada também em outros procedimentos, como degermação cirúrgica, e antissepsia da pele para procedimentos invasivos. O uso de toalha específica, impregnada de clorexidina, acarretaria em um aumento importante no custo da intervenção.

O aumento na densidade de incidência de Gram-negativos multirresistentes na unidade foi expressivo nos últimos anos do estudo. Além do surto já mencionado de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos iniciado em 2012, ocorreu um aumento de infecções por enterobactérias multirresistentes, ainda com a introdução da Klebsiella produtora de carbapenemase no ano de 2010, ausente no serviço até então. Estudo realizado no HC/FMUSP avaliou 429 pacientes submetidos à TCTH de 2001 a 2009 (14), e mostrou que 52,3% das bacteremias notificadas foram por Gram-negativos. Como já mencionado, o perfil infeccioso da população onco-hematológica tem mudado nos últimos anos, com aumento da incidência de infecção por gram-negativos

multirresistentes, sendo que essa população estava antes mais associada à bacteremias por gram-positivos. (17, 18)

No Brasil os bacilos gram-negativos são o principal agente etiológico das infecções relacionadas à assistência de saúde (16). Dados de boletins epidemiológicos corroboram essa tendência em nosso país e no restante do mundo (69, 70, 71)**.** Dados do CVE (69) mostram um aumento na resistência de bactérias gram-negativas aos carbapenêmicos quando se avalia isolados das UTIs do estado de São Paulo.

É sabido que a situação hiperendêmica das bactérias gram-negativas nos hospitais está intimamente ligada às dificuldades básicas no cuidado ao paciente. Apesar de serem multifatoriais, as principais carências relacionam-se com a baixa adesão à higiene de mãos e medidas de precaução de contato e principalmente ao número insuficiente de profissionais da saúde para assistir pacientes de alta complexidade. (71)

Sabemos que grande parte dos estudos não demonstra um real benefício do banho de clorexidina na incidência de infecção e colonização por essas bactérias Gram-negativas. Também em nosso serviço, não houve benefício.

Em revisão sistemática australiana, foi avaliado o impacto desta intervenção especificamente em bactérias multirresistentes, sendo que para as Gram-negativas, não se mostrou benéfico o banho de clorexidina (72). O mesmo foi demonstrado nos dois estudos prospectivos já citados, (36,37). Apesar de demonstrarem impacto positivo na incidência de

bacteremia, ambos claramente demonstram que esta redução de taxas ocorreu à custa do impacto em bactérias Gram-positivas.

Entretanto, outros estudos com casuísticas menores relatam redução nas taxas de Gram-negativos após implementação desta intervenção, sendo *A. baumannii*, o micro-organismo mais estudado. Estudo de intervenção em UTI no México, realizado em 2014, obteve uma diminuição significativa da taxa de infecção hospitalar geral no período com uso da clorexidina (*p*: 0,02) e ainda uma redução na incidência de *A. baumannii* na unidade, porém a intervenção foi associada a uma campanha para aumentar adesão de higiene de mãos (73).

A infecção de corrente sanguínea apresenta-se como o principal sítio infeccioso na população onco-hematológica, e principalmente na submetida à TCTH (14). Diversos fatores aumentam o risco de ICS nestes pacientes. Em nosso estudo o banho de CHG não reduziu ICS.

A avaliação do perfil de sensibilidade da microbiota bacteriana da unidade de TCTH a CGH faz-se essencial para conhecer e avaliar o impacto ecológico desta intervenção, visto que se trata de um produto usado em inúmeras situações assistenciais, em todas suas formulações (alcoólica, aquosa e degermante). O que pode por em risco a sua efetividade.

Neste estudo avaliamos a CIM das amostras da unidade no momento pré e pós-intervenção, porém nem todas as espécies estavam disponíveis em nosso laboratório nos dois momentos. Por exemplo, as *K. pneumoniae*

resistentes aos carbapenêmicos tornaram-se endêmicas apenas a partir de 2010 (período de intervenção), sendo que como controle, tivemos que selecionar amostras de outras unidades que não sofreram intervenção. Este fato pode ter gerado um viés na análise deste perfil epidemiológico, visto que as unidades podem ter diferentes clones e diferentes potenciais mecanismos de resistência.

