

**Ana Paula Marchi Rosin**

**Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias multirresistentes  
quanto à sensibilidade a clorexidina em células planctônicas e em  
biofilme**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências**

**Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias**

**Orientador: Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto**

**Coorientador (a): Dra Marina Farrel Cortes**

**São Paulo**

**2022**

**Ana Paula Marchi Rosin**

**Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias multirresistentes  
quanto à sensibilidade a clorexidina em células planctônicas e em  
biofilme**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências**

**Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias**

**Orientador: Dr. Lauro Vieira Perdigão Neto**

**Coorientador (a): Dra Marina Farrel Cortes**

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rosin, Ana Paula Marchi  
Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias  
multirresistentes quanto à sensibilidade a  
clorexidina em células planctônicas e em biofilme /  
Ana Paula Marchi Rosin. -- São Paulo, 2022.  
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.  
Orientador: Lauro Vieira Perdigão Neto.  
Coorientadora: Marina Farrel Cortes.

Descritores: 1.Clorexidina 2.Testes de  
sensibilidade microbiana 3.Farmacorresistência  
bacteriana 4.Carbonil cianeto m-clorofenil  
hidrazona 5.Biofilmes 6.Genoma

USP/FM/DBD-489/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*À Deus...*

*Aos meus pais Antonio e Mariza...*

*Ao meu esposo Rafael Rosin...*

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus pela minha vida e por me dar serenidade e paz nos momentos mais difíceis.
- A Profa. Dra. Silvia Costa por abrir as portas do laboratório pra mim, por todas as oportunidades oferecidas e por ter confiado a mim este projeto.
- Ao meu orientador Dr. Lauro Perdigão, por todos os ensinamentos, conversas, por todo apoio, suporte, por confiar em mim e pela amizade de todos esses anos.
- A minha co-orientadora e amiga Dra. Marina Farrel, pela sua amizade, seus ensinamentos, seus conselhos, por ter acreditado em mim e por ter impactado positivamente o meu crescimento pessoal e profissional.
- Aos meus pais por me mostrarem o caminho do bem, a ser uma pessoa íntegra e me apoiarem nos momentos mais difíceis.
- Ao Rafael Rosin, meu esposo, por ser uma pessoa incrível, meu maior incentivador, meu apoio nos momentos difíceis e por reforçar diariamente o que existe de melhor em mim.
- Aos meus sogros Miguel e Vera, meus cunhados Gustavo, Melissa, Fabio, Andreia e meus sobrinhos Diego e Fabricio.
- As minhas grandes amigas Alessandra e Saily, vocês enxergam o que há de melhor em mim, por todo apoio e por extrair de mim o meu melhor sorriso. Eu não tenho palavras para agradecer tanto amor, carinho e amizade.
- A minha amiga Evelyn, que sempre acreditou em mim e, mesmo distante, está sempre presente e com uma palavra de carinho e conforto.
- A amiga Inneke, minha por todas as oportunidades oferecidas, por todas as palavras de carinho, incentivo e principalmente pela sua amizade.
- Ao amigo Nazareno Scaccia, por toda a amizade, risadas, carinho e todos os momentos caru café compartilhados.
- A minha amiga Andréia Alcaia, por seu carinho, seus conselhos e sua amizade, mesmo distante.
- As funcionárias e amigas Sânia e Camila, por toda ajuda, ensinamentos e por todo acolhimento nos momentos difíceis.
- A Dra Anna Sara Levin e todos os funcionários do Grupo de Controle de Infecção Hospitalar (GCIH).

- Ao amigo Bruno Tavares, por todas as conversas, pela amizade construída e toda ajuda durante a realização deste trabalho.
- Aos alunos e funcionários do Laboratório de Bacteriologia (LIM49) que de alguma forma fizeram parte deste trabalho: Elenice, Andrés, Igor, Pablo, Vitor, Ana Paula Barboza, Beatriz (Be), Gabriele, Joyce, Danilo, Leticia, Bruna, Taniela e Roberta.
- A amiga Juliana Januário pela amizade construída ao longo dos anos, pelo carinho e pela ajuda na execução deste trabalho.
- Ao Gaspar Camilo, por ter iniciado esse trabalho e por toda a amizade ao longo dos anos.
- A amiga Camila Almeida por ter me permitido participar da sua tese e por todo carinho e amizade construída ao longo de todo esse tempo.
- Aos amigos dos laboratórios de Micologia (LIM 53); Parasitologia (LIM 46), Hepatites (LIM 47), Imunologia (LIM 48) e Seroepidemiologia e imunobiologia (LIM38) pela amizade e por me permitirem usar a estrutura do laboratório durante a execução deste trabalho.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

*Cora Coralina*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica em Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana (LIM49) da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro ao projeto com recursos próprios do laboratório e auxílio financeiro ao aluno pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Bibliotecas e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2016.

Abreviaturas dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.2 Clorexidina .....	5
1.3 Surtos hospitalares associados à contaminação da clorexidina .....	9
1.4 Biofilmes bacterianos .....	14
1.5 Mecanismos de Resistência a Clorexidina .....	16
1.6 Inibidores de bomba de efluxo .....	19
1.7 Pontos de corte para determinação da Concentração Inibitória Mínima para Clorexidina .....	20
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1. Objetivo principal .....	25
3.2. Objetivos secundários .....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1. Local do estudo .....	27
4.2 Seleção dos isolados .....	27
4.3 Testes fenotípicos.....	29
4.3.1 Preparo da suspensão bacteriana .....	29

4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelos métodos de diluição em ágar e diluição em caldo.....	29
4.3.3 Avaliação do papel da bomba de efluxo na diminuição da CIM para clorexidina .....	30
4.3.4 Padronização do método de disco difusão para avaliação da sensibilidade a clorexidina ...	31
4.3.5 Análise do Desempenho do Disco de Clorexidina .....	32
4.3.6 Formação e acúmulo de Biofilme .....	33
4.3.7 Concentrações Mínima de Eliminação de biofilme (CMEBs) utilizando Clorexidina .....	36
4.4 Sequenciamento e Curadoria dos principais mecanismos de resistência a Clorexidina .....	37
4.5 Análise estatística .....	39
4.6 Aspectos Éticos.....	39
4.7 Fluxograma de trabalho .....	39
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
5.1 Características fenotípicas dos isolados avaliados no estudo .....	42
5.2 Concentração Inibitória Mínima pelos métodos de diluição em ágar e diluição em caldo.....	42
5.3 Avaliação da resposta ao inibidor de bomba de efluxo CCCP sobre a CIM para CHG .....	43
5.4 Resultado da padronização da técnica de disco difusão para Clorexidina.....	45
5.4.1. Teste de interferência do diluente .....	45
5.4.2. Resultados dos testes com discos impregnados com CHG para determinação da melhor concentração do disco .....	45
5.4.3. Halos determinados por disco difusão utilizando discos de 5 µg e 100 µg de CHG .....	47
5.4.4. Halos determinados pelo disco com 100 µg de Clorexidina e comparação com os métodos de DA e DC .....	48
5.4.4.1. <i>K. pneumoniae</i> .....	48
5.4.4.2. <i>S. marcescens</i> .....	50
5.4.4.3. <i>A. baumannii</i> .....	52
5.4.4.4. <i>P. aeruginosa</i> .....	54
5.5 Análise de concordância entre os métodos de DD x DA e DD x DC.....	56
5.6 Formação e acúmulo de Biofilme .....	60
5.7 Concentrações Mínima de Eliminação de Biofilme (CMEBs) com Clorexidina .....	62
5.8. Caracterização molecular dos isolados.....	66
5.8.1 Testes Genotípicos .....	66
5.8.1.1 <i>K. pneumoniae</i> .....	66
5.8.1.2 <i>S. marcescens</i> .....	70
5.8.1.3 <i>A. baumannii</i> .....	74
5.8.1.4 <i>P. aeruginosa</i> .....	79

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1:** Microrganismos isolados de IPCSLC em UTI, no Brasil, no ano de 2021.

**Quadro 2:** Características e espectro antimicrobiano de antissépticos comumente utilizados no ambiente hospitalar.

**Quadro 3:** Consumo estimado de clorexidina em pacientes internados em UTI.

**Quadro 4:** Características dos principais surtos associados à contaminação da solução de clorexidina.

**Quadro 5:** Mecanismos de efluxo descritos como relacionados a diminuição da CIM para clorexidina.

**Quadro 6:** Distribuição das CIM e CBM (ECOFF), CIM 50 e 90 e CBM50 e 90 para clorexidina.

**Quadro 7:** Distribuição dos isolados avaliados no estudo.

**Quadro 8:** Isolados utilizados para padronização do disco impregnado com clorexidina.

**Quadro 9:** Perfil dos 38 isolados avaliados no teste de produção de Biofilme.

**Quadro 10:** Genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina.

**Quadro 11:** Interpretação dos valores de *kappa* para análise de concordância entre métodos.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Distribuição da CIM50 e CIM90 para CHG pelos métodos de DA e DC.

**Tabela 2** Distribuição da CIM50 e CIM90 para CHG pelos métodos de DA e DC frente ao inibidor CCCP.

**Tabela 3:** Halos obtidos com discos impregnados com duas diferentes soluções de clorexidina para determinação da melhor concentração utilizada nos testes.

**Tabela 4:** Intervalos dos halos obtidos pelo método de disco difusão com 5 $\mu$ g e 100 $\mu$ g de CHG.

**Tabela 5:** Análise de concordância entre disco difusão e ágar diluição sob ponto de corte se resistência  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  pelo teste de kappa.

**Tabela 6:** Análise de concordância entre disco difusão e ágar diluição sob ponto de corte se resistência  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  pelo teste de kappa.

**Tabela 7:** Resultados da análise da DO para caracterização da produção de biofilme dos isolados.

**Tabela 8:** CIM, CBM, CMEB and “*Eagle Effect*” para CHG de isolados Gram-negativos e Gram-positivos multirresistentes na forma planctônica e em biofilme

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Microrganismos isolados em hemocultura causadores de IPCSLC isolados em UTI Adulto no 2020.

**Figura 2:** Linha do tempo com relatos de surtos hospitalares relacionados à contaminação da clorexidina.

**Figura 3:** Representação dos estágios da formação de biofilme bacteriano.

**Figura 4:** Principais mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos e antissépticos em microrganismos Gram-negativos.

**Figura 5:** Representação gráfica do preparo das placas com CHG para determinação da CIM pelo método de DA.

**Figura 6:** Representação do preparo dos meios com clorexidina acrescidos de CCCP para verificação da ação da bomba de efluxo na sensibilidade a CHG.

**Figura 7:** Representação do preparo do disco impregnado com CHG para teste de disco difusão.

**Figura 8:** Critérios utilizados para interpretação de concordância categórica entre os métodos de microdiluição e disco difusão.

**Figura 9:** Representação do preparo da placa para análise de biofilme.

**Figura 10:** Representação do preparo da placa para determinação da CMEB utilizando diferentes concentrações de CHG.

**Figura 11:** Fluxograma representando as atividades realizadas durante o estudo.

**Figura 12:** Teste de interferência do diluente para avaliação da formação de halo de inibição.

**Figura 13:** Padronização do método de disco difusão para determinação da melhor concentração de CHG usada nos testes.

**Figura 14:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *K. pneumoniae*.

**Figura 15:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em isolados de *K. pneumoniae*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

**Figura 16:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em isolados de *K. pneumoniae*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

**Figura 17:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *S. marcescens*.

**Figura 18:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *S. marcescens*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

**Figura 19:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *S. marcescens*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

**Figura 20:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *A. baumannii*.

**Figura 21:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *A. baumannii*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

**Figura 22:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *A. baumannii*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

**Figura 23:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *P. aeruginosa*.

**Figura 24:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *P. aeruginosa*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

**Figura 25:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *P. aeruginosa*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

**Figura 26:** Variação das leituras de DO e valor médio da produção de biofilme entre os isolados incluídos no estudo.

**Figura 27:** Representação gráfica (A) e visual (B) do “Eagle effect” durante o teste de CMEB.

**Figura 28:** Diferenças associadas a presença dos genes relacionados ao aumento da CIM para CHG em isolados de *K. pneumoniae*.

**Figura 29:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *K. pneumoniae*.

**Figura 30:** Diferenças associadas a presença dos genes relacionados ao aumento CIM para CHG em isolados de *S. marcescens*.

**Figura 31:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *S. marcescens*.

**Figura 32:** Diferenças associadas à presença dos genes relacionados ao aumento CIM para CIM em isolados de *A. baumannii*.

**Figura 33:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *Acinetobacter baumannii*.

**Figura 34:** Diferenças associadas à presença dos genes relacionados ao aumento CIM para CHG em isolados de *P. aeruginosa*.



**Figura 35:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *P. aeruginosa* do estudo.

## **LISTA DE ANEXOS**

**Anexo 1:** Parecer de aprovação do estudo no Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Anexo 2:** Produção Científica

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- ITU – Infecção do Trato Urinário
- ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
- IPCSLC – Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Comprovada
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica
- MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a metilina)
- ERV – *Enterococcus* resistente à vancomicina
- PAV – Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
- ICS – Infecção de Corrente Sanguínea
- CVC – Cateter Venoso Central
- CHG – Clorexidina
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado)
- ECV – *Epidemiologic Cut-off Values* (Ponto de Corte Epidemiológico )
- ECOFF – *Epidemiologic Cut-off Values* (Ponto de Corte Epidemiológico )
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
- CMEB – Concentração Mínima de Eliminação de Biofilme
- CBM – Concentração Bactericida Mínima
- MHCA – Muller Hinton Cation Ajustado
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- DA – Diluição em ágar
- DD – Disco difusão
- DC – Diluição em caldo
- DO – Densidade ótica

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*

ST – *Sequence type*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*

## RESUMO

Rosin APM. *Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias multirresistentes quanto à sensibilidade a clorexidina em células planctônicas e em biofilme* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

**Introdução:** Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são uma das principais causas de mortalidade e morbidade e um importante problema com altos custos para os sistemas de saúde. Antissépticos como a clorexidina (CHG) podem ser uma alternativa na redução dos casos de colonização da pele. Entretanto, mecanismos de resistência, como bombas de efluxo, já foram descritos por estarem relacionados com a resistência dos microrganismos a CHG. Além disso, a presença de biofilme permite que as bactérias sobrevivam em diferentes ambientes. **Objetivos:** Avaliar a tolerância a clorexidina em microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos multirresistentes em células planctônicas e em biofilme; validar a técnica de disco difusão para determinação *in vitro* de sensibilidade a clorexidina; caracterizar genética e filogeneticamente microrganismos Gram-negativos com concentração inibitória mínima elevada para clorexidina. **Materiais e Métodos:** Concentração Inibitória Mínima pelo método de diluição em ágar (DA) e microdiluição em caldo (DC) com e sem o inibidor de bomba de efluxo CCCP em 132 isolados; Padronização de método de disco difusão (DD) com clorexidina utilizando 10 isolados com diferentes perfis de sensibilidade a CHG; Análise do Desempenho do Disco de CHG nas concentrações de 5 µg e 100µg; Produção de biofilme e Concentrações mínima de eliminação de biofilme (CMEBs) com CHG em 38 isolados; Curadoria dos principais mecanismos de resistência a CHG; Análise de concordância entre os métodos utilizando teste de *kappa* e correlação entre os métodos utilizando o teste de *Spearman*. **Resultados:** A resistência a clorexidina pelo método de DA e DC foi de 67,0% (59/88) e 19,3% (17/88) para Enterobactérias (*K. pneumoniae* e *S. marcescens*), 18,2% (8/44) e 6,81% (3/44) para não fermentadores (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*), respectivamente. A resposta ao CCCP nos métodos DA e DC foi de 97,5% (39/40) e 100% (2/2) para *K. pneumoniae*, 100% (17/17) e 100% (15/15) para *S. marcescens* e 100% (5/5) e 100% (3/3) em *A. baumannii*, respectivamente, tiveram diminuição  $\geq 4$  diluições da CIM. Não houve formação de zona de inibição no disco com 5µg de clorexidina e no disco de 100µg os tamanhos dos halos variaram de 4 - 17mm. No

cenário de resistência CIM  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$ , os isolados de *K. pneumoniae* foram os únicos que apresentaram concordância boa ( $k = 0,48$ ) entre os métodos DA e DD, para o halo de 16 mm, atendendo os critérios do CLSI. No cenário de resistência CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ , para *S. marcescens* obtivemos concordância boa com halos de 12mm ( $k = 0,58$ ), 13mm ( $k = 0,65$ ) e 14mm ( $k = 0,60$ ) nos métodos de DA e DD e 12 mm ( $k = 0,42$ ) e 13 mm ( $k = 0,49$ ) nos métodos de DC e DD, mas não atendiam os critérios do CLSI. A produção de biofilme foi testada em 38 isolados Gram-negativos e 06 Gram-positivos. Biofilme forte foi observado em 84,2% dos isolados Gram-negativos e 50,0% em Gram-positivos; moderado em 13,2% e 50,0%, respectivamente. Um isolado Gram-negativo foi não produtor de biofilme. Valores de CMEBs variaram de 128 a  $\geq 16.384$   $\mu\text{g/mL}$  em Gram-negativos e de 32 a  $\geq 16.384$   $\mu\text{g/mL}$  em Gram-positivos. O fenômeno *Eagle effect* foi observado em 60,5% ( $n=23$ ) dos isolados em condição de biofilme, elevando a CIM para  $\geq 16.384$   $\mu\text{g/mL}$  e para até 8.192  $\mu\text{g/mL}$  em células planctônicas. Em *K. pneumoniae*, o gene *cepA* foi observado em 100% dos isolados, seguido dos genes *smvAR* (90,6%), *qacE $\Delta$*  (85,9%) e *qacE* (15,6%). Em *S. marcescens* os genes *sdeXY* e *qacE* foram encontrados em 100% das amostras e o gene *qacE $\Delta$*  em 12,5%. Em *A. baumannii* os genes *adeAB* foram observados em 100% dos isolados e o gene *adeC* em 58,6%, os genes *aceIR* em 93,1% e o gene *qacE $\Delta$*  em 3,44% e nenhum isolado tinha o gene *qacE* e em *P. aeruginosa* os genes *mexCD-oprJ*, *qacE* e *cepA* estavam presentes em 100% das amostras, já os genes *nfxB* e *qacE $\Delta$*  em 93,3% dos isolados. **Conclusão:** Neste estudo demonstramos um grande percentual de isolados com CIM elevadas para clorexidina, em especial nos isolados de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*. O CCCP foi capaz de reduzir a CIM para CHG nos isolados de *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *A. baumannii*, exceto para *P. aeruginosa*. O teste de disco difusão não foi capaz de discriminar isolados sensíveis e resistentes, bem como estabelecer um ponto de corte como fator seletivo de resistência a CHG. O *Eagle effect* foi um importante achado no nosso estudo levantando um alerta à ocorrência deste fenômeno para evitar falsos resultados de sensibilidade. Não houve diferença entre a presença dos genes de resistência e o perfil de sensibilidade a clorexidina em nenhum dos microrganismos.

**Descritores:** Clorexidina; Testes de sensibilidade microbiana; Farmacorresistência bacteriana; Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona; Biofilmes; Genoma.

## ABSTRACT

Rosin APM. *Phenotypic and genotypic characterization of multiresistant bacteria regarding susceptibility to chlorhexidine in planktonic and biofilm cells* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

**Introduction:** Hospital-acquired infection (HAI) is an important cause of mortality and morbidity and a major problem with high costs for health systems. Antiseptics such as chlorhexidine (CHG) may be an alternative to reduce cases of skin colonization. However, resistance mechanisms, such as efflux pumps, have already been described as related to the resistance of microorganisms to CHG. Furthermore, the presence of biofilm allows bacteria to survive in different environments. **Objectives:** To evaluate the tolerance to chlorhexidine in Gram-negative and Gram-positive multiresistant microorganisms in planktonic cells and in biofilm; to validate the disk diffusion method for *in vitro* determination of susceptibility to chlorhexidine; to characterize genetically and phylogenetically Gram-negative microorganisms with high minimum inhibitory concentration to chlorhexidine. **Material e Methods:** Minimum Inhibitory Concentration by the dilution agar (DA) and broth microdilution (BM) method with and without the efflux pump inhibitor CCCP in 132 isolates; Standardization of disk diffusion (DD) method with chlorhexidine using 10 isolates with different CHG susceptibility profiles ; CHG disc performance analysis at 5 µg and 100 µg concentrations; Biofilm Production and Minimum Biofilm Elimination Concentrations (MBECs) with CHG in 38 isolates; Curation of the main resistance mechanisms to CHG; Agreement analysis between the methods using the *kappa* test and correlation between the methods using the *Spearman* test. **Results:** Chlorhexidine resistance by the DA and BM method was 67.0% (59/88) and 19.3% (17/88) for Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae* and *S. marcescens*), 18.2% (8/44) and 6.81% (3/44) for non-fermenters (*P. aeruginosa* and *A. baumannii*) respectively. Response to CCCP in the DA and DC methods was 97.5% (39/40) and 100% (2/2) for *K. pneumoniae*, 100% (17/17) and 100% (15/15) for *S. marcescens* and 100% (5/5) and 100% (3/3) for *A. baumannii*, respectively, had a MIC decrease of  $\geq 4$  dilutions. There was no formation of zone of inhibition in the disk with 5µg of chlorhexidine and in the 100µg disk the sizes of the halos varied from 4 - 17mm. In the scenario of MIC resistance  $\geq 32$  µg/mL, the *K. pneumoniae* isolates were the only ones that showed good agreement

( $k = 0.48$ ) between the DA and DD methods, for the 16 mm halo, meeting the CLSI criteria. In the scenario of MIC resistance  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ , for *S. marcescens* we obtained good agreement with halos of 12mm ( $k = 0.58$ ), 13mm ( $k = 0.65$ ) and 14mm ( $k = 0.60$ ) in the methods of DA and DD and 12 mm ( $k = 0.42$ ) and 13 mm ( $k = 0.49$ ) in the DC and DD methods but did not meet the CLSI criteria. Biofilm production was tested in 38 Gram-negative and 06 Gram-positive isolates. Strong biofilm was observed in 84.2% of Gram-negative and 50.0% of Gram-positive isolates; moderate at 13.2% and 50.0%, respectively. One Gram-negative isolate was non-biofilm-producing. CMEB values ranged from 128 to  $\geq 16,384$   $\mu\text{g/mL}$  in Gram-negatives and from 32 to  $\geq 16,384$   $\mu\text{g/mL}$  in Gram-positives. Eagle effect phenomenon was observed in 60.5% ( $n=23$ ) of the isolates in biofilm condition, increasing the MIC to  $\geq 16,384$   $\mu\text{g/mL}$  and up to 8,192  $\mu\text{g/mL}$  in planktonic cells. In *K. pneumoniae*, *cepA* gene was observed in 100% of the isolates, followed by the *smvAR* (90.6%), *qacE $\Delta$*  (85.9%) and *qacE* (15.6%) genes. In *S. marcescens* the *sdeXY* and *qacE* genes were found in 100% of the samples and the *qacE $\Delta$*  gene in 12.5%. In *A. baumannii* the *adeAB* genes were observed in 100% of the isolates and the *adeC* gene in 58.6%, the *aceIR* genes in 93.1% and the *qacE $\Delta$*  gene in 3.44% and none of isolates had the *qacE* gene and in *P. aeruginosa* the *mexCD-oprJ*, *qacE* and *cepA* genes were present in 100% of the samples, while the *nfxB* and *qacE $\Delta$*  genes were present in 93.3% of the isolates. **Conclusion:** In this study, we demonstrated a large percentage of isolates with elevated MIC for chlorhexidine, especially in isolates of *K. pneumoniae* and *S. marcescens*. CCCP was able to reduce the CHG MIC in *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *A. baumannii* isolates, except for *P. aeruginosa*. The disk diffusion test was unable to discriminate sensitive and resistant isolates, as well as establish a cutoff point as a selective factor for resistance to CHG. The *Eagle effect* was an important finding in our study, raising an alert to the occurrence of this phenomenon to avoid false susceptibility results. There was no difference between the presence of resistance genes and the chlorhexidine susceptibility profile in none of the microorganisms tested.