No presente estudo a avaliação das CIMs das bactérias nos momentos pré e pós-exposição trouxeram informações importantes. Observamos claramente a necessidade de concentrações menores de clorexidina para inibir o crescimento bacteriano entre as amostras de VRE quando comparadas às demais bactérias gram-negativas testadas. Inúmeros estudos apontam para essa “resistência intrínseca” dos Gram-negativos (42,74,75), não só em relação à clorexidina, como a outros antissépticos. Uma das hipóteses aventadas é de que a membrana externa da bactéria Gram-negativa funcionaria como uma barreira natural para entrada de substâncias químicas externas, inclusive dos antissépticos e antimicrobianos (76). Essa tolerância intrínseca é provavelmente uma das explicações para fato do banho de clorexidina não ser efetivo na redução da incidência de infecção por Gram-negativos.

Outro dado observado em relação ao perfil de sensibilidade à clorexidina foi um aumento em 2 vezes da concentrações da CIM50 de isolados de VRE e *K. pneumoniae* identificados na unidade de TCTH no período pós-intervenção. Isto sugere que a exposição maciça prolongada ao antisséptico pode gerar um aumento da CIM basal das bactérias. Este

aumento da CIM50 não foi observado em relação aos demais Gram-negativos na fase pós-intervenção. Este fenômeno já foi descrito na literatura (41, 42, 43). Meyer *et al* (41) relatam que esse aumento pode tanto significar resistência, quanto apontar apenas para mecanismos adaptativos, que seriam reversíveis após a interrupção da exposição contínua.

Considerações sobre resistência

É importante esclarecer que, até o momento, pouco se sabe sobre resistência aos antissépticos em geral, e que não existem pontos de corte de sensibilidade e resistência definidos. O que os estudos avaliam é um aumento da CIM ou CBM dos micro-organismos após exposição, que não necessariamente traduzem resistência ou ineficácia do antisséptico. Neste estudo não conseguimos avaliar o efeito da clorexidina após a retirada da exposição, pois o banho continua sendo feito na unidade.

A maioria dos estudos de intervenção não avalia o impacto da clorexidina na microbiota da unidade nos momentos pré e pós-exposição. O estudo de Climo *et al,* (37), menciona que não houve mudança nas CIMs 50 de VRE e MRSA no período pós intervenção, porém vale lembrar que apesar de prospectivo e multicêntrico, o estudo avaliou o efeito do banho em apenas 6 meses, o que pode ter diminuído o impacto na microbiota.

Análise molecular:

A avaliação molecular das amostras em relação à presença de bombas de efluxo demonstrou que os genes codificadores qacAE e qacB não

estiveram presentes nas bactérias testadas. O gene qacE foi encontrado em 1 amostra de *K. pneumoniae* e em apenas 3 amostras de VRE do grupo controle. Esse dado é compatível com estudos associados ao VRE, sendo que em 2012, um estudo detectou a presença do gene qacA/B em apenas quatro amostras de 585 testadas (0,7%). Porém nesse estudo esses quatro isolados apresentaram CIMs elevadas para o biocida quaternário de amônia (49). Os genes codificados qac são muito descritos em *S. aureus*, (30, 38, 39, 42, 45), porém a prevalência em Gram-negativos é muito variável nos estudos.

Em nosso estudo, não foi possível associar a presença das bombas de efluxo com o aumento da CIM para clorexidina, com o período de exposição e nem com a detecção de gene de resistência antimicrobiana. Apesar disso, a alta porcentagem de resposta ao CCCP no momento pós-exposição é um forte indício de que o aumento da CIM, e a exposição ao antisséptico estão relacionados com a presença de bombas de efluxo de tipos não testados em nosso estudo.

Observamos, contudo que a detecção da bomba de efluxo CepA esteve relacionada com maior resposta ao CCCP nas amostras de *K. pneumoniae*. Este achado foi descrito por Abuzaid et al (43), que obteve redução das CIMs de clorexidina em praticamente todas as amostras que positivaram a bomba de efluxo CepA. Estudo em Taiwan demonstrou que o gene CepA está relacionado à CIMs elevadas de clorexidina em amostras de K. pneumoniae, (75, 76). Em 2002, outro estudo relacionou o gene cepA à tolerância à clorexidina, por meio de mecanismo de bomba de efluxo (77).

A avaliação de clonalidade, realizada com as amostras deste estudo, encontrou um perfil policlonal em relação às amostras de *K. pneumoniae*, VRE e *A. baumannii* dos momentos pré e pós-exposição. Contudo observamos a predominância de poucos clusters de *P. aeruginosa* no período pós-intervenção. O dendrograma realizado demonstrou que 10 das 22 amostras avaliadas (45,5%) apresentaram semelhança de >80%. Esse fato pode sugerir que o uso maciço do antisséptico na unidade tenha colaborado para a mudança do perfil policlonal das amostras de *P. aeruginosa* do período pré-intervenção, inclusive favorecendo o surgimento de um perfil mais virulento (78) e monoclonal (67).

Do nosso conhecimento, o presente estudo é o único que avaliou o impacto da intervenção por maior período de tempo, tanto em relação às medidas de incidência de IRAS, como em relação ao impacto ambiental do antisséptico, sendo que outros estudos prospectivos e multicêntricos têm realizado a intervenção por apenas 6 meses, o que pode ter diminuído o impacto na microbiota das unidades avaliadas. (9, 10). Acreditamos que esta avaliação prolongada é importante principalmente em unidades tão vulneráveis, como as de pacientes submetidos à TCTH.

Limitações

O estudo tem algumas limitações, além de ser de um único centro, o longo período de observação, pode trazer fatores confundidores para análise. No período de 9 anos, ocorreram surtos, mudanças no perfil da microbiota hospitalar e mudanças na política de internação da unidade, impactando em

alteração epidemiológica do paciente internado na enfermaria. Apesar disso as taxas de mortalidade em 30 dias e em 1 ano foram semelhantes nos dois períodos.

7 Conclusões

- Neste estudo, foi demonstrado que o uso do banho diário de clorexidina levou a diminuição significativa da densidade de incidência tanto de colonização, quanto de infecção por VRE na unidade de TCTH.
- Não foi observado o mesmo efeito em relação às bactérias gram-negativas, que vem aumentando sua prevalência na unidade e no hospital exponencialmente.
- Evidenciamos também que o uso de banho de CGH degermante 2% acarretou em aumento da CIM para bactérias gram-positivas,
- A principal bomba de efluxo encontrada foi a CepA. Sendo as demais (qacA, qacE, qacAB) foram apenas raramente encontrados.
- Não foi possível relacionar os mecanismos de resistência e tolerância aos antissépticos, apesar da relação estar amplamente descrita na literatura.
- Foi identificado um perfil clonal das amostras de *P. aeruginosas* no período pós-intervenção. As demais espécies testadas apresentaram perfil policlonal.

REFERÊNCIAS

1. Aboelela SW, Stone PW, Larson EL. Effectiveness of bundled behavioural interventions to control healthcare-associated infections: a systematic review of the literature. Journal of Hospital Infection 2007; 66:101-108.
2. Yokoe DS, Classen D. Improving Patient Safety Through Infection Control: A New Healthcare Imperative. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29:S3-S11
3. van Duijn PJ, Dautzenberg MJ, Oostdijk EA. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs.Curr Opin Crit Care. 2011 Dec;17(6):658-65.
4. Akova M, Daikos GL, Tzouvelekis L, Carmeli Y.Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria Clin Microbiol Infect. 2012 May;18(5):439-48.
5. Copelan EA Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. N Engl J Med 2006. 354(17):1813-1822
6. Tomblyn M et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopiietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. ASBMT 2009
7. Kamboj M, Chung D, Seo SK, et al. The changing epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients. Biol Blood Marrow Transplant 2010; 16:1576–81.
8. Calderwood MS. Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci Among Patients on an Adult Stem Cell Transplant Unit: Observations From an Active Surveillance Program. Infection control and hospital epidemiology 2008(29)11, 1019-25
9. Vydra J, Shanley RM, George I, Ustun C, Smith AR, Weisdorf DJ, Young JA. Enterococcal Bacteremia Is Associated With Increased Risk of Mortality in Recipients of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Clin Infect Dis. 2012 (Epub ahead of print)
10. Weinstock DM, Conlon M, Iovino C, et al. Colonization, bloodstream infection, and mortality caused by vancomycin-resistant enterococcus early after allogeneic hematopoietic stem cell transplant. Biol Blood Marrow Transplant 2007; 13:615–21.
11. Zirakzadeh A, Gastineau DA, Mandrekar JN, Burke JP, Johnston PB, Patel R.