**Descriptors:** Chlorhexidine; Microbial sensitivity tests; Drug resistance bacterial; Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone; Biofilm; Genome.

|



## **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são uma das principais causas de mortalidade e morbidade e são descritas como um importante problema, pois gera um alto custo para os sistemas de saúde em todo o mundo (AL-HAZMI et al, 2014; BRAGA et al, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), todos os anos centenas de milhões de pacientes são afetados por doenças associadas aos cuidados de saúde, levando a uma mortalidade significativa, além de perdas para os sistemas de saúde. A cada 100 pacientes internados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma infecção associada aos cuidados com a saúde. Na Europa, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças estima que todos os anos 4.131.000 pacientes são afetados por ao menos um episódio de IRAS, e corresponde a 7,1% das infecções (OMS, 2009).

No Brasil, o programa de Controle de Infecção Hospitalar foi regulamentado pelo Ministério da Saúde no ano de 1983 através da n° 196/83. No ano de 1997 foi publicada no Diário Oficial da União, a Lei n° 9431/97, que em obriga os hospitais a manterem um Programa de Infecções Hospitalares e a criação de Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) para execução das normas, prevenção e o controle de Infecções Hospitalares (Anvisa. Acesso em 31/10/2022).

Estudos demonstram que microrganismos resistentes a diversas classes de antimicrobianos são um problema mundial e tem sido associados com o aumento das infecções adquiridas em hospitais e na comunidade. Além disso, microrganismos Gram-negativos estão entre os principais causadores de IRAS, responsáveis por cerca de 35% das bacteremias e 70% das infecções do trato urinário (ITU), pneumonia e sepse, destacando-se *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ZHOU et al, 2021; HEIJDEN et al., 2007; VICARI et al., 2012).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), 28.037 microrganismos foram notificados como os principais agentes causadores de Infecção Primária de Corrente Sanguínea Laboratorialmente Comprovada (IPCSLC) em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) no ano de 2021. *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* entre os microrganismos Gram-negativos, e *Staphylococcus coagulase-negativa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* entre os Gram-positivos e *Candida não-*

*albicans* entre as espécies de fungos destacam-se como os principais agentes causadores de IRAS. (Quadro 1)

**Quadro 1:** Microrganismos isolados de IPCSLC em UTI, no Brasil, no ano de 2021.

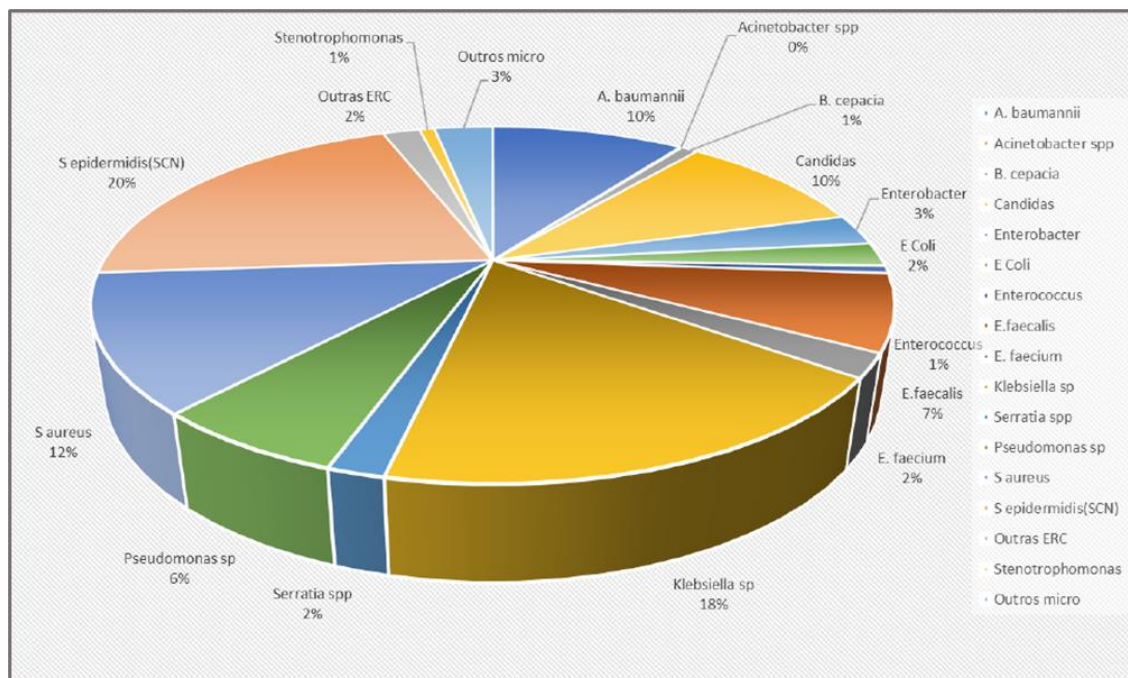
Fonte: Anvisa, 2021.

	<b>Microrganismo</b>	<b>Número de Isolados</b>
<b>Gram-negativos</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4769
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3351
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2097
	<i>Enterobacter sp.</i>	826
	<i>Serratia sp.</i>	827
	<i>Escherichia coli</i>	674
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	358
<b>Gram-positivos</b>	<i>Burkholderia cepacia</i>	325
	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	7683
	<i>Staphylococcus aureus</i>	4132
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1473
	<i>Enterococcus faecium</i>	622
	<i>Enterococcus sp. (exceto E. faecalis e E. faecium)</i>	358
<b>Fungos</b>	<i>Cândida não-albicans</i>	1190
	<i>Cândida albicans</i>	825
	<b>Total</b>	28.037

No Estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) analisa os dados e presta apoio técnico aos municípios, executando ações nas medidas de prevenção, acompanhando as investigações de surtos, analisando e divulgando os indicadores epidemiológicos de IRAS.

No ano de 2020, 7.156 microrganismos isolados de hemocultura causadores de IPCSLC foram notificados por 425 hospitais com UTI ao CVE. Esse número representou um aumento de 60% das infecções quando comparados com o ano anterior. Os dados mostram que 18% dessas infecções foram causadas por espécies de *K. pneumoniae* entre os microrganismos Gram-negativos. Já entre os microrganismos Gram-positivos, *S. epidermidis* coagulase negativa (SCN) representou 20% dessas infecções seguido de *S.*

*aureus* com 12%. Entre fungos, espécies de *Cândidas* representaram 10% das infecções. (Figura 1).



**Figura 1:** Microrganismos isolados em hemocultura causadores de IPCSLC isolados em UTI Adulto no 2020. Fonte: Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, 2020.

A prevenção de IRAS é um dos elementos essenciais nas estratégias de boas práticas clínicas em UTI, entretanto, apesar de todas as medidas preventivas implementadas, ainda há ocorrência de infecções por outros fatores como a baixa imunidade de pacientes críticos, intervenções invasivas, tratamento intensivo e desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos (DUSZYŃSKA et al, 2017). O desenvolvimento do pacote de medidas ou “*bundle*” de prevenção e manutenção, higiene das mãos e uso de antissépticos são algumas estratégias que podem ser adotadas para prevenção de IRAS (ANVISA, 2017).

Por definição, antissépticos são substâncias antimicrobianas que são aplicadas na pele ou nas membranas mucosas com o intuito de reduzir a microbiota nas mãos dos profissionais de saúde e conseqüentemente a transmissão cruzada de microrganismos, além de ser usada no preparo da pele dos pacientes antes de procedimentos cirúrgicos (WEBER et al, 2007). Estudos têm demonstrado que o uso de antissépticos, como a Clorexidina tem apresentado uma redução de 23% a 50% nos casos de colonização da

pele por microorganismos multirresistentes como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV), *A. baumannii* e *P. aeruginosa* além de microorganismos produtores de Beta Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) (BOONYASIRI et al, 2016). Estima-se que 45-51% de paciente internados em UTI são afetados por algum tipo de IRAS. Clorexidina tem um papel importante na prevenção dessas infecções, pois pode prevenir a colonização da pele por patógenos causadores de Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV), Infecções de Corrente Sanguínea (ICS) relacionadas ou não ao uso de Cateter e ITU (LITWIN et al, 2020; SWAN et al, 2016).

A pele abriga uma importante microbiota composta por microorganismos residentes e transitórios e pode ser uma fonte de transmissão bacteriana e, diante dessas condições, a implementação de banhos diários com clorexidina 2% pode ser um aliado na redução da colonização bacteriana em pacientes críticos, reduzindo assim as chances de infecção e transmissão cruzada (ZANICHELLI et al, 2021).

Como dito, a clorexidina é um antisséptico amplamente utilizado no ambiente hospitalar, como uma alternativa na prevenção de IRAS. A CCIH tem um papel importante na orientação e investigação das boas práticas de uso da clorexidina tanto a ocorrência das IRAS como a orientação dos profissionais de saúde na higiene das mãos, bem como a limpeza adequada de equipamentos médicos evitando a ocorrência de surtos hospitalares associados à contaminação do antisséptico (SEHULSTER et al, 2004; WEBER et al, 2007).

## **1.2 Clorexidina**

Clorexidina (CHG) foi descoberta e sintetizada na década de 50 (1954) para tratamento da Malária e se tornou amplamente utilizada na prática clínica como antisséptico. Vem sendo utilizada há mais de 50 anos devido a sua múltipla aplicabilidade, como antisepsia da pele, higiene bucal, lavagem de pacientes e descolonização de MRSA (VAN DEN POEL et al, 2022).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve a Clorexidina como um produto de baixa toxicidade e atividade antimicrobiana mais lenta do que os outros alcoóis. Além disso, possui ação bactericida de amplo espectro e maior atividade contra bactérias gram positivas, mas também se mostra efetiva contra bactérias Gram-negativas,

anaeróbios, fungos e alguns vírus. Não tem atividade contra esporos bacterianos e micobactérias (OMS, 2009).

O produto está disponível nas formulações degermante, aquosa e alcoólica em concentrações que variam de 0,02% a 4%. As concentrações de 0,02% são utilizadas na manutenção de dispositivos invasivos como cateter; 0,2% para higiene bucal; 0,5% para curativos de dispositivos invasivos e no intervalo de 2 a 4% para assepsia de pele (WAND et al, 2017).

Quando associada a álcool ou outros detergentes tópicos, torna-se efetiva na higienização de locais de punção de cateteres venosos centrais (CVC) e assepsia de pele em pacientes pré-operatório auxiliando na redução de casos de bacteremias. Seu mecanismo de ação se dá pela alteração do equilíbrio osmótico, redução do metabolismo e rompimento da membrana plasmática dos microrganismos. Além de fácil manuseio e baixo custo, apresenta também propriedades de liberação lenta mantendo sua atividade por até 12h (VERGNANO et al, 2015; KAMPF et al, 2016; MENDES et al, 2016 e ZAND et al 2017).

O Quadro 2, adaptado de estudos prévios, descreve as principais características e espectro antimicrobianos dos diferentes antissépticos utilizados no ambiente hospitalar (WEBER et al, 2007).

**Quadro 2:** Características e espectro antimicrobiano de antissépticos comumente utilizados no ambiente hospitalar. Fonte: Weber et al, 2007.

Grupo	Atividade antimicrobiana					Ação	Observações
	Gram positivos	Gram negativos	Micobactéria	Fungos	Vírus		
Álcool	+++	+++	+++	+++	+++	Rápida	Concentração ótima, 60% – 95%
Clorexidina (2% e 4%)	+++	++	+	+	+++	Intermediária	Atividade persistente com raras reações alérgicas
Compostos de Iodo	+++	+++	+++	++	+++	Intermediária	Queimaduras na pele e muito irritante para as mãos
Iodóforos	+++	+++	+	++	++	Intermediária	Menos irritante que os compostos Iodo
Derivados de Fenol	+++	+	+	+	+	Intermediária	Atividade neutralizada por surfactantes não iônicos
Triclosan	+++	++	+	-	+++	Intermediária	A aceitabilidade nas mãos varia
Quaternário de amônio	+	++	-	-	+	Lenta	Usado apenas em combinação com álcoois;

Um estudo publicado por Kampf e colaboradores em 2016, descreveram o consumo de clorexidina em pacientes internados em UTI (Quadro 3). No entanto, com seu uso generalizado, aumentam as preocupações sobre um possível desenvolvimento de resistência de microrganismos a CHG, ou seja, uma pressão seletiva levar ao aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para clorexidina dos microrganismos.

**Quadro 3**– Consumo estimado de clorexidina em pacientes internados em UTI. Fonte: Kampf et al, 2016.

Uso da Clorexidina	Concentração da Clorexidina	Frequência de uso (por dia)	Quantidade/mL	Uso paciente/grama
Higiene das mãos	2%	179	3-5ml	35,8g
Banho	2%	1x/dia	15ml	0,3g
Higiene oral/Paciente entubado	0.2%	6x/dia	10ml	0,12g
Higiene oral/Paciente não entubado	0.12%	3x/dia	10ml	0,036
Curativo diário CVC	2%	1x/dia	3ml	0,021
Cirurgia	2%	1x internação	10ml	0,09

Legenda: CVC – Cateter venoso central

Um estudo conduzido no Hospital das Clínicas da FMUSP, por Mendes e colaboradores no ano de 2016, avaliou o impacto do uso de clorexidina em banhos diários em pacientes transplantados de medula óssea, como alternativa para a redução das taxas de IRAS. O estudo evidenciou CIM mais elevadas em microrganismos Gram-negativos sugerindo que a membrana externa pode funcionar como uma barreira impedindo a entrada de antissépticos. Já em Gram-positivos os autores mostraram que isolados de ERV tiveram valores de CIM mais baixos para clorexidina reduzindo assim a incidência desse microrganismo na unidade.

Um outro estudo avaliou o uso da Clorexidina como forma de prevenção de PAV. No total, foram avaliados 260 amostras de *Escherichia coli* isoladas de pacientes



internados em 14 diferentes UTIs e evidenciou que 26,9% dos isolados cresceram na presença da clorexidina, demonstrando assim pouca efetividade em inibir o crescimento bacteriano após 8h de exposição ao antisséptico na concentração de 2 mg/L (LA COMBE et al, 2018).

Antissepsia inadequada da pele, diluição excessiva do antisséptico, desinfecção inadequada de dispositivos médicos ou superfícies ambientais, escolha incorreta de um desinfetante e resistência podem resultar na falta de atividade e falha do antisséptico, além disso a utilização de soluções de CHG contaminadas tem sido associada a ocorrência de surtos (WEBER et al, 2007).

### **1.3 Surto hospitalares associados à contaminação da clorexidina**

Por definição, um surto é um aumento no número de casos de determinado agente acima do número que normalmente ocorre em uma unidade de saúde durante um período de tempo (MUSAU et al, 2015). Ao longo dos anos, foram descritos surtos e pseudo-surtos associados ao uso da clorexidina. Os primeiros relatos da presença de microrganismos em solução de clorexidina foram descritos na década de 1970 e desde então vários estudos foram publicados (BASET et al, 1970).

A Figura 2 mostra uma linha do tempo com estudos que descrevem a presença de microrganismos isolados em soluções de clorexidina e que foram associados a surtos hospitalares.

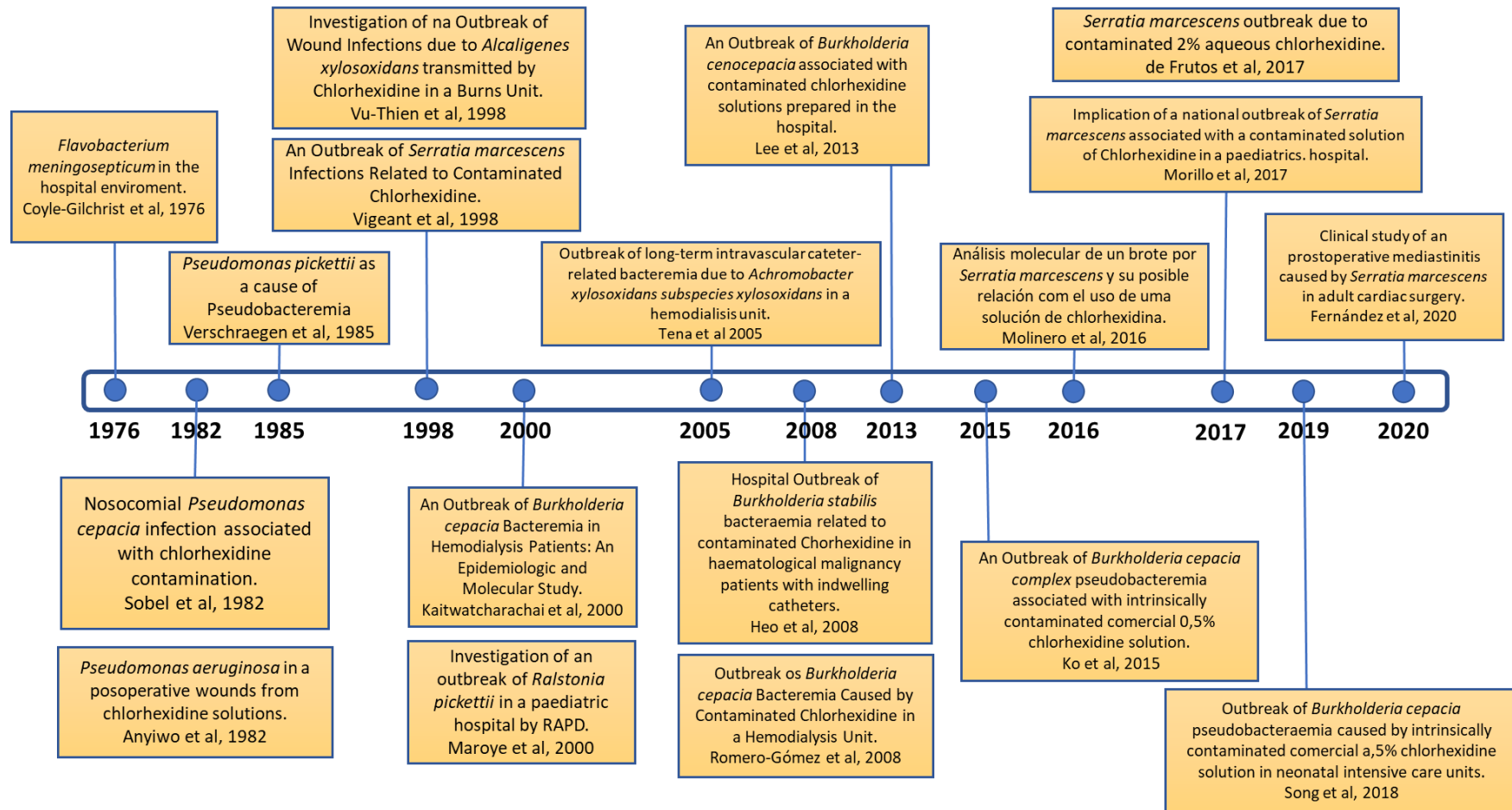


Figura 2: Linha do tempo com relatos de surtos hospitalares relacionados à contaminação da clorexidina.

Isolados de *Flavobacterium meningosepticum* foram encontrados em amostras clínicas de dez pacientes internados e, durante uma investigação epidemiológica foi constatado que o microrganismo estava presente nas soluções de armazenamento do termômetro, escovas de unhas e nos materiais para limpeza da pele. A fonte primária de infecção não foi encontrada, entretanto, os autores acreditam que o microrganismo poderia estar presente na água utilizada no preparo da solução de clorexidina e no reabastecimento das garrafas das enfermarias (COYLE-GILCHRIST et al, 1975).

Desde então, ao longo dos anos, diversos estudos têm reportado isolados de *S. marcescens*, *Burkholderia spp* (*B. cepacia*, *B. cenocepacia* and *B. stabilis*), *Pseudomonas spp* (*P. aeruginosa* and *P. pickettii*), *R. pickettii* e *A. xylosoxidans* como os principais microrganismos envolvidos em surtos associados a contaminação de soluções de clorexidina. Esses microrganismos estão amplamente distribuídos no ambiente como água, incluindo água de reservatório, solo, frutas e hortaliças e são capazes de sobreviver em solução antisséptica, principalmente aquelas sem álcool (KO et al, 2015; FERNANDÉZ et al, 2020; RYAN et al, 2005; MARION-SANCHEZ et al, 2019).