Vancomycin-resistant enterococcal colonization appears associated with increased mortality among allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant 2008; 41:385–92.

12. Dubberke ER. Clostridium difficile-associated disease in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients: risk associations, protective associations, and outcomes Clinic Transplantion 2010: 24: 192–198
13. Roghmann MC, McCarter RJ, Jr, Brewrink J, Cross AS, Morris JG., Jr *Clostridium difficile* infection is a risk factor for bacteremia due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) in VRE-colonized patients with acute leukemia. Clin Infect Dis. 1997;25:1056–1059.
14. Mendes ET, Dulley F, Basso M, et al. Healthcare-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation patients: risk factors and impact on outcome . Int J Infect Dis. 2012 Jun;16(6):424-8
15. Boucher HW. Challenges in Anti-Infective Development in the Era of Bad Bugs, No Drugs: A Regulatory Perspective Using the Example of Bloodstream Infection as an Indication. Clinical Infectious Diseases. 2010; 50:S4–9
16. Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. Clin Infec Dis 2011; 52: 1138-1143.
17. Oliveira AL Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug- resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. et al. Bone Marrow Transplant 2007; (29): 775-781
18. Ramphal R. Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. Clin Infect Dis (2004); 39: 25-31.
19. Marwick C, Davey P. Care bundles: the holy grail of infectious risk management in hospital? Current Opinion in Infectious Diseases 2009, 22:364–369.
20. Lobo RD, Levin AS, Gomes LM, Cursino R, Park M, Figueiredo VB, Taniguchi L, Polido CG, Costa SF. Impact of an educational program and policy changes on decreasing catheter-associated bloodstream infections in a medical intensive care unit in Brazil. Am J Infect Control. 2005 Mar;33(2):83-7.
21. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Am J Infect Control. 2007; 35(10 Suppl 2):S165-93.

22. Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM. Clorexidina: expanding the armamentarium for infection control and prevention. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46(2):274-81.
23. Anderson MJ, Horn ME, Lin YC, Parks PJ, Peterson ML. Efficacy of concurrent application of chlorhexidine gluconate and povidone iodine against six nosocomial pathogens. Am J Infect Control. 2010; 38(10): 826-31.
24. Chaiyakunapruk N, Veenstra DL, Lipsky BA, Saint S. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. Ann Intern Med 2002; 136:792–801.
25. Weber DJ, Rutala WA. Central Line–Associated Bloodstream Infections: Prevention and Management. Infect Dis Clin N Am 2011; 25:77–102
26. Safdar N1, O'Horo JC, Ghufran A, Bearden A, Didier ME, Chateau D, Maki DG. Chlorhexidine-impregnated dressing for prevention of catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. Crit Care Med. 2014 Jul;42(7):1703-13
27. Jarral OM, McCormack DJ, Ibrahim S, Shipolini AR. Shoul surgeons scrup with chlorhexidine or iodine prior to surgery? Interactive CardioVascular Thoracic Surgery, 2011;12:1017-1021
28. Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. Crit Care Med. 2007; 35(2):595-602.
29. Kassakian SZ, Mermel LA, ScM DO, Jefferson JA, Parenteau SL, Machan JT. Impact of Chlorhexidine Bathing on Hospital-Acquired Infections among General Medical Patients. Infect Control Hosp Epidemiol 2011; 32(3):238-243.
30. Climo MW, Sepkowitz KA, Zuccotti G, et al. The effect of daily bathing with chlorhexidine on the acquisition of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant Enterococcus, and healthcare-associated bloodstream infections: results of a quasi-experimental multicenter trial. Crit Care Med. 2009; 37(6):1858-65.
31. Vernon MO, Hayden MK, Trick WE, Hayes RA, Blom DW, Weinstein RA. Chlorhexidine gluconate to cleanse patients in a medical intensive care unit: the effectiveness of source control to reduce the bioburden of vancomycin-resistant enterococci. Arch Intern Med. 2006; 166(3):306-312.

32. Bass P, Karki S, Rhodes D, Gonelli S, Land G, Watson K, Spelman D, Harrington G, Kennon J, Cheng AC. Impact of chlorhexidine-impregnated washcloths on reducing incidence of vancomycin-resistant enterococci colonization in hematology-oncology patients. Am J Infect Control. 2013; 41(4):345-8.
33. Batra R, Cooper BS, Whiteley C, Patel AK, Wyncoll D, Edgeworth JD. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an intensive care unit. Clin Infect Dis. 2010 Jan 15; 50(2):210-217.
34. Popovich KJ, Hota B, Hayes R, Weinstein RA, Hayden MK. Daily skin cleansing with chlorhexidine did not reduce the rate of central-line associated bloodstream infection in a surgical intensive care unit. Intensive Care Med 2010; 36:854–858.
35. Bleasdale SC, Trick WE, Gonzalez IM, Lyles RD, Hayden MK, Weinstein RA. Effectiveness of chlorhexidine bathing to reduce catheter-associated bloodstream infections in medical intensive care unit patients. Arch Intern Med. 2007; 167(19):2073-2079.
36. Milstone AM, Elward A, Song X, Zerr DM, Orscheln R, Speck K, Obeng D, Reich NG, Coffin SE, Perl TM; Pediatric SCRUB Trial Study Group. Daily chlorhexidine bathing to reduce bacteraemia in critically ill children: a multicentre, cluster-randomised, crossover trial. Lancet. 2013; 381(9872): 1099-106
37. Climo MW, Yokoe DS, Warren DK, Perl TM, Bolon M, Herwaldt LA, Weinstein RA, Sepkowitz KA, Jernigan JA, Sanogo K, Wong ES. Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection. N Engl J Med. 2013;7;368(6):533-42
38. Evans HL, Dellit TH, Chan J, Nathens AB, Maier RV, Cuschieri J. Effect of chlorhexidine whole-body bathing on hospital-acquired infections among trauma patients .Arch Surg. 2010; 145(3):240-6.
39. Borer A, Gilad J, Porat N, et al. Impact of 4% chlorhexidine whole-body washing on multidrug-resistant Acinetobacter baumannii skin colonisation among patients in a medical intensive care unit. J Hosp Infect. 2007; 67(2):149-55.

40. Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, Stemer A, Weinstein RA. Successful control of an outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31(4):341-347.
41. Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? J Hosp Infect. 2010; 76(3):200-205.
42. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev. 1999; 12 (1):147-179.
43. Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SG. Klebsiella pneumoniae susceptibility to biocides and its association with cepA, qacΔE and qacE efflux pump genes and antibiotic resistance. J Hosp Infect. 2012;81(2):87-91.
44. Smith K, Gemmell CG. The association between biocide tolerance and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. J Antimicrob Chemother. 2008 Jan;61(1):78-84
45. Miyazaki NH, Abreu AO, Marin VA, Rezende CA, Moraes MT, Villas Bôas MH. The presence of qacA/B gene in Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(4):539-40.
46. Vali L, Davies SE, Lai L, et al. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant. Staphylococcus aureus isolates. J Antimicrob Chemother 2008; 61:524-532.
47. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of Acinetobacter species. J Antimicrob Chemother. 2010; 65(9):1975-1983.0
48. Sangal V, Girvan EK, Jadhav S, Lawes T, Robb A, Vali L, Edwards GF, Yu J, Gould IM. Impacts of a long-term programme of active surveillance and chlorhexidine baths on the clinical and molecular epidemiology of meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in an Intensive Care Unit in Scotland. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(4):323-31

49. Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Mölle G, Hölzel C. First detection of the antiseptic resistance gene qacA/B in Enterococcus faecalis. Microb Drug Resist. 2012;18(1):7-12
50. Vila J, Ribera A, Marco R, Ruiz J, Mensa J, Chaves J, Hernandez G, Jimenez De Anta MT. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2002 Mar; 49(3): 471-7.
51. Maseda H, Hashida Y, Konaka R, Shirai A, Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in Serratia marcescens. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(12):5230-5.
52. Kõljalg S, Naaber P, Mikelsaar M. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. J Hosp Infect. 2002;51(2):106-13.
53. Fraud S, Campigotto AJ, Chen Z, Poole K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(12):4478-82
54. Ye X, Rupnow M, Bastide P, Lafuma A, Ovington L, Jarvis WR. Economic impact of use of chlorhexidine-impregnated sponge dressing for prevention of central line-associated infections in the United States. Am J Infect Control. 2011;39(8):647-54
55. Munoz-Price LS, Hota B, Stemer A, Weinstein RA. Prevention of bloodstream infections by use of daily chlorhexidine baths for patients at a long-term acute care hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30(11):1031-5.
56. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. Am J Infect Control 2008 (36): 309-32.
57. Mendes R E; Kiyoya K A, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales A C, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metalo-β-lactamase encoding genes by multiplex real-time PCR assay melt curve analysis. J. Clin. Microbiol., 2007, 45:544 – 574