A solução aquosa de clorexidina é o tipo de antisséptico mais utilizado em unidades de saúde e também o mais suscetível à contaminação quando comparado a outros disponíveis comercialmente (HERVÉ et al, 2015; FERNANDEZ et al, 2020).

Desde que os hospitais passaram a comprar a clorexidina pronta para uso nas unidades, houve uma diminuição dos casos de contaminação no processo de preparo da clorexidina, embora alguns estudos recentes observaram a presença de *Serratia marcescens* em frascos de solução comercial de clorexidina (ROJO-MOLINERO et al, 2016; DE FRUTOS et al, 2017, MORILLO et al, 2018).

No Quadro 4 é possível observar as características e os desfechos de surtos associados a clorexidina descritos na literatura ao longo dos anos.

**Quadro 4:** Características dos principais surtos associados à contaminação da solução de clorexidina

Estudo	Produto envolvido	Microrganismo	Ano	Infecções	Tipo de infecção	Desfecho
Anyiwo et al, 1982	Clorexidina solução aquosa	<i>P. aeruginosa</i>	1978	ND	ND	ND
Verschraegen et al, 1985	- Clorexidina solução aquosa - Água de diluição	<i>P. pickettii</i>	Mar a Mai 1983	15	Sangue	Nenhum óbito
Vigeant et al, 1998	Frascos de clorexidina	<i>S. marcescens</i>	Nov 1992 a Jan 1993	31	ND	3 óbitos
Vu-Thien et al, 1998	Frascos com clorexidina diluída	<i>A. xylosoxidans</i>	Ago a Set 1996	8	Ferida, Sangue, Fezes	Nenhum óbito
Maroye et al, 2000	- Clorexidina aquosa 0,05% - Água destilada	<i>R. pickettii</i>	Fevereiro 1995	6	Sangue	Nenhum óbito
Tena et al, 2005	Frasco com clorexidina diluída 2,5%	<i>A. xylosoxidans</i>	Outubro 2000	4	Sangue	Nenhum óbito
Molina-Cabrillana et al, 2007	-Torneira; - Clorexidina solução aquosa	<i>A. xylosoxidans</i>	Jan 2004 a Jun 2005	58	Sangue, cateter, fluido cérebro-espinal, exsudato, fluido peritoneal	Nenhum óbito
Heo et al, 2008	Solução clorexidina gluconato 0,5%	<i>B. stabilis</i>	Set a Out 2007	8	Sangue Periférico e CVC	Nenhum óbito
Lee et al 2013	- Solução clorexidina - Água purificada do laboratório	<i>B. cenocepacia</i>	Jan a Out 2007	20	Sangue, abscesso, fluido cérebro-espinal, dreno, cateter	1 óbito
Hervé et al, 2015	Solução aquosa clorexidina	<i>S. marcescens</i>	Set a Dez 2014	13	Ferida, sangue, cateter diálise, CVC	ND
Molinero et al, 2016	Solução comercial clorexidina 2%	<i>S. marcescens</i>	Dez 2014 a Jan 2015	29	ND	ND
de Frutos et al, 2017	Garrafa solução comercial clorexidina 2%	<i>S. marcescens</i>	Nov a Dez 2014	5	Ponta cateter, hemocultura, fluido cérebro-espinal	1 óbito NR
Morillo et al, 2018	Solução comercial clorexidina	<i>S. marcescens</i>	Nov a Dez 2014	8	Sangue	1 óbito
Song et al, 2018	- Solução clorexidina gluconato 0,5% - Algodão com clorexidina 0,5%	<i>S. marcescens</i>	Nov 2014 a Dez 2015	25	Sangue	Nenhum óbito
Fernández et al, 2020	Solução comercial clorexidina 2%	<i>S. marcescens</i>	Nov a Dez 2014	10	Infecção ferida cirúrgica	1 óbito
Saalfeld et al, 2020	Frascos solução bucal de clorexidina	<i>B. cepacia</i>	Ago a Nov 2016	11	Aspirado Endotraqueal	6 óbitos
Wong et al 2020	Solução aquosa clorexidina	<i>B. cepacia</i>	Set 2019	4	Cateter diálise, saída do cateter de diálise peritoneal	ND

ND, não disponível; CVC, Cateter Venoso Central; NR, não relacionado

Além do conhecimento fenotípico da resistência dos microrganismos, um ponto importante a ser considerado é a utilização de ferramentas moleculares que auxiliem a definir a relação genética dos microrganismos associados ao surto. Embora existam diferentes métodos que permitem a tipagem molecular de bactérias, o método de Eletroforese em Campo Pulsado, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), é considerado um método importante, pois permite a verificação das diferenças dos isolados e é considerado como padrão ouro em investigações de surto (SALIPANTE et al, 2015).

Em 1998, Vu-Thien e colaboradores analisaram 12 isolados de *A. xylosoxidans*, sendo 6 de amostras clínicas (cultura de ferida, sangue e escarro) e 6 isolados de almotolias contendo clorexidina diluída na UTI de queimados, em um hospital da França. A análise de PFGE evidenciou clonalidade entre as amostras dos pacientes e as amostras das almotolias com clorexidina e concluíram que a contaminação dos pacientes estava relacionada ao manuseio da clorexidina, porém os autores não avaliaram as mãos dos profissionais de saúde. Um outro estudo publicado por Heo e colaboradores em 2008, avaliou o perfil clonal, também por PFGE de isolados de *B. stabilis* em um surto ocorrido em uma unidade para pacientes com doenças hematológicas (Cancer Center) na Coreia. A análise molecular evidenciou que os 8 isolados das amostras dos pacientes e 3 isolados de frascos contendo clorexidina a 0,5% eram clonais pela técnica de PFGE. A CCIH do hospital solicitou a substituição dos frascos de clorexidina e realizou treinamento dos profissionais de saúde. Lee e colaboradores em 2013, investigaram um surto de *B. cenocapacia* em um hospital secundário na Coreia. Foram analisados 8 isolados de amostras clínicas e 12 isolados da solução de clorexidina, preparada no próprio hospital. O PFGE evidenciou 19 isolados clonais e 1 não relacionado ao surto. Os autores concluíram então que o surto estava associado a contaminação da clorexidina utilizada nas enfermarias e UTIs do hospital. O surto terminou após intervenção da CCIH do hospital que realizou treinamento dos profissionais de saúde e melhorias no processo de preparação do antisséptico.

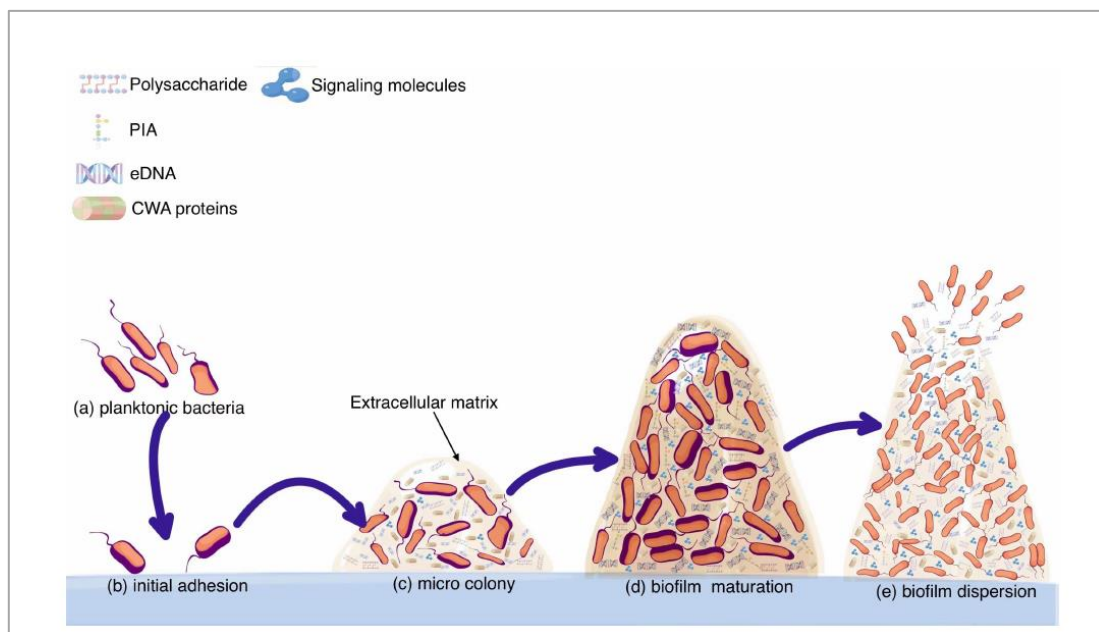
O aumento do uso de biocidas em diferentes aplicações, bem como a sua liberação em ecossistemas, levou a uma discussão sobre os efeitos na saúde humana e como isso pode impactar a seleção para resistência em microrganismos clinicamente relevantes. Uma possível explicação para a sobrevivência desses microrganismos em soluções antissépticas é a presença de biofilme, pois essas estruturas proporcionam um ambiente

protetor, principalmente para bactérias patogênicas e permitem que as bactérias sobrevivam em diferentes ambientes, adquirindo mecanismos para se tornarem resistentes a antibióticos e biocidas (EBRAHIMI et al 2014, HEMATI et al, 2019).

#### **1.4 Biofilmes bacterianos**

Os biofilmes são agregados microbianos inseridos em uma matriz extracelular, composta principalmente de polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que se formam em superfícies bióticas e abióticas. A organização em biofilme protege os microrganismos de diversos fatores externos incluindo o tratamento com antimicrobianos (NEOPANE et al, 2018).

A formação do biofilme é um processo complexo e dinâmico que acontece em diferentes estágios incluindo: adesão, multiplicação, maturação e dispersão (Figura 3). O processo inicia-se após o contato das células planctônicas com a superfície, onde as bactérias fixam-se ao substrato através de diversas moléculas presentes na superfície celular, como proteínas de adesão e flagelos. Após a fixação, a adesão irreversível coincide com uma redução nas taxas de reversão dos flagelos, uma redução na expressão gênica dos flagelos e na produção de componentes da matriz exopolissacarídea do biofilme. O estágio de multiplicação é caracterizado pelo aparecimento de aglomerados com várias células embutidas na matriz do biofilme, que posteriormente amadurecem completamente formando uma estrutura complexa em formato de torre. Finalmente, a dispersão é quando ocorre o destacamento de células e fragmentos do biofilme através da degradação das ligações e dos componentes da matriz. Esse fenômeno permite a disseminação de células que podem reiniciar o processo em outros sítios, causando infecções sistêmicas. Vale ressaltar que as células dispersas demonstram maior suscetibilidade à droga em relação às células do biofilme (SAUER et al, 2022).



**Figura 3:** Representação dos estágios da formação de biofilme bacteriano. Adaptado de Ma et al, 2022.

De forma global, infecções associadas ao biofilme são mais prevalentes nos ambientes hospitalares devido à dificuldade de tratamento. Além disso, estudos têm demonstrado que os biofilmes podem ser responsáveis por mais de 65% das infecções hospitalares, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes, além de gerar altos custos e aumentar a permanência dos pacientes nas unidades hospitalares (ASEFFA et al, 2022).

Biofilmes bacterianos em hospitais podem ser formados nas águas residuais hospitalares, superfícies sólidas de alto toque, sobras de medicamentos e instrumentos médicos, causando infecções como pneumonia associada ao ventilador (PAV), infecções de sítio cirúrgico (ISC), infecções do trato urinário associadas a cateter (ITU) e infecções da corrente sanguínea (ICS). Os principais microrganismos envolvidos em infecções por biofilme são *S. aureus* resistente à metilina (MRSA), *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Enterococcus* resistentes a Vancomicina (ERV), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae* (KHATOON et al, 2018; BHATTA et al, 2018).

Como dito, biofilmes bacterianos são um grande problema para a prática clínica, pois contribuem para a resistência devido a alguns fatores como: dificuldade de entrada do antibiótico na matriz do biofilme, alta densidade celular, alteração metabólica das bactérias, presença de células persistentes e troca de genes de resistência entre bactérias. Adicionalmente, alguns estudos já descreveram que a expressão bombas de efluxo têm

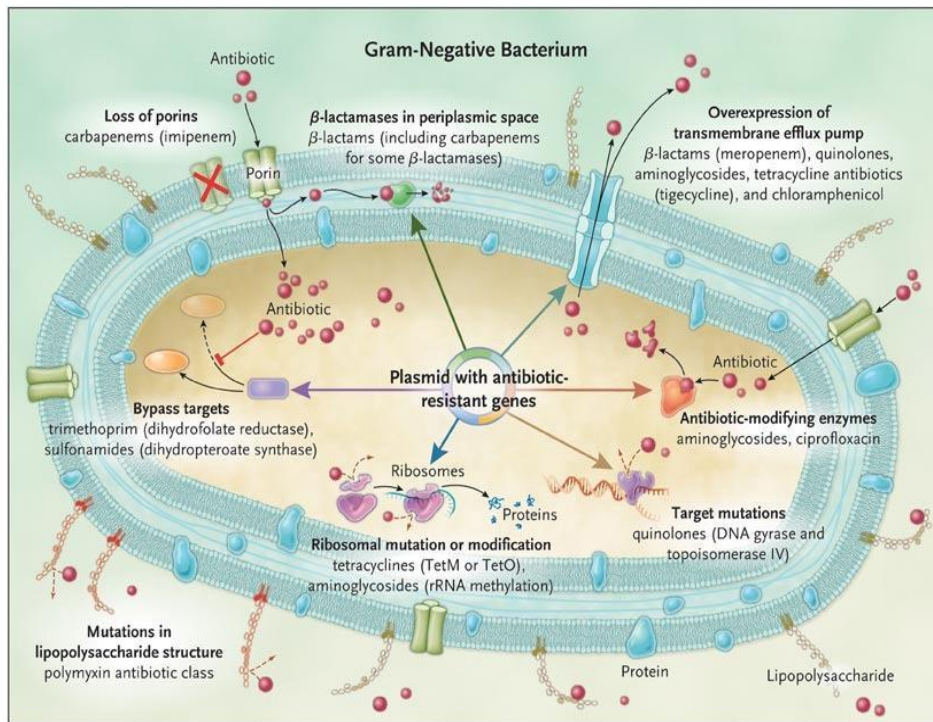
sido associadas como importantes na resistência intrínseca a antibióticos, virulência e formação de biofilme de diferentes microrganismos como *E. coli*, *P. putida*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (BAUGH et al, 2014; ASSEFA et al, 2022, ZIMMERMANN et al, 2019).

### **1.5 Mecanismos de Resistência a Clorexidina**

A membrana externa dos microrganismos gram negativos atua como uma barreira que impede a entrada de alguns agentes antimicrobianos, tornando os microrganismos menos susceptíveis a esses agentes. Microrganismos como *B. cepacia*, *Proteus spp* e *P. stuartii* são descritos por apresentarem um alto nível de resistência aos antissépticos e desinfetantes. Além disso, isolados de *P. aeruginosa* são descritos como microrganismos menos sensíveis a clorexidina pois possuem uma diferença na composição do Lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa quando comparados com outros microrganismos gram negativos (McDONNELL et al, 1999).

Os principais mecanismos de resistência das bactérias aos antimicrobianos e biocidas descritos são: Alteração da permeabilidade da parede celular, alteração de sítio de ligação (sítio alvo), modificação enzimática para inativação do antimicrobiano e expressão aumentada de bombas de efluxo ou pela aquisição de elementos genéticos móveis como plasmídeos ou transposons (SHARMA et al, 2019). (Figura 4).





**Figura 4:** Principais mecanismos envolvidos na resistência aos antimicrobianos e antissépticos em microrganismos Gram-negativos. Adaptado de Peleg et al, 2010.

Mecanismos de efluxo são considerados a primeira linha de defesa para bactérias contra antimicrobianos, pois realizam a expulsão de um substrato para fora de uma célula bacteriana e podem ser codificados cromossomicamente ou em um plasmídeo (ZIMMERMANN et al, 2019). Atividade de bombas de efluxo, principalmente entre as Enterobactérias, é um dos mecanismos mais importantes na resistência antimicrobiana. Foram descritas por Ley e McMurry na década de 1970 e estão envolvidas na extrusão de substratos do interior celular para o ambiente externo. Diferentes mecanismos de efluxo estão relacionados à diminuição da CIM para clorexidina (Quadro 5). Destacam-se as famílias: Resistance-Nodulation-Division (RND), Major Facilitator Superfamily (MFS), Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE) e Cation Diffusion Facilitator (CDF) (SLIPSKI et al, 2018; Alav et al 2021; SPENGLER et al 2017 e WAND et al, 2019)

**Quadro 5:** Mecanismos de efluxo descritos como relacionados a diminuição da CIM para clorexidina.

Bomba de efluxo	Genes	Microrganismo
Resistance-Nodulation-Division (RND)	<i>adeABC</i>	<i>A. baumannii</i>
	<i>mexCD-oprJ</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>sdeXY</i>	<i>S. marcescens</i>
Major Facilitator Superfamily (MFS)	<i>smvAR</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux (PACE)	<i>aceI</i>	<i>A. baumannii</i>
Cation Diffusion Facilitator (CDF)	<i>cepA</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Small Multidrug Resistance (SMR)	<i>qacE, qacEΔ</i>	<i>K. pneumoniae, A. baumannii</i>

Mecanismos de efluxo pertencentes a família RND são encontrados exclusivamente em bactérias gram negativas e são formados por um sistema tripartido que abrange a membrana interna e externa dos microrganismos permitindo o transporte de compostos através de ambas as membranas. Esse processo utiliza energia do potencial eletroquímico conhecido como força próton-motriz. Estão incluídos nessa família os sistemas *AdeABC* em *A. baumannii*, *MexCD-OprJ* em *P. aeruginosa* e *SdeXY-HasF* em *S. marcescens* (BLAIR et al, 2014; ALAV et al 2021).

Outro mecanismo de efluxo que utiliza a força próton-motriz como fonte de energia são os pertencentes a família *Major Facilitator Superfamily* (MFS) que atuam como bombas de efluxo para diminuir as concentrações intracelulares de múltiplos substratos tóxicos e conferir resistência a múltiplos antimicrobianos. (SRINIVASAN et al, 2014). Como exemplo, as bombas de efluxo *SmvA* e seu regulador *SmvR* são descritos como um dos responsáveis pela diminuição da sensibilidade a clorexidina em isolados de *K. pneumoniae* (SLIPSKI et al, 2018; WAND et al, 2019).

O mecanismo de efluxo da família *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) é descrito como uma bomba específica para clorexidina em isolados de *A. baumannii*. A proteína transportadora, *AceI* (proteína de efluxo de clorexidina em *Acinetobacter* I), e seu regulador *AceR*, foi identificado durante um estudo transcriptômico (BOLLA et al, 2020). Funcionam como um fármaco ativo secundário, e usam a força motriz do próton (H<sup>+</sup>) para expulsar compostos nocivos como biocidas e desinfetantes para fora da célula bacteriana, além disso seu tamanho é comparável aos da família SMR com 150 aminoácidos de comprimento (SPRENGLER et al, 2017).

Facilitadores de difusão de cátions, do inglês, *Cation Diffusion Facilitator* (CDF) representam um sistema que confere tolerância/resistência pelo efluxo de zinco e íons de metais pesados. São encontrados com mais frequência em isolados de *K. pneumoniae* através da proteína de efluxo para clorexidina A (CepA) e, recebem também o nome de *Ferrous iron efflux protein F* (FieF) (SLIPSKI et al, 2018).

Os genes da bomba de efluxo da família *Small multidrug Resistance* (SMR), anotados como *qac*, possuem esse nome devido a sua capacidade de conferir resistência aos antissépticos compostos de amônio quaternário (QAC) e tornaram-se importantes por estarem relacionados à tolerância das bactérias aos antissépticos. São adquiridos por meio de determinantes genéticos como plasmídeos e integrons sendo importantes mecanismos para a transferência de material genético entre microrganismos. Em gram negativos, especialmente nas famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae, os genes *qacE* e sua variante *qacEΔ1* são amplamente encontrados. São proteínas pequenas (100 a 120 aminoácidos) que atravessam a membrana plasmática e atuam como antiportadores de drogas H<sup>+</sup> (VIJAYKUMAR et al, 2018; SLIPSKI et al, 2021).

Mecanismos de efluxo que utilizam força próton motriz para direcionar substratos, exceto os da família *ATP-binding cassette* (ABC) que utiliza hidrólise de ATP, são importantes mecanismos, pois removem compostos tóxicos do interior das células bacterianas, contribuindo de forma ativa na resistência microbiana. A utilização de um produto capaz de inibir a atividade da bomba de efluxo tem sido descrito como uma abordagem promissora para superar a resistência aos antibióticos (SPENGLER et al, 2017).

## **1.6 Inibidores de bomba de efluxo**

Bombas de efluxo formam um determinante importante para a resistência aos medicamentos. Por outro lado, o desenvolvimento de inibidores da bomba de efluxo, sozinho ou em combinação, tornam-se uma ferramenta decisiva para avaliação da sensibilidade *in vitro* de cepas resistentes, pois bloqueiam o transporte de antimicrobianos para fora da célula (SPENGLER et al, 2017).

Como dito, bombas de efluxo têm um papel importante na resistência aos antibióticos e, anular esses determinantes de resistência pode potencializar a atividade dos antimicrobianos. A inibição do efluxo pode acontecer de diferentes maneiras como:

regulando a expressão dos genes da bomba de efluxo interferindo na regulação genética, inibindo a montagem de bombas de efluxo funcionais, bloqueando a bomba de se ligar ao substrato do sítio ativo e colapsando o mecanismo de energia responsável por energizar essas bombas (KONWAR et al, 2021).