58. Mostachio AK, Levin AS, Rizek C, Rossi F, Zerbini J, Costa SF. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant Acinetobacter spp. isolates in Brazil. International Journal of Antimicrobial. 2012, 39: 396-401
59. Petrich A. Luinstra K, Page B, Callery S, Stevens D, Gafni A, Groves D, Chernesky M, Mahony JB. Effect of routine use of a multiplex PCR for detection of vanA- and vanB- mediated enterococcal resistance on accuracy, costs and earlier reporting.
60. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin Infect Dis. 2004 Jul 1;39(1):55-60.
61. Padoveze MC, Tresoldi AT, Von Nowakonski A, Aoki FH, Branchini MLM. Nasal MRSA Colonization of AIDS Patients Cared for in a Brazilian University Hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 22: 783-785.
62. Faria N.A., Carrico J.A., Oliveira DC, Ramirez M, de Lencecastre H. Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicilin-resistant and methicilicin-susceptible Staphylococcus aureus strains. J Clin Microbiol. 46(1):136-44. 2008
63. Lawes T, Lopez-Lozano JM, Nebot C, et al. Turning the tide or riding the waves? Impacts of antibiotic stewardship and infection control on MRSA strain dynamics in a Scottish region over 16 years: non-linear time series analysis. BMJ Open 2015; 5(3): e006596.
64. Ranzani OT, Simpson ES, Augusto TB, Cappi SB, Noritomi DT, Group ACC. Evaluation of a minimal sedation protocol using ICU sedative consumption as a monitoring tool: a quality improvement multicenter project. Crit Care 2014; 18(5): 580.
65. Chaves L, Tomich L, Salomao M, et al. Risk factor associated with bloodstream infection due to *P. aeruginosa* harbouring carbapenemases in hematopoietic and stem cell transplant (HSCT) patients. P1299. 24 ECCMID; 2014; Barcelona, Spain; 2014..

66. Montecalvo MA, de Lencastre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, VanHorn K,et al. Natural history of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Infect Control Hosp Epidemiol 1995;16:680-5.
67. O'Horo JC1, Silva GL, Munoz-Price LS, Safdar N. The efficacy of daily bathing with chlorhexidine for reducing healthcare-associated bloodstream infections: a meta-analysis. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012. 33(3):257-67.
68. Ritz J1, Pashnik B, Padula C, Simmons K. Effectiveness of 2 methods of chlorhexidine bathing. J Nurs Care Qual. 2012. 27(2):171-5.
69. Boletim Epidemiológico Centro de Vigilância Epidemiológica Divisão de Infecção Hospitalar. www.cve.saude.sp.gov.br
70. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. European Society of Clinical Microbiology. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 (1)1-5
71. Dados epidemiológicos boletim do CDC: http://www.cdc.gov/drugresistance.htm
72. Karki S1, Cheng AC. Impact of non-rinse skin cleansing with chlorhexidine gluconate on prevention of healthcare-associated infections and colonization with multi-resistant organisms: a systematic review. J Hosp Infect. 2012 Oct;82(2):71-84.
73. Martínez-Reséndez MF, Garza-González E, Mendoza-Olazaran S, Herrera-Guerra A, Rodríguez-López JM, Pérez-Rodriguez E, Mercado-Longoria R, Camacho-Ortiz A. Impact of daily chlorhexidine baths and hand hygiene compliance on nosocomial infection rates in critically ill patients. Am J Infect Control. 2014 Jul;42(7):713-7.
74. Russell, A. D., and G. W. Gould. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. J. Appl. Bacteriol. Symp.(1988).65:167-
75. Russell, A D, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance . (1996). 2nd ed. Ellis Horwood, Chichester, England.
76. Hancock, R. E. W. Alterations in membrane permeability. Annu. Rev. Microbiol. (1984).38:237–264.