Apesar de outros inibidores de bomba de efluxo conhecidos como Phenyl-Arginine beta-naphthylamide (PaβN) e 1- (1-naftilmetil) -piperazina (NMP) serem utilizados, o Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrozona (CCCP) é o inibidor mais amplamente utilizado, pois tem a função de dissipar a força próton motriz, inibindo os transportadores ativos secundários. Devido à sua toxicidade, não tem potencial terapêutico, no entanto, é extensamente utilizado em ensaios de efluxo *in vitro*. O fato de o CCCP tornar as células bacterianas metabolicamente inativas tem gerado um debate sobre o efeito sinérgico que o CCCP mostra com uma gama de antibióticos e se isso é realmente uma consequência da inatividade da bomba de efluxo ou inatividade metabólica das células. Além disso, estudos também relatam que a sinergia entre carbapenêmicos e CCCP era independente da atividade de inibição de efluxo (SUN et al, 2014, KOBYLKA et al, 2021, SEKYERE et al, 2017; SHARMA et al, 2019).

Muitos estudos têm atribuído a tolerância a clorexidina a ação de bombas de efluxo e o uso de inibidores pode ser um dos mecanismos utilizados para resgatar a sensibilidade das bactérias a antimicrobianos e antissépticos, no entanto, na ausência de uma padronização e a falta de testes padronizados para o monitoramento dos isolados, alguns valores de corte epidemiológicos são utilizados para determinar se uma bactéria é sensível ou não a CHG (LESHEM et al, 2022; SHARMA et al, 2019).

### **1.7 Pontos de corte para determinação da Concentração Inibitória Mínima para Clorexidina**

Valores de Corte Epidemiológico (do inglês *Epidemiologic Cutoff Values*) conhecidos como ECV (CLSI) e ECOFF (EUCAST) são medidas que separam populações bacterianas do tipo Selvagem (*Wild type*) sem nenhum mecanismo de resistência e com sensibilidade à maioria das classes de antimicrobianos de populações com resistência adquirida ou mutacional e com sensibilidade a classes de antimicrobianos (*Non-wild type*) (CLSI, 2018; EUCAST, 2019).

Dados clínicos e epidemiológicos como a distribuição da CIM do organismo contra o antimicrobiano, dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos (PK/PD) e dados

de eficácia clínica (resultados de ensaios clínicos e resultados sobre o uso do antimicrobiano em pacientes) são ferramentas utilizadas para determinação de pontos de corte de antimicrobianos utilizados na prática clínica (ESPINEL-INGROFF et al, 2016).

Muitos desafios são observados para a determinação de um ponto de corte para antissépticos. Apesar de os estudos *in vitro* apresentarem resultados mais sólidos sobre o papel da resistência, a ausência de dados clínicos e epidemiológicos, como os utilizados nos estudos com antimicrobianos, tornam-se uma limitação. Diante do uso expressivo de antissépticos e sem uma definição clara de resistência, Morrissey e colaboradores (2016) realizaram um estudo onde avaliaram 3.327 isolados de relevância clínica contra diferentes biocidas como: Cloreto de benzalcônio (BZC), Triclosan (TRI), Hipoclorito de Sódio (NaOCL), incluindo o Digluconato de clorexidina (CHG) com o intuito de propor um valor de corte que pudesse auxiliar na vigilância da sensibilidade levando em consideração as propriedades microbicidas dos antissépticos.

O Quadro 6 foi adaptado dos estudos de Morrissey e colaboradores (2014) e evidencia o perfil de distribuição das concentrações inibitórias mínimas e concentrações bactericidas mínimas para clorexidina de amostras clínicas de bactérias causadoras de infecção hospitalar.

**Quadro 6:** Distribuição das CIM e CBM (ECOFF), CIM 50 e 90 e CBM50 e 90 para clorexidina. Fonte: Morrissey e colaboradores (2014).

<b>Microrganismo</b>	<b>N</b>	<b>CIM*</b>	<b>CIM50*</b>	<b>CIM90*</b>	<b>CBM*</b>	<b>CBM50*</b>	<b>CBM90*</b>
<i>E. coli</i>	368	64	4	16	>64	8	16
<i>K. pneumoniae</i>	60	64	8	32	64	8	>32
<i>E. faecium</i>	53	32	8	16	64	16	32
<i>E. faecalis</i>	56	64	32	32	64	32	64
<i>S. aureus</i>	1635	9	2	4	>64	4	8

Legenda: CHX, Digluconato de Clorexidina; CIM, Concentração Inibitória Mínima; CBM, Concentração Bactericida Mínima;

\* Valores expressos em µg/mL.

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

A Clorexidina é um antisséptico tópico com ação bactericida contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos usada em grande escala em hospitais para prevenir IRAS, principalmente em pacientes internados em UTI. Alguns estudos já descrevem o aumento da CIM para clorexidina em microrganismos Gram-negativos isolados de diferentes sítios, embora o mecanismo de resistência a CHG não esteja completamente elucidado. Além disso, o biofilme é um importante fator de virulência, que pode contribuir para resistência a clorexidina, pois permite que os microrganismos sobrevivam em condições extremas. Portanto, a resistência a CHG, incluindo o ambiente de biofilme, precisa ser melhor compreendida.

### **3. OBJETIVOS**

---



### **3.1. Objetivo principal**

- Avaliar a tolerância a clorexidina em microrganismos Gram-negativos multirresistentes

### **3.2. Objetivos secundários**

- Avaliar a CIM para clorexidina dos isolados em biofilme e planctônica
- Desenvolver e validar a técnica de disco difusão para determinação *in vitro* de sensibilidade a clorexidina e sua aplicação na rotina laboratorial.
- Caracterizar genética e filogeneticamente microrganismos Gram-negativos multirresistentes com concentração inibitória mínima elevada para clorexidina.

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

#### **4.1. Local do estudo**

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Investigação Médica em Protozoologia, Bacteriologia e Resistência Antimicrobiana (LIM 49). O laboratório faz parte do quadrilátero da saúde e está vinculado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), localizado na cidade de São Paulo. O HCFMUSP é um complexo hospitalar terciário, público, vinculado ao Sistema Único de Saúde (SUS) com aproximadamente 2200 leitos, sete institutos e dois hospitais auxiliares.

#### **4.2 Seleção dos isolados**

Os isolados utilizados neste estudo fazem parte do banco de microrganismos do Laboratório de Investigação Médica (LIM 49).

Foram selecionados um total de 132 isolados de microrganismos Gram-negativos previamente sequenciados pela plataforma Illumina coletados entre 2002 e 2016 em três diferentes unidades hospitalares: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP), Hospital Universitário de Santa Maria localizado na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul e Hospital Universitário de Londrina no Paraná (Quadro 7). Os isolados eram resistentes aos Carbapenêmicos (Imipenem ou Meropenem) e/ou Polimixinas (Colistina) e foram previamente identificados pelo método automatizado Vitek II (Biomérieux – França). Seis isolados Gram-positivos utilizados no teste de biofilme foram coletados entre os anos de 2010 e 2016 em duas diferentes unidades hospitalares: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) e Hospital e Maternidade Santa Joana (HMSJ), ambos localizados na cidade de São Paulo. Posteriormente, a identificação dos isolados foi confirmada posteriormente pela ferramenta *Speciefinder* (Larsen et al, 2014).

**Quadro 7:** Distribuição dos isolados avaliados no estudo.

Microrganismo	Instituição	Ano												Total
		2002	2003	2004	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	
<i>K. pneumoniae</i>	HCFMUSP	-	-	-	-	2	11	12	4	5	12	3	-	64
	HU-Londrina	-	-	-	-	7	4	2	-	-	-	-	-	
	HU-Santa Maria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
<i>S. marcescens</i>	HCFMUSP	-	-	-	2	6	9	6	1	-	-	-	-	24
<i>A. baumannii</i>	HCFMUSP	1	1	3	4	16	2	2	-	-	-	-	-	29
<i>P. aeruginosa</i>	HCFMUSP	-	-	-	-	1	9	1	-	4	1	-	-	16
<i>E. faecium</i>	HCFMUSP	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
<i>S. aureus</i>	HCFMUSP	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>S. aureus</i>	HMSJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2

### 4.3 Testes fenotípicos

#### 4.3.1 Preparo da suspensão bacteriana

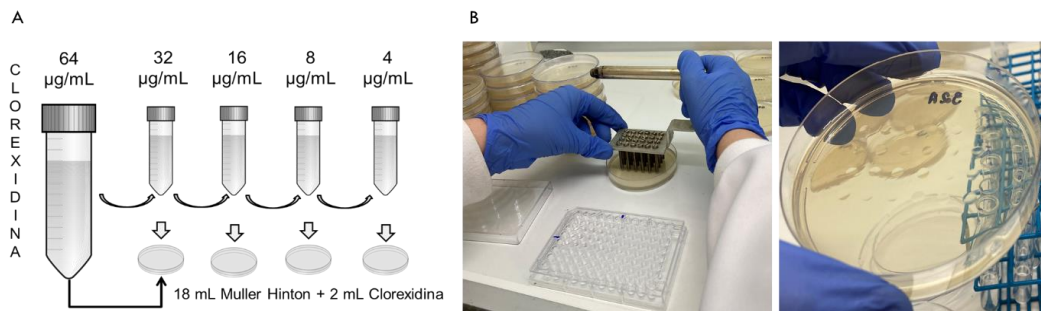
Os microrganismos avaliados estavam armazenados em freezer -80°C em caldo BHI com 20% de glicerol. Posteriormente, os isolados foram semeados em uma placa de MacConkey e incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Para os ensaios fenotípicos uma suspensão bacteriana foi preparada utilizando a escala 0,5 de McFarland que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e sua densidade óptica foi medida por espectrofotômetro conforme preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018.

#### 4.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelos métodos de diluição em ágar e diluição em caldo

Para avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados frente a clorexidina foram utilizados os testes de diluição em ágar (DA), considerado o método mais utilizado para avaliação da Concentração inibitória mínima (CIM) para clorexidina (CHG) e o teste de Diluição em caldo (DC). As concentrações testadas em ambos os métodos foram de 0 a 256 µg/ml. Em todos os experimentos foram incluídos os isolados controles: *K. pneumoniae* ATCC13883 (CIM de CHG 16µg/ml) e *E. coli* ATCC25922 (CIM de CHG 2µg/ml). Cada experimento foi realizado em triplicata e considerado válido quando: Crescimento na placa controle sem CHG; se os resultados dos isolados ATCC variassem no máximo uma diluição, se pelo menos duas CIM obtidas concordantes e a terceira variar em uma diluição e descartados caso os isolados controles tivessem variação >1 diluição (Figura 5) (MENDES et al, 2016, VIJAYAKUMAR et al, 2018).

Diante da ausência de pontos de corte para classificação dos isolados com relação à sensibilidade, consideramos dois cenários para comparação entre os métodos:

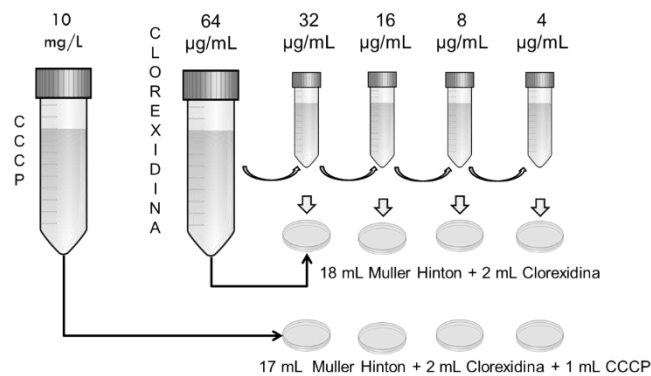
- **Cenário 1:** sensíveis se CIM < 32 µg/mL; resistentes se CIM ≥ 32 µg/mL
- **Cenário 2:** sensíveis se CIM < 64 µg/mL; resistentes se CIM ≥ 64 µg/mL



**Figura 5:** Representação gráfica do preparo das placas com CHG para determinação da CIM pelo método de DA.

### 4.3.3 Avaliação do papel da bomba de efluxo na diminuição da CIM para clorexidina

Para avaliar o papel da bomba de efluxo na CIM da clorexidina, foi realizada a avaliação da CIM em associação ao inibidor da bomba de efluxo Carbonil Cianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) adicionado ao meio de cultura nos testes de DA e DC, em isolados com CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  a uma concentração final de 10 mg/l (MENDES et al, 2016). Uma diminuição de no mínimo 4 diluições na CIM dos isolados é indicativo da presença da bomba de efluxo (Figura 6).



**Figura 6:** Representação do preparo dos meios com clorexidina acrescidos de CCCP para verificação da ação da bomba de efluxo na sensibilidade a CHG.

#### 4.3.4 Padronização do método de disco difusão para avaliação da sensibilidade a clorexidina

O método de disco-difusão (DD) baseia-se na difusão de um antimicrobiano no ágar, impregnando-se um disco de papel-filtro ao redor do qual forma-se um halo de inibição do crescimento bacteriano. Para isso, foram utilizados isolados com diferentes CIM para clorexidina previamente determinadas pelo método de ágar diluição conforme descrito no Quadro 8.

**Quadro 8:** Isolados utilizados para padronização do disco impregnado com CHG.

<b>Microrganismo</b>	<b>Amostra</b>	<b>CIM CHG</b>
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 13883	16
	BM1421	128
	BM4497	8
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	2
<i>S. marcescens</i>	BM1052	16
	BM1756	256
<i>P. aeruginosa</i>	BM1303	32
	BM4447	64
<i>A. baumannii</i>	BM923	32
	BM1099	128

ATCC, American Type Culture Collection; CHG, Clorexidina; BM, Banco de microrganismos

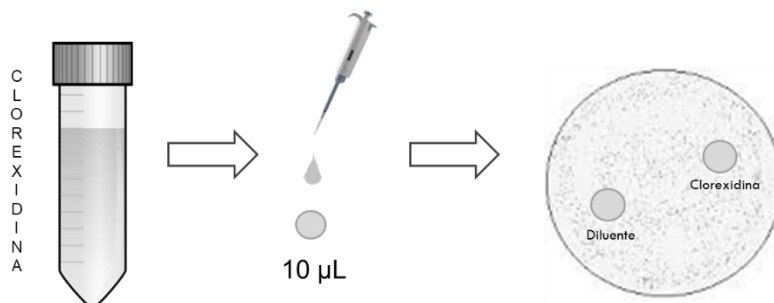
Para a realização dos experimentos, 0,01g de Clorexidina em pó 99,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foi diluído em 400µl de água e 600µl de álcool para atingir uma concentração final de 10.000 µg/mL.

A solução de 10.000 µg/mL foi então utilizada para o preparo dos discos nas concentrações de 5, 10, 25, 50 e 100µg. Para os testes iniciais para determinação da melhor potência dos discos, três diferentes microrganismos (*K. pneumoniae* ATCC13883 e BC1421; *E. coli* ATCC25922 e *S. marcescens* BC1058) com diferentes CIMs para clorexidina foram avaliados.

Para garantir que o resultado do experimento era exclusivamente pela ação da clorexidina e não por interferência do álcool utilizado na solubilização, um disco impregnando somente com o diluente (álcool + água) foi adicionado à placa visando garantir que a formação dos halos nos isolados testados se daria pela presença da clorexidina impregnada no disco e não pelo uso do álcool. Para esse teste foram utilizados os isolados *E. coli* BC5134; *K. pneumoniae* BC986 e *S. marcescens* BC1058 (Figura 7).

Já para as concentrações de 250, 500 e 1000µg foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina 20% em água (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) devido à dificuldade da solubilização do produto em pó nas concentrações mais altas. Para os testes, além dos isolados já utilizados, outros seis isolados, de diferentes espécies foram incluídos, a saber, *K. pneumoniae* BC4497; *S. marcescens* BC1052 e BC1756; *A. baumannii* BC923 e BC1099; *P. aeruginosa* BC1303 e BC4447. Posteriormente, os discos foram impregnados com 10 µl de cada solução.

A leitura foi realizada após incubação de 18-24h para verificação da formação de halo de inibição.



**Figura 7:** Representação do preparo do disco impregnado com CHG para teste de disco difusão.

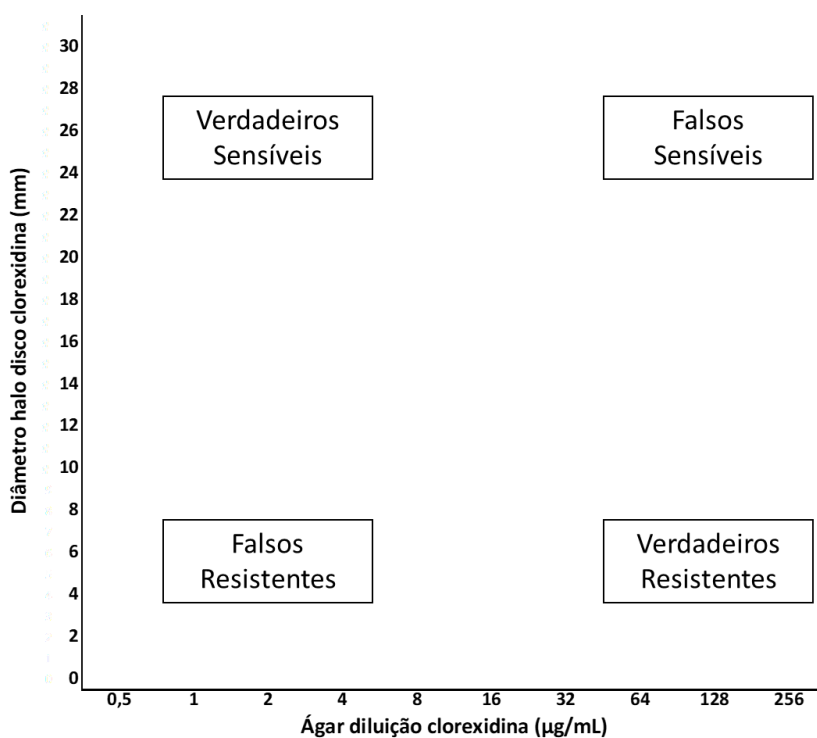
#### 4.3.5 Análise do Desempenho do Disco de Clorexidina

Após a determinação da CIM para a clorexidina e os halos determinados por disco difusão, simulamos dois cenários com dois pontos de corte distintos (32 e 64µg/mL). Assim, foram calculadas as frequências de: (a) Verdadeiros sensíveis: onde a amostra se mostrou de fato sensível pelos métodos testados, (b) Falsos sensíveis: Uma amostra apontada como sensível pelo método de Disco difusão era na realidade resistente por microdiluição, (c) Falsos resistentes: Amostra apontada como resistente pelo método de



Disco difusão era na realidade sensível pelos métodos microdiluição e (d) Verdadeiros resistentes: onde os métodos de microdiluição concordam com relação a sensibilidade à clorexidina. (Figura 8)

Esta plotagem nos ajuda a entender como a variação no ponto de corte por disco difusão (tamanho do halo) reduz a probabilidade de obtermos falsos sensíveis, uma vez que se reduz a probabilidade de uma amostra estar na região (b). Para cada tamanho de halo possível, podemos então determinar a concordância categórica para os dois métodos. Chamamos então de Falso Sensível o percentual de amostras no quadrante (b) comparado ao total de amostras, e Falso Resistente o percentual de amostras no quadrante (c) comparado também ao total de amostra. De acordo com o CLSI, um teste de sensibilidade é considerado adequado quando as taxas de Falso Sensíveis estejam menores que 1,5% e as taxas de Falso Resistentes abaixo de 3% (CLSI, 2018).



**Figura 8:** Critérios utilizados para interpretação de concordância categórica entre os métodos de microdiluição e disco difusão.

#### 4.3.6 Formação e acúmulo de Biofilme

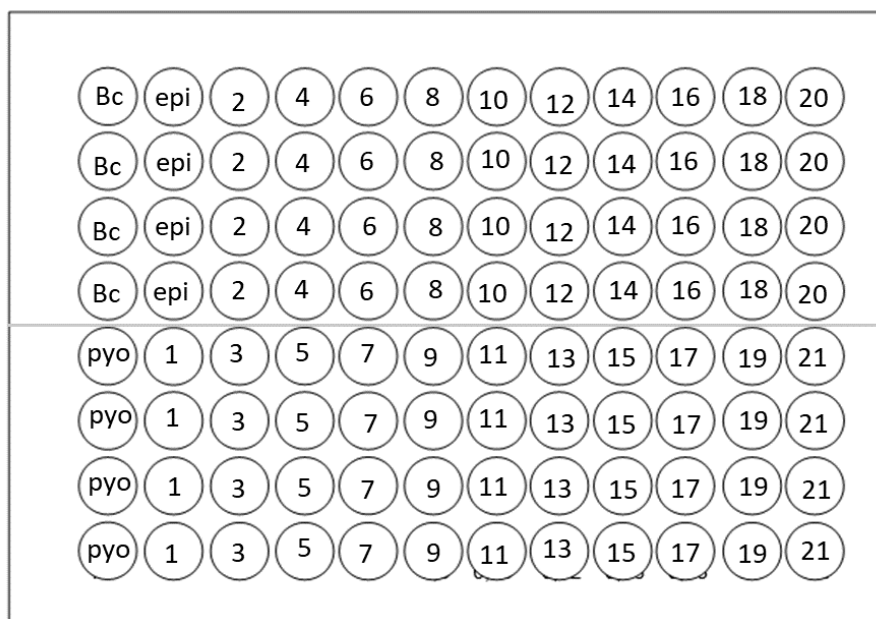
Para avaliar a produção de biofilme, foram incluídos 32 isolados Gram-negativos e 26 isolados Gram-positivos, com diferentes perfis de sensibilidade a CHG, sitio de

isolamento e perfil clonal, utilizando um protocolo adaptado de Stallbaum e colaboradores (2021) e Touzel e colaboradores (2016) (Quadro 9). Após preparo do inóculo bacteriano, cada suspensão foi diluída em caldo MHCA (1:10) e 200 µL foram transferidos para microplacas de 96 poços e incubados por 24h a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas duas vezes com solução salina e colocadas para secar e fixar a 60°C por 30 minutos para fixação do biofilme. Os poços foram corados com 100 µL de Cristal violeta 1% por 10 minutos à temperatura ambiente (Figura 9). Após dupla lavagem e secagem, o biofilme foi dissolvidos em 150 µL de etanol a 95% e quantificado através de leitura a uma absorbância de 570 nm (OD<sub>570nm</sub>) utilizando equipamento MultiScan Go (Thermo Scientific). Os biofilmes foram classificados em não produtores (<0,1), fracos (+, 0,1 – 0,2), moderados (++, 0,2 – 0,4) e fortes (+++; >0,4). *Streptococcus epidermidis* e *Streptococcus pyogenes* foram usados como controles positivos e negativos, respectivamente (STALLBAUM, et al 2021; TOUZEL et al, 2016).