77. Fang CT, Chen HC, Chuang YP, Chang SC Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(6):2024-8.
78. Ramos JF,.(2015 Maio). Caracterization and in vitro synergism study of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa in bloodstream infection of hematopoietic stem cell transplanted recipients

Anexos

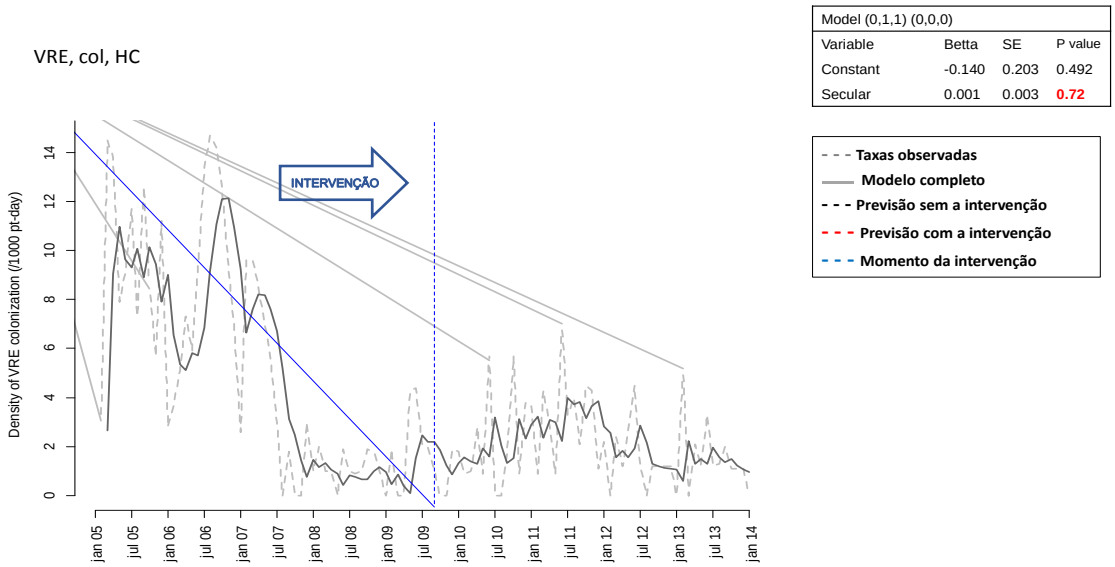
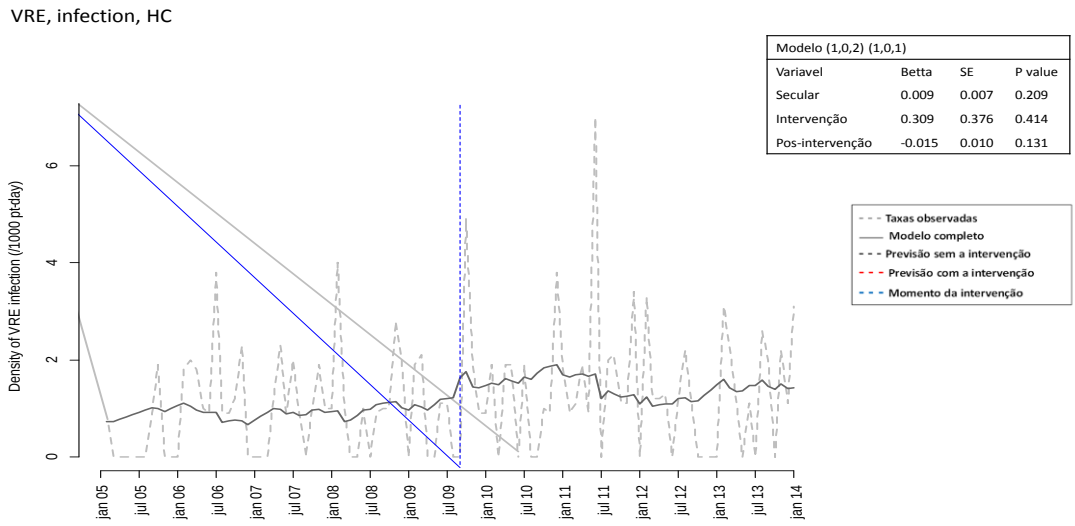



Figura 22: Distribuição temporal das densidades de incidência de colonização e infecção por VRE nos momentos pré e pós-intervenção nas UTIs clínicas do ICHC de 2005 a 2013