**Quadro 9:** Perfil dos 38 isolados avaliados no teste de produção de Biofilme

<b>Amostra</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Isolamento</b>	<b>ST</b>	<b>CIM CHG*</b>
<b>923</b>	<i>A. baumannii</i>	2011	79	32
<b>1099</b>		2011	79	128
<b>3689</b>		2002	32	64
<b>941</b>		2011	79	32
<b>1132</b>		2012	317	32
<b>370</b>		2003	107	32
<b>1011</b>		2011	836	64
<b>1819</b>		2013	835	32
<b>1759</b>	<i>E. faecium</i>	2013	896	4
<b>1558</b>		2013	987	16
<b>1590</b>		2013	963	16
<b>4497</b>	<i>K. pneumoniae</i>	2016	437	8
<b>1421</b>		2011	437	128
<b>4449</b>		2015	16	128
<b>4486</b>		2016	101	16
<b>4326</b>		2015	11	128
<b>1411</b>		2012	340	32
<b>4993</b>		2016	258	128
<b>2005</b>		2011	234	64
<b>1303</b>	<i>P. aeruginosa</i>	2012	277	32
<b>4447</b>		2015	245	64
<b>4320</b>		2015	446	64
<b>1163</b>		2012	1853	32
<b>1030</b>		2011	380	32
<b>4293</b>		2015	446	64
<b>1410</b>		2012	277	32
<b>4519</b>		2016	277	32
<b>8N</b>	<i>S. aureus</i>	2010	105	8
<b>4704</b>		2016	5	8
<b>4708</b>		2016	1176	16
<b>1052</b>	<i>S. marcescens</i>	2011	-	16
<b>2031</b>		2012	-	128
<b>1058</b>		2010	-	16
<b>1707</b>		2013	-	128
<b>4116</b>		2014	-	32
<b>1299</b>		2012	-	32
<b>1673</b>		2013	-	256
<b>1756</b>		2013	-	256

ST, Sequência tipo; \* Valores de CIM expressos em µg/mL

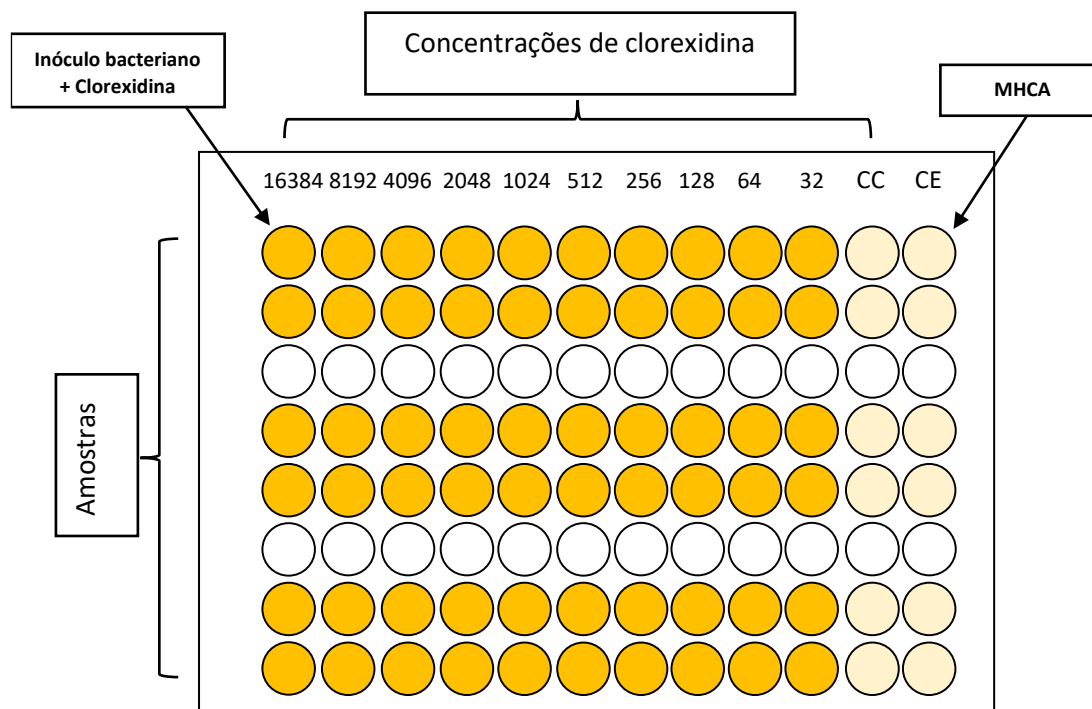


**Figura 9:** Representação do preparo da placa para análise de biofilme. Bc, branco; pyo, *S. pyogenes* (controle negativo); epi, *S. epidermidis* (controle positivo); 1-21, amostras testadas.

#### 4.3.7 Concentrações Mínima de Eliminação de biofilme (CMEBs) utilizando Clorexidina

Os trinta e oito isolados utilizados no teste de biofilme também foram submetidos a determinação da CMEBs utilizando um protocolo adaptado de Napattek e colaboradores (2014). Os biofilmes foram inicialmente formados adicionando 200µL de inóculo bacteriano em meio MHCA em uma placa de 96 poços. Após 24h de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados com solução fisiológica estéril (0,9% NaCl) por três vezes para remoção das células planctônicas. Posteriormente, foram então expostos a solução de clorexidina, previamente preparada, em diferentes concentrações (0,5 – 16.384 µg/mL) e novamente incubados a 37°C por 24h. Após a exposição, os poços foram novamente lavados por três vezes com solução fisiológica para remover todos os resíduos do antisséptico. Após este processo, 200µL de meio MHCA foi adicionado em cada poço e a placa foi novamente incubada a 37°C por 24h (Figura 10). Este processo permite visualizar se as bactérias sobreviveram ao tratamento com o antisséptico crescendo na ausência do mesmo através de uma turbidez detectável. Uma leitura visual foi realizada

e o valor CMEBs foi determinado a partir da concentração mais baixa de antibiótico que impediu o crescimento de bactérias do biofilme tratado (NAPARTEK et al, 2014).



**Figura 10:** Representação do preparo da placa para determinação da CMEB utilizando diferentes concentrações de CHG. MHCA, Mueller Hinton Cation Ajustado; CC, controle de crescimento, CE, controle de esterilidade.

#### 4.4 Sequenciamento e Curadoria dos principais mecanismos de resistência a Clorexidina

Os 132 isolados do estudo foram sequenciados pela tecnologia MiSeq Illumina. O DNA total foi extraído com o kit Qiagen QiAamp DNA mini kit, a qualidade verificada utilizando o espectrofotômetro NanoDrop, a concentração foi avaliada com o fluorômetro Qubit® (Thermo Scientific, Delaware, USA) e a integridade do DNA foi verificada através de um gel de agarose 1,5%.

As bibliotecas foram preparadas utilizando kit comercial Nextera XT Illumina de acordo com as instruções do fabricante e sua qualidade foi avaliada em sistema Tape Station (Agilent) e, segmentos pareados de leitura (*paired and reads*) com mais de 500 pares de bases foram processados na plataforma de sequenciamento do Laboratório de Investigação Médica 15 da Rede Premium de multiusuário USP, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

A qualidade dos arquivos gerados foi avaliada pelos programas FastQC v. 0.11.3 e Trimmomatic v. 0.33. A montagem do genoma *de novo* foi realizada com o uso dos programas VelvetOptimiser v. 2.2.5 e Spades v. 3.13.0. Os contigs formados foram ordenados pelo Abacas v. 1.3.1 (ASSEFA et al. 2009) utilizando cepas referências (*K. pneumoniae*, CP000647.1; *A. baumannii*, CP000521.1; *P. aeruginosa*, AE004091.2 e *S. marcescens*, CP011642.1) adequadas para cada espécie cujos genomas estão disponíveis no site do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Uma curadoria manual foi realizada com o intuito de verificar os mecanismos descritos como responsáveis pelo aumento da CIM para clorexidina como: mutações, deleções e inserções em genes de bombas de efluxo e/ou genes presentes em elementos genéticos móveis. Os genes pesquisados para cada espécie estão descritos no Quadro 10.

Os mecanismos foram buscados utilizando o programa Artemis 16.0.0 (RUTHERFORD et al, 2000) e confirmados pelo programa BLAST2Seq (ALTSCHUL et al 1990). As Sequências Tipo (ST) foram verificadas utilizando o programa MLSTfinder (LARSEN et al 2012). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram analisados utilizando a ferramenta Seaview versão 5.0.4 (GALTIER et al, 1996) onde múltiplos alinhamentos foram recriados utilizando PhyML (BERTELS et al, 2014) considerando bootstrap de 500 replicações para construção das árvores.

**Quadro 10:** Genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina.

<b>Microrganismo</b>	<b>Genes</b>	<b>Referência</b>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>cepA, smvA, smvR, qacE, qacEΔ</i>	Wand et al, 2019
<i>A. baumannii</i>	<i>aceI, aceR, adeA, adeB, adeC, qacE, qacEΔ</i>	Lin et al, 2017
<i>S. marcescens</i>	<i>sdeX, sdeY, qacE, qacEΔ</i>	Maseda et al, 2009
<i>P. aeruginosa</i>	<i>mexC, mexD, oprJ, nfxB, qacE, qacEΔ, cepA</i>	Fraud et al, 2008

#### 4.5 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o teste estatístico de Kappa, proposto por Lamy e colaboradores (2012) e Fleiss (1991) e critérios de interpretação descritos no Quadro 11. Uma análise entre DA e DC também foi realizada para saber se há concordância entre os testes de sensibilidade a clorexidina e o teste de Disco Difusão (DD). A análise de correlação entre os métodos foi realizada através do teste de *Spearman* utilizando o programa GraphPad Prism versão 8.3. Será considerado significativo se  $p < 0,05$ .

**Quadro 11:** Interpretação dos valores de *kappa* para análise de concordância entre métodos.

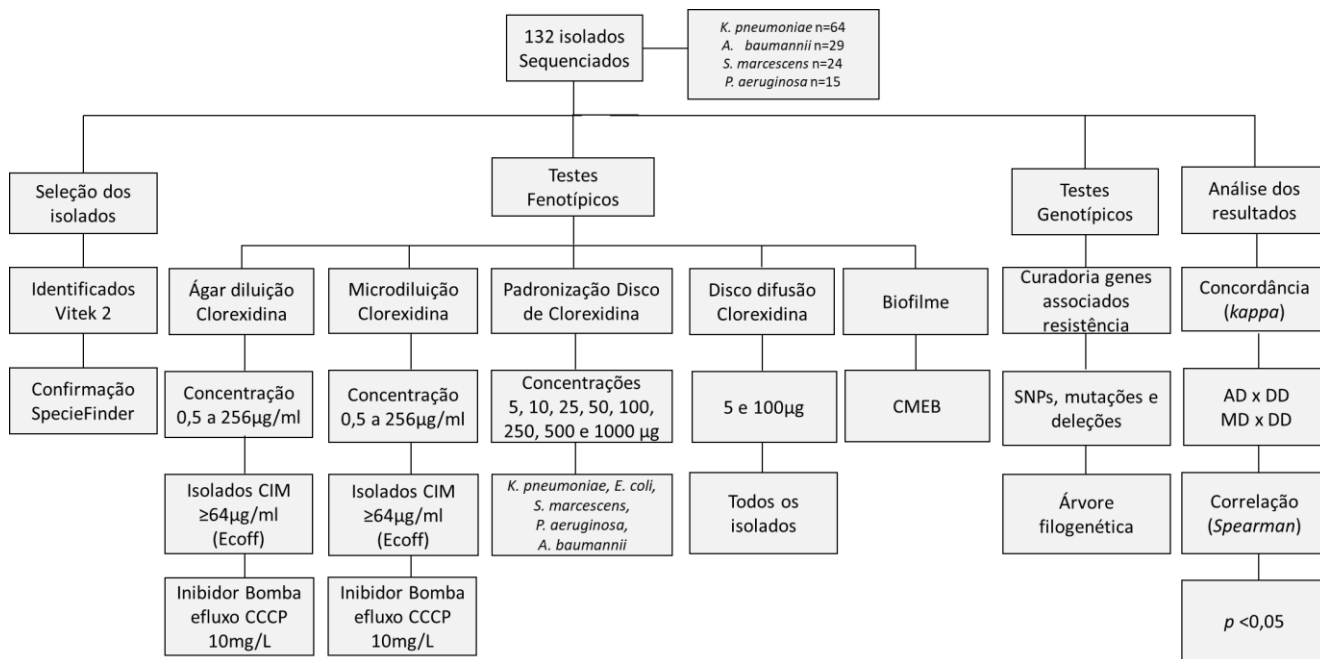
Valor de Kappa	Concordância
<0,40	pobre
0,40 – 0,75	boa
> 0,75	muito boa

#### 4.6 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (Cappesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, tendo como número de aprovação: 214/19.

#### 4.7 Fluxograma de trabalho

A Figura 11 foi elaborada para descrever o fluxo das atividades realizadas durante o estudo.



**Figura 11:** Fluxograma representando as atividades realizadas durante o estudo.



## **5. RESULTADOS**

---

## 5.1 Características fenotípicas dos isolados avaliados no estudo

Em relação às características fenotípicas dos isolados, os 64 isolados de *K. pneumoniae*, 93,7% (60/64) eram resistentes a meropenem e 90,6% (58/64) à polimixinas (colistina). Já entre os 29 isolados de *A. baumannii*, todos eram resistentes ao meropenem e 56,6% (17/29) resistentes à colistina. Entre os 24 isolados de *S. marcescens*, 21 são de amostras clínicas e 3 de amostras ambientais. A resistência ao meropenem foi observada em 79,2% (19/24) dos isolados. Todos os isolados de *P. aeruginosa* eram resistentes ao meropenem e somente 13,3% (2/15) à colistina.

## 5.2 Concentração Inibitória Mínima pelos métodos de diluição em ágar e diluição em caldo

A sensibilidade a clorexidina avaliada pelo método de diluição em ágar identificou que entre as Enterobactérias (*K. pneumoniae* e *S. marcescens*), 67,0% (59/88) tinham diminuição da sensibilidade e entre os Não fermentadores (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*) 18,2% (8/44). Já pelo método de microdiluição em caldo, 19,3% (17/88) entre as Enterobactérias e 6,81% (3/44) dos Não fermentadores apresentaram diminuição da sensibilidade a CHG. As CIM50 e CIM90 dos isolados para as duas metodologias avaliadas estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Distribuição da CIM50 e CIM90 para CHG pelos métodos de DA e DC.

Microrganismo	N	Diluição em ágar			Microdiluição em caldo		
		Intervalo	CIM50*	CIM90*	Intervalo	CIM50*	CIM 90*
<i>K. pneumoniae</i>	64	8 – 128	64	64	4 – 64	16	32
<i>S. marcescens</i>	24	16 – 256	64	256	4 – 256	64	256
<i>A. baumannii</i>	29	32 – 128	32	64	16 – 64	32	32
<i>P. aeruginosa</i>	15	16 – 64	32	64	16 – 32	16	16

Legenda: CIM, Concentração Inibitória Mínima; N, Número de isolados; \* Valores de CIM são expressos em µg/mL

### 5.3 Avaliação da resposta ao inibidor de bomba de efluxo CCCP sobre a CIM para CHG

No método de DA um total de 65 isolados tiveram CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . Desses isolados, 97,5% (39/40) eram *K. pneumoniae*, 100% (17/17) de *S. marcescens* e 100% (5/5) de *A. baumannii* tiveram diminuição de  $\geq 4$  diluições da CIM na presença do CCCP. Nenhum dos isolados de *P. aeruginosa* tiveram diminuição da CIM na presença do CCCP.

No método de microdiluição em caldo 20 isolados tiveram CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  sendo 02 *K. pneumoniae*, 15 *S. marcescens* e 3 *A. baumannii* e todos os isolados tiveram diminuição  $\geq 4$  diluições da CIM com o CCCP. Não foi possível calcular a CIM50 e CIM90 dos isolados de *P. aeruginosa* pelo métodos de DA e dos isolados de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* no método de DC devido ao baixo número de isolados. Não foi realizado o teste com CCCP para *P. aeruginosa* no teste de DC pois nenhum dos isolados tiveram CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . A CIM50 e CIM90 e o intervalo da CIM das duas metodologias estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Distribuição da CIM50 e CIM90 para CHG pelos métodos de DA e DC frente ao inibidor CCCP

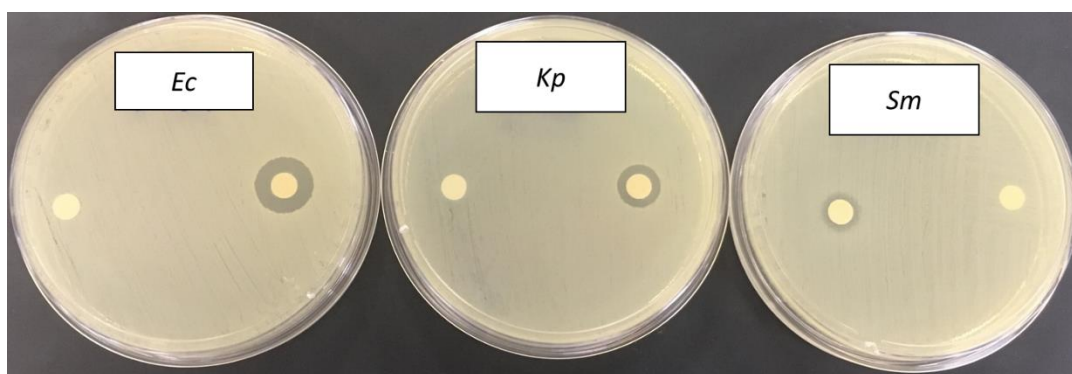
Microrganismo	Diluição em ágar								Microdiluição em caldo							
	Clorexidina				Clorexidina + CCCP				Clorexidina				Clorexidina + CCCP			
	N	Intervalo*	CIM50*	CIM90*	N	Intervalo*	CIM50*	CIM90*	N	Intervalo*	CIM50*	CIM90*	N	Intervalo*	CIM50*	CIM90*
<i>K. pneumoniae</i>	64	8 – 128	64	64	40	1 – 8	2	4	64	4 – 64	16	32	2	<0,5 – 1	NA	NA
<i>S. marcescens</i>	24	16 – 256	64	256	17	<0,5 – 8	2	8	24	4 – 256	64	256	15	<0,5 – 1	<0,5	1
<i>A. baumannii</i>	29	32 – 128	32	64	5	1 – 2	1	2	29	16 – 64	32	32	3	<0,5 – 1	NA	NA
<i>P. aeruginosa</i>	15	16 – 64	32	64	3	8 – 32	NA	NA	15	16 – 32	16	16	-	-	-	-

Legenda: CIM, Concentração Inibitória Mínima; N, Número de isolados; \* Valores de CIM são expressos em µg/mL; NA, Não avaliado.

## 5.4 Resultado da padronização da técnica de disco difusão para Clorexidina

### 5.4.1. Teste de interferência do diluente

O teste de interferência do diluente confirmou que a formação dos halos nos isolados testados deu-se exclusivamente pela presença da clorexidina impregnada no disco e não pelo uso do álcool como diluente. O resultado do teste pode ser visualizado na Figura 12.



**Figura 12:** Teste de interferência do diluente para avaliação da formação de halo de inibição. Ec, *Escherichia coli*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Sm, *Serratia marcescens*.

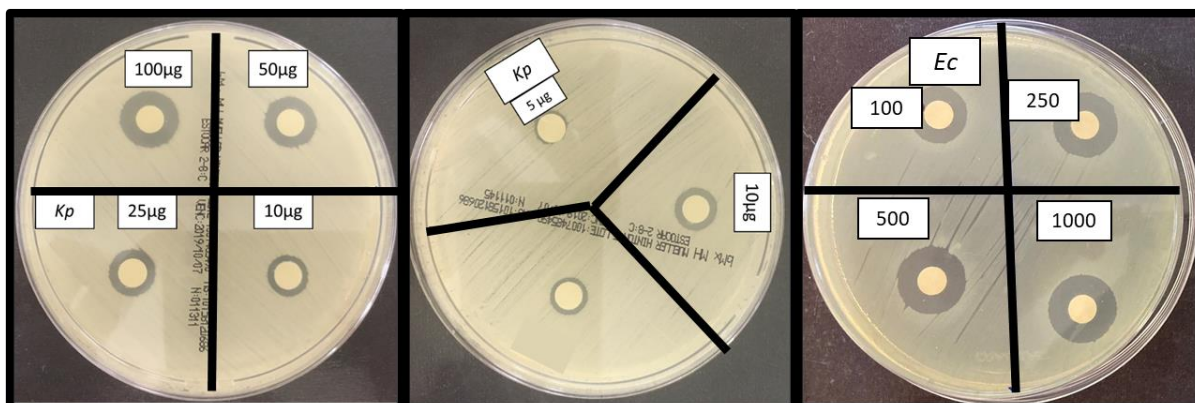
### 5.4.2. Resultados dos testes com discos impregnados com CHG para determinação da melhor concentração do disco

Nos discos preparados com a clorexidina em pó nas concentrações de 5, 10 e 100µg, os isolados ATCC13833, ATCC25922 e BC1052 apresentaram formação de halo e estes isolados tinham CIM mais baixas para CHG. O isolado BC1421, com CIM elevada para CHG, apresentou formação de halo somente na concentração de 100µg. Não houve diferença significativa nos tamanhos de halos dos discos com preparados com a solução de clorexidina 20%, mesmo nas concentrações maiores de 250, 500 e 1000µg. (Tabela 3). A partir dos resultados obtidos e devido a pequena diferença entre os tamanhos dos halos, optamos por usar os discos nas potências de 5 e 100µg e estender os testes então aos demais isolados.

**Tabela 3:** Halos obtidos com discos impregnados com duas diferentes soluções de clorexidina para determinação da melhor concentração utilizada nos testes.

Microorganismo	Amostra	CIM*	Tamanho dos halos (mm)								
			Clorexidina Pó			Clorexidina 20%					
			5	10	100	5	10	100	250	500	1000
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC13883	16	9	10	12	0	9	14	15	16	16
	BC1421	128	0	0	13	0	0	10	12	13	14
	BC4497	8	0	-	17	0	0	14	15	16	16
<i>E. coli</i>	ATCC25922	2	11	12	15	0	10	13	15	16	16
<i>S. marcescens</i>	BC1052	16	0	-	16	0	10	14	15	15	16
	BC1756	256	0	-	11	0	0	10	11	11	12
<i>A. baumannii</i>	BC923	32	0	-	11	0	0	11	13	13	14
	BC1099	128	0	-	0	0	0	10	11	11	13
<i>P. aeruginosa</i>	BC1303	32	0	-	15	0	0	13	15	15	16
	BC4446	64	0	-	14	0	0	10	13	13	14

A Figura 13 ilustra as diferenças obtidas entre as concentrações testadas.



**Figura 13:** Padronização do método de disco difusão para determinação da melhor concentração de CHG usada nos testes.

#### 5.4.3. Halos determinados por disco difusão utilizando discos de 5 µg e 100 µg de CHG

Não houve formação de halo quando os isolados foram expostos ao disco impregnado com 5µg de clorexidina em nenhum dos isolados de *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Quando os isolados foram submetidos ao teste utilizando o disco com 100µg de clorexidina a formação de halo foi observada em todos os isolados (Tabela 4).

**Tabela 4:** Intervalos dos halos obtidos pelo método de disco difusão com 5µg e 100µg de CHG.

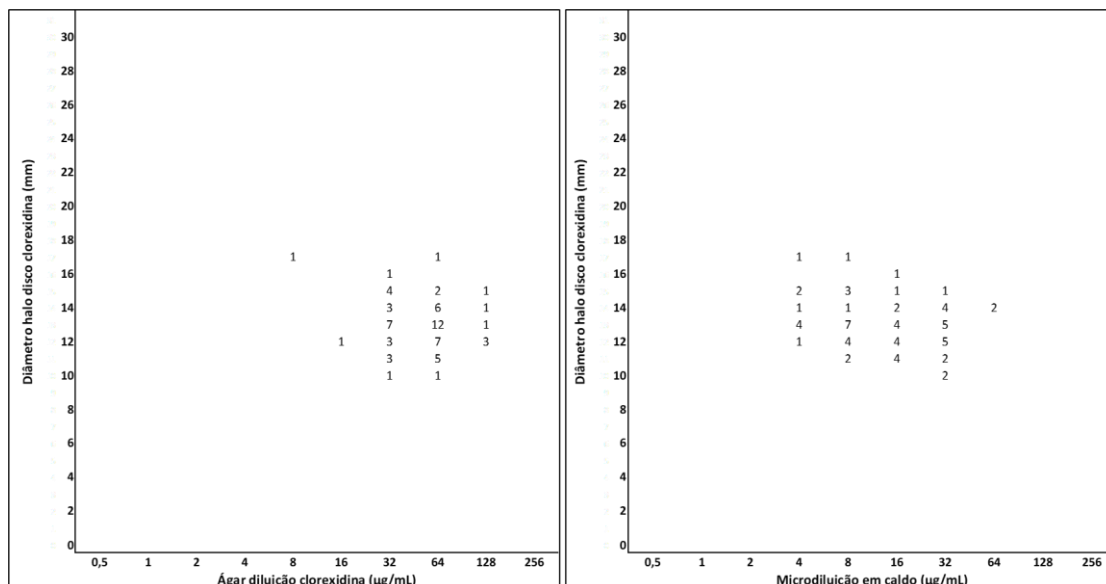
Microrganismo	N	Intervalo disco 5µg	Intervalo disco 100µg
<i>K. pneumoniae</i>	64	0	10 – 17
<i>S. marcescens</i>	24	0	4 – 17
<i>A. baumannii</i>	29	0	11 – 14
<i>P. aeruginosa</i>	15	0	12 – 16

Diante dos resultados obtidos, escolhemos a potência de 100µg de clorexidina para comparação com os métodos de DA e DC.

#### 5.4.4. Halos determinados pelo disco com 100 µg de Clorexidina e comparação com os métodos de DA e DC

##### 5.4.4.1. *K. pneumoniae*

A distribuição dos tamanhos dos halos obtidos em relação à CIM dos isolados contra a clorexidina pelos métodos de DA e DC são observados no escatograma representado da Figura 14.

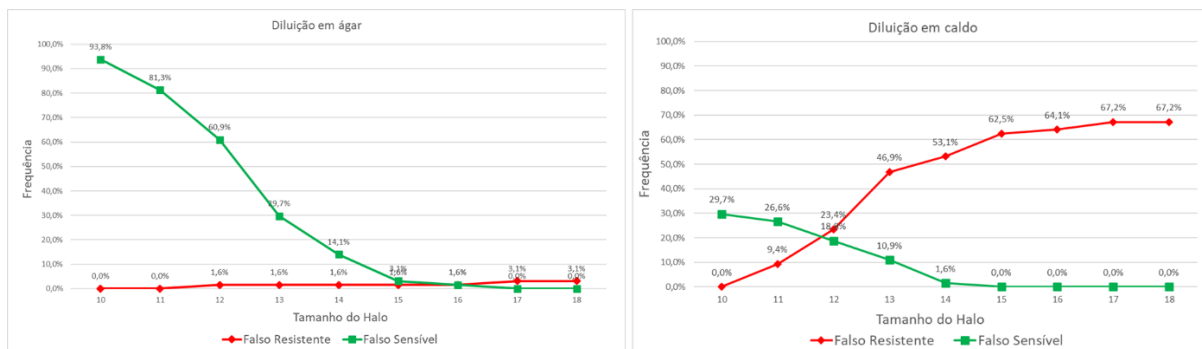


**Figura 14:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *K. pneumoniae*.

#### Cenário 1: Resistência se CIM $\geq 32$ µg/mL

Sob o ponto de corte de resistência à clorexidina definida, se o isolado tiver CIM  $\geq 32$  µg/mL, o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, em *K. pneumoniae*, encontra-se na Figura 15.





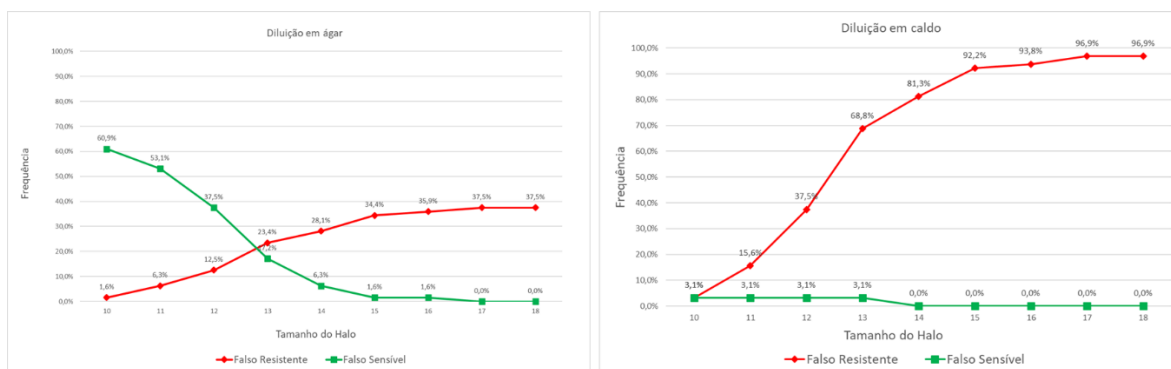
**Figura 15:** Desempenho do disco de clorexidina 100 µg em isolados de *K. pneumoniae*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

Chama a atenção o desempenho do ponto de corte para o método de disco-difusão, o halo de 17mm pelo método de DA. Utilizando tal medida como definidora de “resistência” para essa espécie, esse tamanho de halo se mostrou capaz de detectar isolados com CIM elevada para CHG, pois houve cerca de 3,1% de falsos resistentes e 0% de falsos sensíveis.

Os achados não se aplicam quando utilizamos o método de DC pois, apesar do halo de 17 mm ser o ideal para detectar isolados falsos sensíveis, há uma proporção muito grande na detecção de isolados falsos resistentes, cerca de 62,5%.

**Cenário 2:** Resistência se CIM  $\geq 64$  µg/mL

Para resistência à clorexidina definida para isolados com CIM  $\geq 64$  µg/mL, o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, em *K. pneumoniae*, encontra-se na Figura 16.

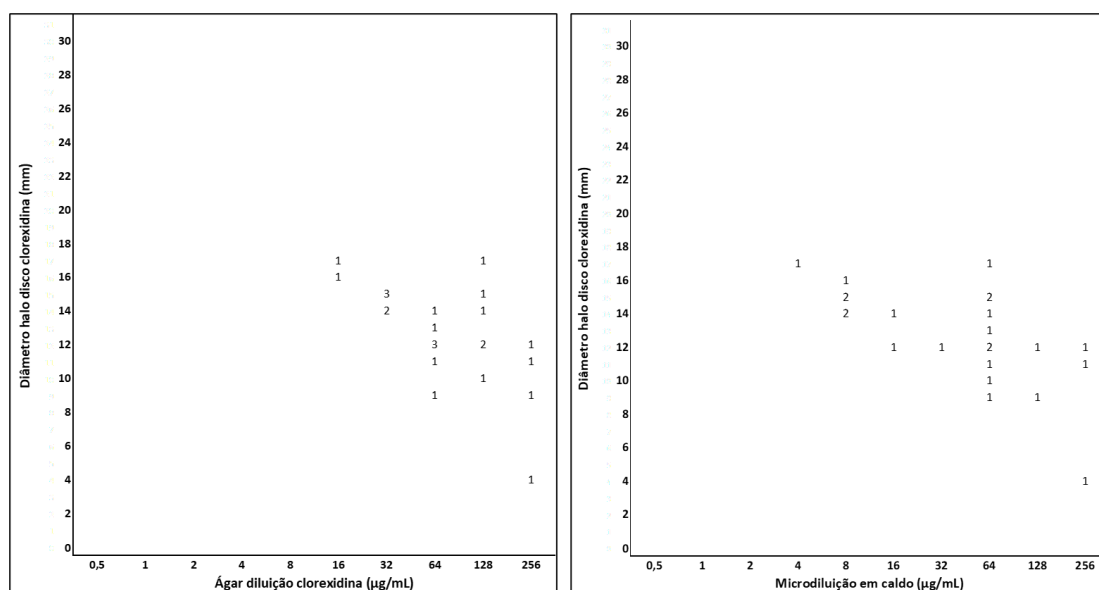


**Figura 16:** Desempenho do disco de clorexidina 100 µg em isolados de *K. pneumoniae*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

Em ambas metodologias analisadas, nenhum tamanho de halo ficou próximo de preencher os critérios de aceitabilidade de teste proposto pelo CLSI. No entanto, a partir do halo de 17mm, a determinação de falsos sensíveis foi estabelecida no método de DA e 14mm no método de DC, porém uma alta taxa de isolados falso resistentes pode ser verificada em ambas metodologias.

#### 5.4.4.2. *S. marcescens*

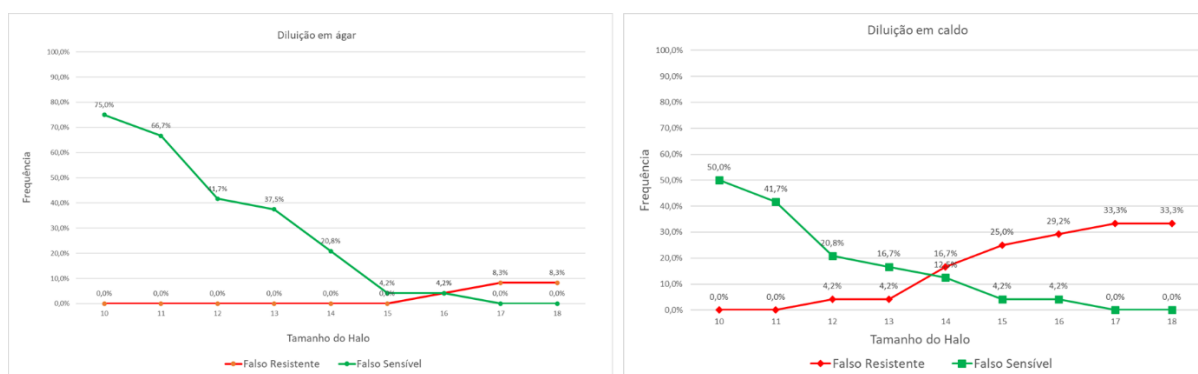
Distribuição dos halos obtidos em relação à CIM dos isolados testados contra a clorexidina pelos métodos de DA e DC representados na Figura 17.



**Figura 17:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *S. marcescens*.

### Cenário 1: Resistência se CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$

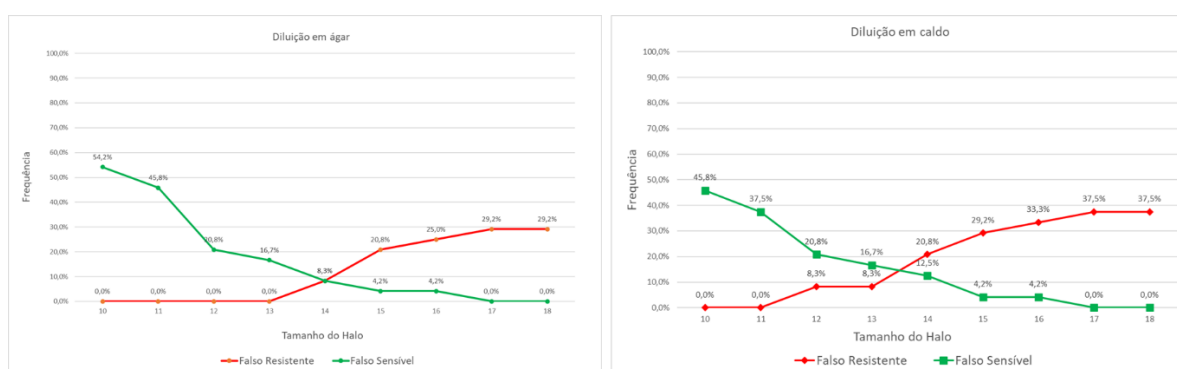
Para resistência à clorexidina definida se isolado tiver CIM  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ , o desempenho do disco, com relação aos erros graves e muito graves, em *S. marcescens*, encontra-se na Figura 18.



**Figura 18:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *S. marcescens*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$

### Cenário 2: Resistência se CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$

Para resistência à clorexidina definida para isolados com CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, em *S. marcescens*, encontra-se na Figura 19.



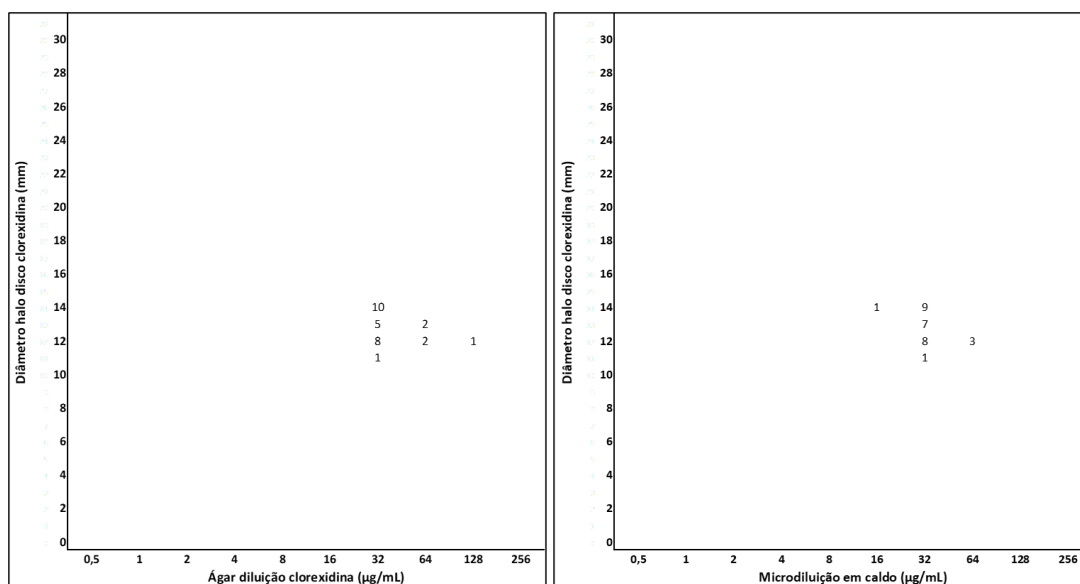
**Figura 19:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *S. marcescens*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ .

O interessante da análise dos isolados de *S. marcescens*, em ambos os cenários e metodologias, é que o halo de 17 mm apresenta melhor desempenho do ponto de corte

para o método de disco-difusão com 0% de isolados falso sensíveis. Entretanto, é observada uma alta taxa de isolados falsos resistentes (33,3% e 37,5%), não preenchendo os critérios de aceitabilidade proposto pelo CLSI (<3%).

#### 5.4.4.3. *A. baumannii*

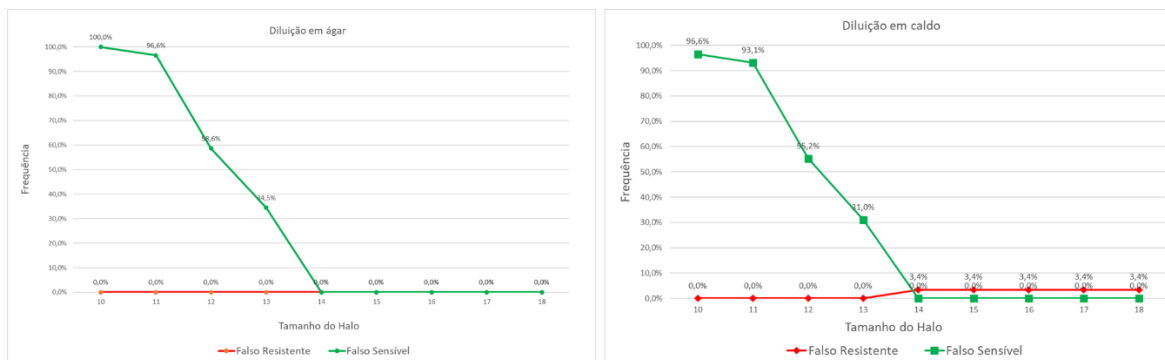
Distribuição dos halos obtidos em relação à CIM dos isolados testados contra a clorexidina pelos métodos de DA e DC representados na Figura 20.



**Figura 20:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *A. baumannii*.

#### **Cenário 1:** Resistência se CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$

Para resistência à clorexidina definida se isolado tiver CIM  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ , o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, em *A. baumannii*, encontra-se na Figura 21.

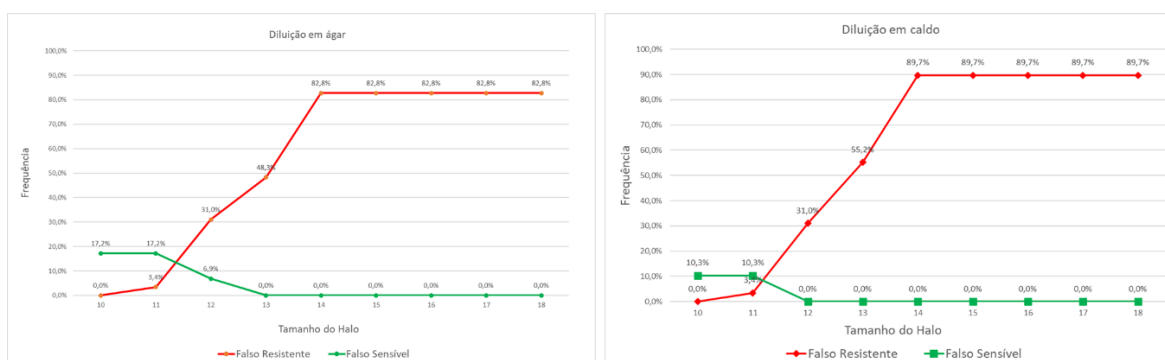


**Figura 21:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *A. baumannii*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ .

É interessante o desempenho do ponto de corte para o método de disco-difusão do halo de 14mm pelo método de DA. O potencial desse halo para ponto de corte se justifica pela ausência de isolados falso sensíveis e falso resistentes, e se mostra capaz de detectar isolados com CIM elevada para clorexidina para essa espécie. Para o teste de DC, o halo de 14mm tem um bom desempenho para diminuir o numero de falsos sensíveis (0%) e o valor de falso resistente de 3,4% fica próximo ao valor aceitável proposto pelo CLSI (<3%).

### Cenário 2: Resistência se CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$

Para resistência à clorexidina definida se isolado tiver CIM  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, encontra-se na Figura 22.

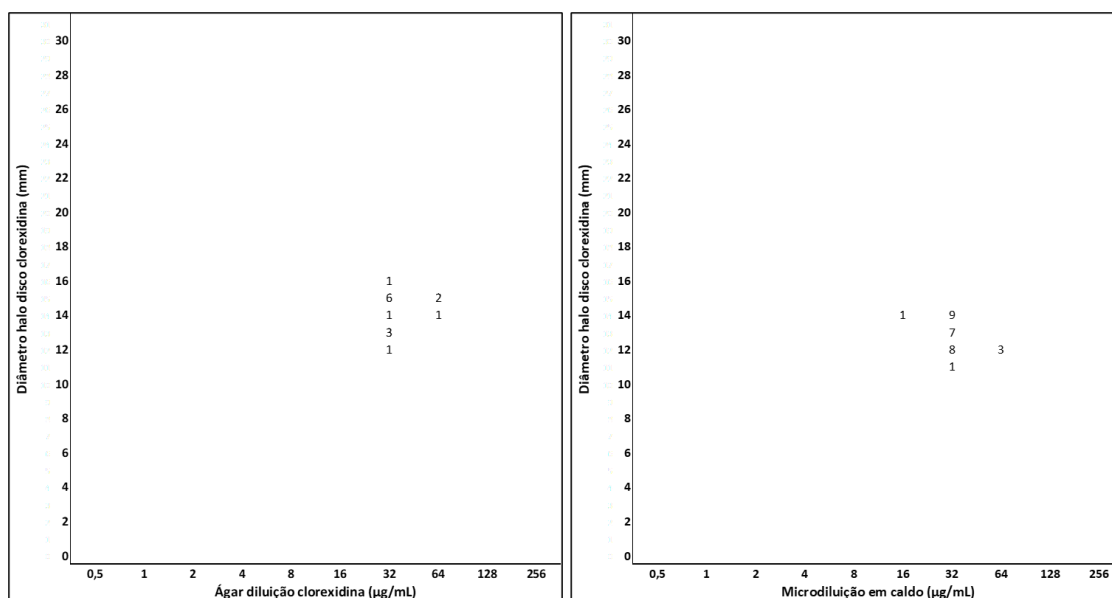


**Figura 22:** Desempenho do disco de clorexidina 100µg em *A. baumannii*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ .

Diante do exposto no cenário 2, não foi possível estabelecer um tamanho de halo que preenchesse os critérios propostos pelo CLSI em nenhuma das metodologias. O halo de 14 mm foi o que melhor preencheu, no método de DA, os critérios com relação ao percentual de erros muito graves (0%), no entanto a taxa de erro grave foi de 48,3%. Já pelo método de DC, o halo de 12mm foi o que teve o melhor desempenho na diminuição de falsos sensíveis, porém a taxa de falsos resistentes, assim como no método DA, uma taxa de 31,0% de erro grave foi observada.

#### 5.4.4.4. *P. aeruginosa*

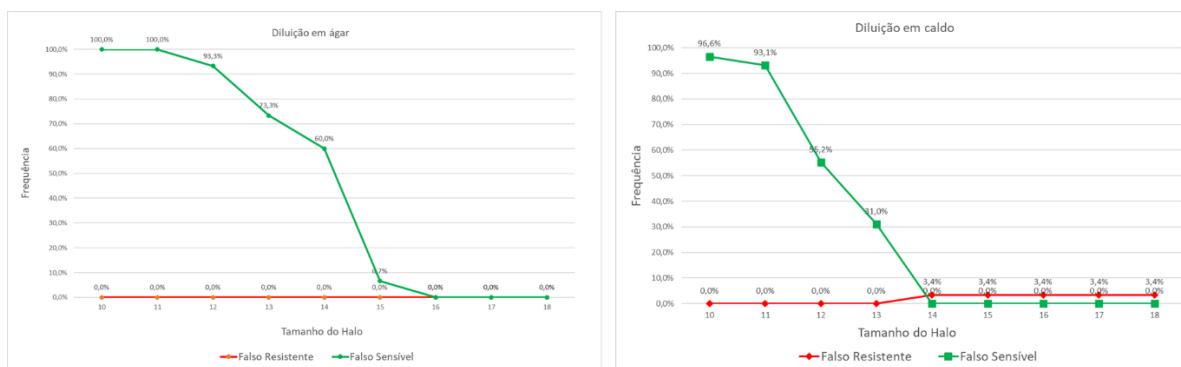
A distribuição dos halos com relação à CIM dos isolados de *P. aeruginosa* testados contra clorexidina estão apresentados na Figura 23.



**Figura 23:** Escatograma representando a distribuição dos halos obtidos em relação a CIM por DA e DC, em isolados de *P. aeruginosa*.

#### Cenário 1: Resistência se CIM $\geq 32 \mu\text{g/mL}$

Para resistência à clorexidina definida se o isolado tiver CIM  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ , o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, encontra-se na Figura 24.

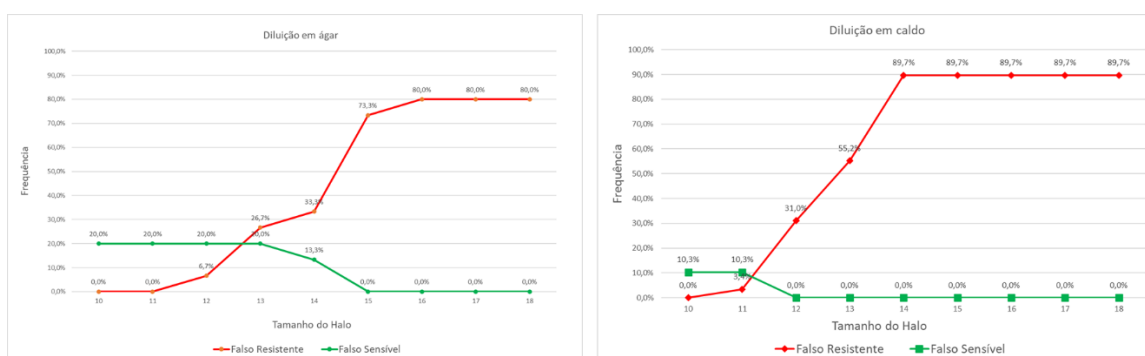


**Figura 24:** Desempenho do disco de cloxacilina 100 µg em *P. aeruginosa*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 32$  µg/mL.

Se utilizarmos a concentração  $\geq 32$  µg/mL para definir um padrão de resistência para os isolados de *P. aeruginosa*, o halo de 16mm é o que apresenta o melhor desempenho na determinação de falso sensíveis e falsos resistentes pelo método de DA. No método de DC, o halo de 14mm apresentou o melhor resultado para eliminar isolados falso sensíveis e, para falsos resistentes o valor de 3,4% ficou muito próximo do critério estabelecido pelo CLSI .

### Cenário 2: Resistência se CIM $\geq 64$ µg/mL

Para resistência à CHG definida, se isolado tiver CIM  $\geq 64$  µg/mL, o desempenho do disco, com relação a erros graves e muito graves, encontra-se na Figura 25.



**Figura 25:** Desempenho do disco de cloxacilina 100µg em *P. aeruginosa*, sob ponto de corte de resistência se  $\geq 64$  µg/mL.

Diferente do que ocorreu no cenário 1, no método de DA, as taxas de falso sensíveis possuem melhor desempenho no halo de 15mm, entretanto uma alta taxa de erro

grave de 73.3% é observada. Resultado similar é observado no método de DC onde, o halo de 12 mm é o que apresenta melhor redução nas taxas de falso sensíveis, porém com uma taxa de falso resistente de 31% não se encaixando nos critérios estabelecidos pelo CLSI.

### 5.5 Análise de concordância entre os métodos de DD x DA e DD x DC

O teste de coeficiente de *Kappa* foi utilizado para medir o grau de concordância entre o método de DD e os métodos de DA e DC.

Como não há descrição de ponto de corte para disco difusão, diferentes hipóteses para cada cenário foram testadas considerando os tamanhos dos halos observados no teste de DD com 100µg de CHG.

#### **Cenário 1:** Resistência se CIM $\geq 32$ µg/mL

No método de diluição em ágar, neste cenário, entre os isolados de *K. pneumoniae*, uma concordância boa ( $k = 0,48$ ) foi observada no halo de 16mm e pode ser um bom determinador de sensibilidade a CHG para essa espécie, pois apresenta uma taxa de Falso sensíveis e Falso resistentes dentro dos critérios de aceitabilidade propostos pelo CLSI.

Entre os isolados de *S. marcescens*, ainda no método de diluição em ágar, uma concordância muito boa ( $k = 0,78$ ) pode ser visualizada no halo de 15mm e uma concordância boa ( $k = 0,45$ ) foi verificada no halo de 16mm. No método de diluição em caldo, os halos de 12 mm ( $k = 0,50$ ) e 13 mm ( $k = 0,57$ ) foram os que apresentaram o melhor resultado, com uma concordância boa. Devido ao baixo número de amostras, não foi possível utilizar os tamanhos de halos obtidos como determinadores de resistência, pois a presença de ao menos uma única amostra no campo Falso sensível eleva a taxa de erro deste parâmetro.

Os isolados de *K. pneumoniae* no método de diluição em caldo e *A. baumannii* e *P. aeruginosa* em ambos os métodos analisados mostraram nenhuma ou uma concordância pobre e, devido ao baixo número de isolados não foi possível estabelecer um resultado confiável para essa análise. (Tabela 5)



**Tabela 5** Análise de concordância entre disco difusão e ágar diluição sob ponto de corte se resistência  $\geq 32 \mu\text{g/mL}$  pelo teste de kappa.

		Tamanho do halo																	
		Diluição em ágar									Diluição em caldo								
Isolado	Concordância	10	11	12	13	14	15	16	17	18	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>K. pneumoniae</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	3,1	3,1	0,0	9,4	23,4	46,9	53,1	62,5	64,1	67,2	67,2
	Falso S (%)	93,8	81,3	60,9	29,7	14,1	3,1	1,6	0,0	0,0	29,7	26,6	18,8	10,9	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,00	0,01	-0,01	0,04	0,12	0,38	0,48	0,00	0,00	0,12	0,06	0,08	-0,02	0,12	0,05	0,03	0,00	0,00
<i>S. marcescens</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	8,3	8,3	0,0	0,0	4,2	4,2	16,7	25,0	29,2	33,3	33,3
	Falso S (%)	75,0	66,7	41,7	37,5	20,8	4,2	4,2	0,0	0,0	50,0	41,7	20,8	16,7	12,5	4,2	4,2	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,04	0,06	0,17	0,19	0,36	0,78	0,45	0,00	0,00	0,18	0,29	0,50	0,57	0,32	0,22	0,08	0,00	0,00
<i>A. baumannii</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
	Falso S (%)	100,0	96,6	58,6	34,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,6	93,1	55,2	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	0,05	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	26,7	40,0	86,7	93,3	93,3	93,3
	Falso S (%)	100,0	100,0	93,3	73,3	60,0	6,7	0,0	0,0	0,0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	ND	ND	ND	ND	ND	0,00	0,00	-0,07	-0,12	-0,13	0,01	0,00	0,00	0,00

## **Cenário 2:** Resistência se CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$

Neste cenário, somente os isolados de *S. marcescens* tiveram resultados interessantes de concordância (boa), tanto no método de diluição em ágar quanto no método de diluição em caldo.

No método de diluição em ágar, destacam-se os halos de 12mm ( $k = 0,58$ ), 13mm ( $k = 0,65$ ) e 14mm ( $k = 0,60$ ) e, no método de diluição em caldo, uma concordância boa é visualizada nos halos de 12 mm ( $k = 0,42$ ) e 13 mm ( $k = 0,49$ ). Entretanto, quando analisamos o percentual de falso sensíveis e falso resistentes a concordância não pode ser estabelecida.

Os isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* mostraram nenhuma ou uma concordância pobre entre as duas metodologias utilizadas, não sendo possível estabelecer um resultado confiável para essa análise (Tabela 6).

**Tabela 6:** Análise de concordância entre disco difusão e ágar diluição sob ponto de corte se resistência  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  pelo teste de kappa.

		Tamanho do halo																	
		Diluição em ágar									Diluição em caldo								
Isolado	Concordância	10	11	12	13	14	15	16	17	18	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>K. pneumoniae</i>	Falso R (%)	1,6	6,3	12,5	23,4	28,1	34,4	35,9	37,5	37,5	0,0	9,4	23,4	46,9	53,1	62,5	64,1	67,2	67,2
	Falso S (%)	60,9	53,1	37,5	17,2	6,3	1,6	1,6	0,0	0,0	29,7	26,6	18,8	10,9	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	-0,01	-0,01	0,06	0,10	0,17	0,07	0,02	0,00	0,00	0,12	0,06	0,08	-0,02	0,12	0,05	0,03	0,00	0,00
<i>S. marcescens</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	20,8	25,0	29,2	29,2	0,0	0,0	8,3	8,3	20,8	29,2	33,3	37,5	37,5
	Falso S (%)	54,2	45,8	20,8	16,7	8,3	4,2	4,2	0,0	0,0	45,8	37,5	20,8	16,7	12,5	4,2	4,2	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,15	0,24	0,58	0,65	0,60	0,27	0,11	0,00	0,00	0,21	0,33	0,42	0,49	0,26	0,18	0,05	0,00	0,00
<i>A. baumannii</i>	Falso R (%)	0,0	3,4	31,0	48,3	82,8	82,8	82,8	82,8	82,8	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
	Falso S (%)	17,2	17,2	6,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,6	93,1	55,2	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,00	-0,06	0,14	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>P. aeruginosa</i>	Falso R (%)	0,0	0,0	6,7	26,7	33,3	73,3	80,0	80,0	80,0	0,0	0,0	6,7	26,7	40,0	86,7	93,3	93,3	93,3
	Falso S (%)	20,0	20,0	20,0	20,0	13,3	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	6,7	6,7	6,7	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Kappa</i>	0,00	0,00	-0,11	-0,30	-0,06	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,07	-0,12	-0,13	0,01	0,00	0,00	0,00

## 5.6 Formação e acúmulo de Biofilme

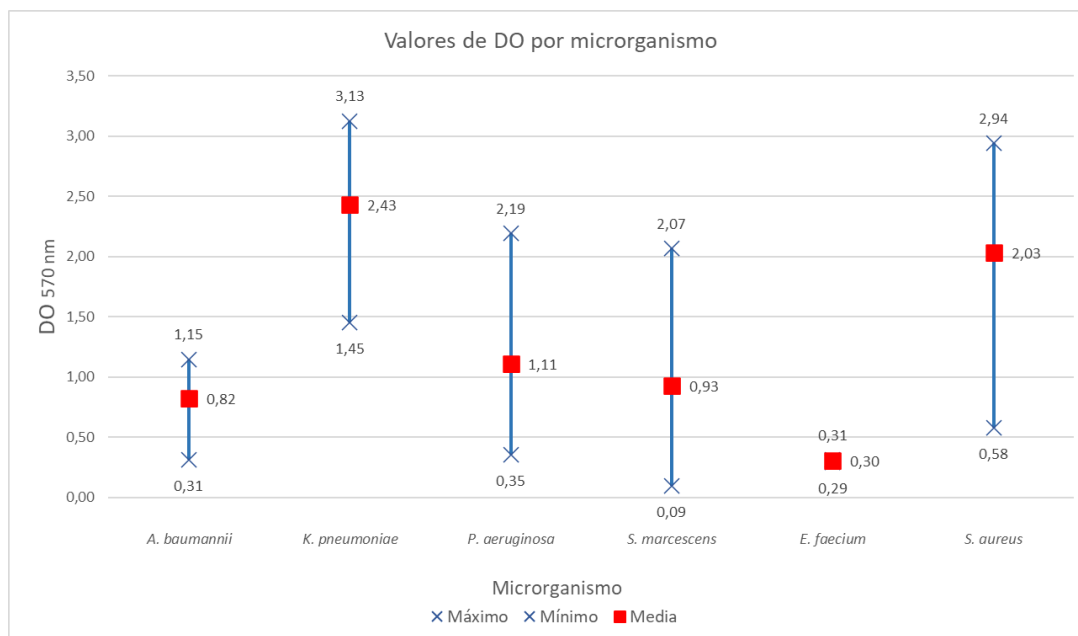
Quanto à produção de biofilme dos microrganismos Gram-negativos, 84,2% (n=32) foram forte produtores (+++), sendo oito isolados de *K. pneumoniae* e 07 *P. aeruginosa*, *S. marcescens* e *A. baumannii*. A produção moderada de biofilme (++) foi observada em 13,2% (n=5) e 01 isolado de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*. Um isolado de *S. marcescens* foi identificado como não produtor de biofilme. Seis isolados Gram-positivos (03 de *E. faecium* e 03 de *S. aureus*) foram incluídos no estudo. Os isolados de *E. faecium* tiveram produção moderada de biofilme (++) e os isolados de *S. aureus* tiveram forte produção de biofilme (+++).

Os resultados mostrados na Tabela 7 evidenciam que não há relação entre a produção de biofilme e a CIM para CHG, uma vez que, tanto os isolados com CIM mais baixas quanto os que tinham CIM mais elevadas para CHG tinham produção de biofilme moderada ou forte.

**Tabela 7:** Resultado da análise da DO para caracterização da produção de biofilme dos isolados

Amostra	Microrganismo	MIC CHG	DO	Interpretação
923	<i>A. baumannii</i>	32	0,31	++
1099	<i>A. baumannii</i>	128	1,10	+++
3689 (AK7)	<i>A. baumannii</i>	64	0,44	+++
941	<i>A. baumannii</i>	32	1,14	+++
1132	<i>A. baumannii</i>	32	0,84	+++
3705 (AK23)	<i>A. baumannii</i>	32	0,95	+++
1011	<i>A. baumannii</i>	64	0,84	+++
1819	<i>A. baumannii</i>	32	0,92	+++
4497	<i>K. pneumoniae</i>	8	1,45	+++
1421	<i>K. pneumoniae</i>	128	1,50	+++
4449	<i>K. pneumoniae</i>	128	2,21	+++
4486	<i>k. pneumoniae</i>	16	2,67	+++
4326	<i>K. pneumoniae</i>	128	3,11	+++
1411	<i>K. pneumoniae</i>	32	3,12	+++
4993	<i>K. pneumoniae</i>	128	2,34	+++
2005	<i>K. pneumoniae</i>	64	2,99	+++
1303	<i>P. aeruginosa</i>	32	1,36	+++
4447	<i>P. aeruginosa</i>	64	1,44	+++
4320	<i>P. aeruginosa</i>	64	0,35	++
1163	<i>P. aeruginosa</i>	32	0,66	+++
1030	<i>P. aeruginosa</i>	32	0,97	+++
4293	<i>P. aeruginosa</i>	64	0,85	+++
1410	<i>P. aeruginosa</i>	32	2,19	+++
4519	<i>P. aeruginosa</i>	32	1,02	+++
1052	<i>S. marcescens</i>	16	1,11	+++
2031	<i>S. marcescens</i>	128	0,09	NBP
1058	<i>S. marcescens</i>	16	0,52	+++
1707	<i>S. marcescens</i>	128	0,43	+++
4116	<i>S. marcescens</i>	32	2,06	+++
1299	<i>S. marcescens</i>	32	1,79	+++
1673	<i>S. marcescens</i>	256	0,50	+++
1756	<i>S. marcescens</i>	256	0,88	+++
8N	<i>S. aureus</i>	8	0,57	+++
4704	<i>S. aureus</i>	8	2,57	+++
4708	<i>S. aureus</i>	16	2,94	+++
1759	<i>E. faecium</i>	4	0,29	++
1558	<i>E. faecium</i>	16	0,31	++
1590	<i>E. faecium</i>	16	0,31	++

A Figura 26 mostra a variação a quantificação do biofilme acessada através das leituras DO e o valor médio da produção de biofilme de acordo com cada microorganismo analisado.



**Figura 26:** Variação das leituras de DO e valor médio da produção de biofilme entre os isolados incluídos no estudo.

### 5.7 Concentrações Mínima de Eliminação de Biofilme (CMEBs) com Clorexidina

A análise de CMEB evidenciou que bactérias em biofilme apresentaram CIM até 6,6 vezes maiores que na forma planctônica. Esses valores de CMEBs variaram de 128 a >16.384  $\mu\text{g/mL}$  em isolados Gram-negativos e de 32 a >16.384  $\mu\text{g/mL}$  em isolados Gram-positivos. Durante a análise, observou-se também que os isolados apresentavam diminuição de crescimento e voltavam a crescer em concentrações mais altas. Este fenômeno é conhecido como “Eagle effect” e foi observado em 60,5% (n=23) dos isolados em condição de biofilme elevando a concentração inibitória para  $\geq 16.384 \mu\text{g/mL}$  que corresponde a  $\geq 1,6\%$  de clorexidina comercial. Outros 39,5% (n=15) dos isolados foram resistentes à maior concentração avaliada e o fenômeno não pôde ser descrito. O “Eagle effect” também foi observado em células planctônicas elevando a concentração de 2.048 até 8.192  $\mu\text{g/mL}$ , correspondendo a 0,2 a 0,8% de clorexidina comercialmente

utilizada (Tabela 8). A identificação dos isolados foi realizada por MALDI-TOF e confirmou que os isolados que cresceram em altas concentrações eram os mesmos microrganismos inoculados descartando a possibilidade de contaminação. A CIM para CHG dos 38 isolados variaram de 2 a 256  $\mu\text{g/mL}$  entre os Gram-negativos e 2 a 32  $\mu\text{g/mL}$  entre isolados Gram-positivos. Já a CBM variou de 4 a 256  $\mu\text{g/mL}$  entre isolados Gram-negativos e de 8 a 32  $\mu\text{g/mL}$  entre isolados Gram-positivos. Adicionalmente, nenhuma correlação entre MBC ou MBEC e formação de biofilme foi observada.

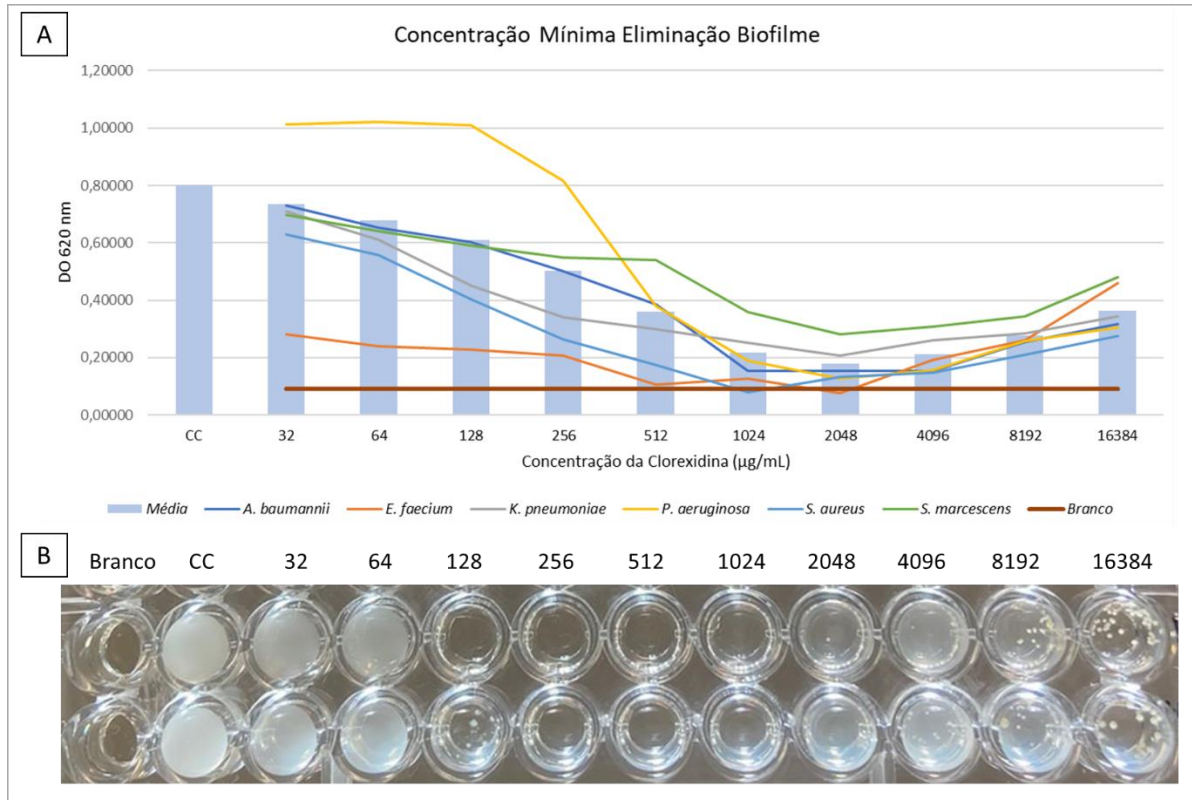
**Tabela 8:** CIM, CBM, CMEB and “Eagle Effect” para CHG de isolados Gram-negativos e Gram-positivos multirresistentes na forma planctônica e em biofilme

Amostra	Planctônica				Biofilme			
	MIC*	MBC*	Skipped weels* <sup>(1)</sup>	Recrescimento*	Produção de biofilme	MBEC*	Eagle effect* <sup>(2)</sup>	Recrescimento*
Ab1	16	16	64 – 4.096	8.196 - ≥16.284	++	2.048	Sim	4.096 - ≥16.384
Ab2	32	32	64 – 4.096	8.196 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Ab3	32	32	64 – 4.096	8.196 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Ab4	32	32	64 – 4.096	8.196 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Ab5	16	16	64 – 4.096	8.196 - ≥16.284	+++	1.024	Sim	2.048 - >16.384
Ab6	16	32	64 – 2.048	4.096 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	4.096 - >16.384
Ab7	32	32	64 – 8.192	≥16.284	+++	512	Sim	4.096 - >16.384
Ab8	32	32	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	1.024	Sim	4.096 - >16.384
Ef1	2	8	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	++	32	Sim	8.192 - >16.384
Ef2	2	8	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	++	64	Sim	8.192 - >16.384
EF3	2	4	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	++	64	Sim	>16.384
Kp1	2	4	128 - 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	128	Sim	1.024 - >16.384
Kp2	16	32	64 – 2.048	4.096 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	8.192 - >16.384
Kp3	16	16	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	512	Sim	4.096 - >16.384
Kp4	8	8	64 – 2.048	4.096 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	4.096 - >16.384
Kp5	8	8	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Kp6	16	16	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Kp7	32	32	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Kp8	8	8	64 – 2.048	4.086 - ≥16.284	+++	256	Sim	2.048 - >16.384
Pa1	16	64	128 – 8.192	≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Pa2	32	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	1.024	Sim	4.096 - >16.384
Pa3	16	64	128 – 2.048	4.096 - ≥16.284	++	≥16.284	NA	-
Pa4	16	64	128 – 2.048	4.096 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Pa5	16	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	512	Sim	4.096 - >16.384
Pa6	16	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Pa7	16	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	1.024	Sim	8.192 - >16.384
Pa8	16	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	1.024	Sim	4.096 - >16.384
Sa1	2	2	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	128	Sim	1.024 - >16.384
Sa2	8	16	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Sa3	32	32	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Sm1	4	4	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	8.192 - >16.384
Sm2	16	16	64 – 2.048	4.096 - ≥16.284	NBP	512	Sim	2.048 - >16.384
Sm3	4	8	64 – 2.048	4.096 - ≥16.284	+++	512	Sim	4.096 - >16.384
Sm4	64	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Sm5	16	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	4.096 - >16.384
Sm6	8	8	64 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	2.048	Sim	4.096 - >16.384
Sm7	64	64	128 – 4.096	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-
Sm8	256	256	128 - >16.384	8.192 - ≥16.284	+++	≥16.284	NA	-

CIM, Concentração Inibitória Mínima; CBM, Concentração Bactericida Mínima; CMEB, Concentrações Mínima de Eliminação de Biofilme; NA, não aplicável; \*Valores expressos em µg/mL.



Os dados apresentados na Figura 27 mostram média das leituras das DO por concentração de clorexidina (Figura 27A) e a representação visual (Figura 27B) evidenciando a diminuição do crescimento dos isolados em biofilme e o recrescimento à medida que as concentrações aumentam, evidenciando a presença do “*Eagle effect*”.



**Figura 27:** Representação gráfica (A) e visual (B) do “*Eagle effect*” durante o teste de CMEB. CC, controle de crescimento; DO, densidade ótica.

## 5.8. Caracterização molecular dos isolados

### 5.8.1 Testes Genotípicos

#### 5.8.1.1 *K. pneumoniae*

A caracterização molecular dos 64 isolados de *K. pneumoniae*, evidenciou o ST11 como o mais frequentemente observado (n=24), seguido do ST340 e ST258 (n=14 e n=12). Além disso, outros diferentes STs foram observados (ST16, ST23, ST25, ST101, ST234, ST437 e ST442).

O gene *cepA* esteve presente e íntegro, ou seja, sem alterações em 100% (64/64) dos isolados analisados. O gene *qacEΔ* foi o mais frequente, observado em 85,9% dos isolados e gene *qacE* em 15,6% das amostras. Não foram observadas mutações no gene *qacEΔ* entre os isolados analisados, além disso, esse gene estava quebrado em sete isolados.

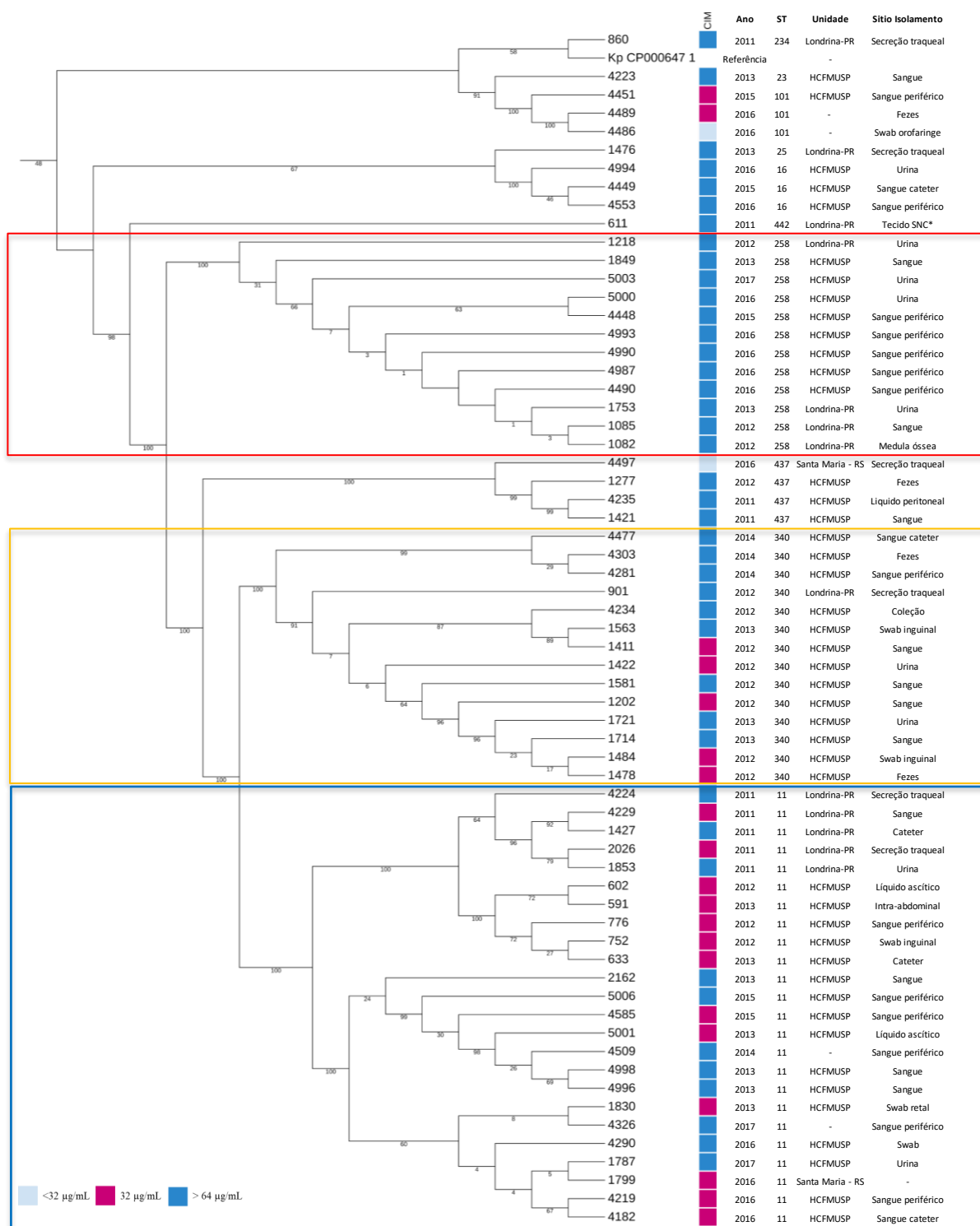
O gene *smvA* e seu regulador *smvR* foram encontrados em 90,6% (58/64) dos isolados.

Seis diferentes mutações (T423A, A89S, T486A, S411C, V399G, V176G) foram encontradas no gene *smvA*, e dentre elas, cinco (A89S, T486A, S411C, V399G, V176G) foram descritas em 11 isolados com CIM elevada para Clorexidina. Já no regulador *smvR* oito diferentes mutações (A138T, T187K, M18W, L20C, G25A, F26A, A27L, A28P, A170T) foram observadas, bem como uma inserção de 3 aminoácidos (Ins\_LRG). A mutação T187K foi a mais frequentemente observada em 29 isolados, não diferindo entre os isolados com CIM elevada para clorexidina. A mutação A138T foi observada em um isolado com CIM de 64μg/mL para clorexidina, já as mutações M18W, L20C, G25A, F26A, A27L, A28P, A170T bem como a inserção (LRG) foram também descritas em um único isolado com CIM para clorexidina de 64μg/mL. Os genes *smvA* e *smvR* estavam quebrados em 22 e 19 isolados, respectivamente.

As diferenças associadas à presença dos genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina em isolados de *K. pneumoniae* podem ser visualizadas na Figura 28.



Polimorfismo de Nucleotídeo único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*, *SNP*) se refere a quantidade de alterações em posições específicas do genoma. Na árvore de SNPs representada na Figura 29 três clusters bem definidos foram observados e a amostra MGH58578 foi utilizada como referência para geração da árvore. O número total de SNPs avaliado para a construção da árvore, de todos os isolados é de aproximadamente 15.415 polimorfismos. Quando analisamos o número de SNPs dos principais STs, observa-se que os isolados do ST11, ST340 e ST258 possuem aproximadamente 648, 57 e 43 SNPs respectivamente. Os isolados pertencentes ao ST258, estão agrupados em um cluster somente com isolados com CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  pra CHG. Na árvore é possível observar que o ST11 e o ST340 formam um clado, com isolados com CIM de 32  $\mu\text{g/mL}$  e  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ , com *bootstrap* de 100% e aproximadamente 980 SNPs, mostrando que, em algum momento do processo evolutivo os ramos se separaram, entretanto, um grau de ancestralidade entre os isolados é observado.



**Figura 29:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *K. pneumoniae*. Cluster dos principais STs descartados em vermelho (ST258), amarelo (ST340) e azul (ST11); ST, Sequência tipo; SNC, Sistema Nervoso Central; CIM, Concentração Inibitória Mínima

### 5.8.1.2 *S. marcescens*

Com relação a caracterização molecular dos isolados, no gene *sdeX*, dezesseis mutações foram observadas (F7L, P11A, Q35H, K39E, G97D, N137Y, L247M, T252A, G318R, R321A, R322T, R323A, N340D, S362T, H368Q, H368). Todos os 24 isolados (100%) tinham a mutação F7L, P11A, K39E, G97D, N137Y, G318R, R321A, R322T, R323A e N340D. Já as alterações Q35H, L247M, T252A, S362T, H368Q e H368 foram encontradas em 95,83%, 87,5%, 87,5%, 83,3%, 79,17% e 83,5% respectivamente. A presença de duas diferentes inserções (*ins\_A* e *ins\_P*) foram observadas em todos os isolados do estudo.

Um total de 65 mutações foram encontradas no gene *sdeY*: K218Q, G224P, G225V, R226P, R257G, F258S, R272A, K273E, M275Y, F277V, L561S, V562F, A577L, R578P, C593V, R647A, A649R, R650A, G651M, A652G, H653A, V659E, P661L, K666N, Y710D, L725Q, S884F, V895S, S914A, S925F, F936S, T959I, I984V, T1010I. Outras mutações como: Q1046H (95,8%); A274S e P276A (91,6%); R660G (87,5%); E95D, N587T, D775E e S639A (83,3%); T314E e E640V (79,2%); D308N, N48T e S44R (75,0%); R660V (12,5%); A42E, S44K, A215T, A274N, P276T, A479V, I570M, N599S, A612S, F616Y e V628I (8,33%) e T463N, Q469P, V482G, T314A e E640G (4,17%) também foram observadas.

No gene *qacE*, todos os isolados tinham a mutação Q105H, já as mutações M50I e T52P estavam presentes em 8,33% dos isolados e as mutações L46W, A49G, M50R, L53 foram observadas em 4,17% dos isolados.

A maioria dos isolados (87,5%) não tinha o gene *qacEΔ*, um isolado tinha o gene íntegro e dois isolados o gene estava quebrado. A Figura 30 evidencia as diferenças com relação a presença e ausência dos genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina nos isolados analisados.



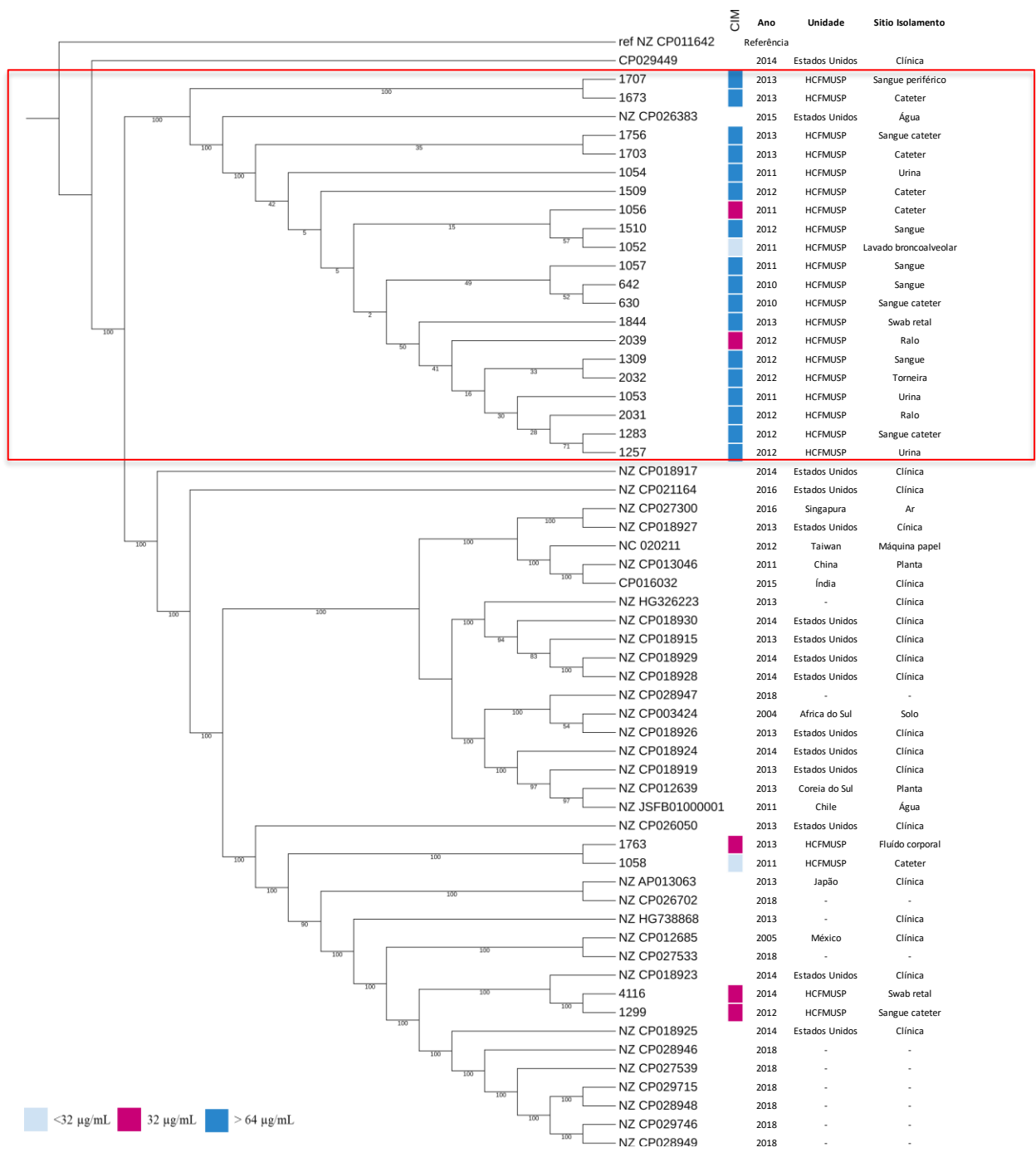
Com o intuito de dar maior robustez à análise filogenética, além dos 24 isolados do estudo, foram selecionados outros 36 isolados de diferentes países e pontos de coleta disponíveis no genbank, perfazendo um total de 60 isolados.

O número total de SNPs entre os isolados na árvore é de aproximadamente 398.664. Quando analisamos o número de diferenças apenas entre os 24 isolados do estudo, o valor estimado é de 108.718 SNPs. Três isolados do ambiente (2031, 2032 e 2039) estão agrupados no mesmo cluster com isolados de amostras clínicas, mostrando que, apesar de coletados de locais diferentes, apresentam um grau de similaridade entre si.

Vinte isolados do estudo (1707, 1673, 1756, 1703, 1054, 1509, 1056, 1510, 1052, 1057, 642, 630, 1844, 2039, 1309, 2032, 1053, 2031, 1283, 1257) coletados entre 2010 e 2013, estão agrupados em um cluster com um isolado dos Estados Unidos (NZ\_CP026383) do ano de 2015 e aproximadamente 111.498 SNPs de diferenças.

Outros quatro isolados do estudo (1763, 1058, 4116 e 1299) agrupam-se em um cluster com amostras provenientes dos Estados Unidos e Japão e, quando analisamos o número de diferenças, o valor é em torno de 90.825 SNPs (Figura 31).





**Figura 31:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *S. marcescens*. ST, Sequência tipo; Cluster principal destacado em vermelho.

### 5.8.1.3 *A. baumannii*

A caracterização molecular dos 32 isolados de *A. baumannii*, evidenciou o ST79 como o mais frequente e observado em 19 isolados. Outros STs como o ST107 (n=5), ST317 (n=4) e ST32 (n=1) também foram encontrados.

Nenhum isolado tinha o gene *qacE* e o gene *qacE*Δ foi encontrado íntegro em apenas um isolado.

A ausência do gene *aceI* foi observada em 6,9% dos isolados (n=2). Em 27,5% (n=8) o gene estava presente, porém, não íntegro. A mutação Y129H foi a mais frequente observada no gene *aceI* e estava presente em 55,8% dos isolados (19/29). Diferentes mutações foram observadas no regulador *aceR*. As mutações V3I e L295P foram encontradas em 86,2% (n=25) dos isolados. Outras alterações nucleotídicas (S142T, Q188H, M15V, A13T e N46S) foram observadas em 19, 17, 5, 2 e 1 isolados, respectivamente.

Alterações nucleotídicas nos genes *adeABC* também foram observadas na maioria dos isolados. O gene *adeA* foi observado íntegro em 62,0% (n=18) e não íntegro em 20,7% (n=6) dos isolados. Duas mutações (T376A, A368T) foram observadas em 5 e 4 isolados, respectivamente. A mutação L6F foi observada somente em um isolado e este tinha CIM elevada para clorexidina (CIM 64μg/mL).

O gene *adeB* foi observado sem alterações nucleotídicas em 62,0% (n=18) e num isolado (3,44%) o gene não estava inteiro. Cinco isolados (17,2%) tinham as mutações A643D e T646S. Outros quatro isolados (13,8%) as mutações S427N, T536I, E726K e I1010F. Somente um isolado (3,44%) tinha a mutação E214D. Quatro isolados (1820, 3705, 3732 e 3756) apresentavam as mutações I22L, N45T, T49V, A55P, T88M, E90Q, T92S, E102D, V115I, V122I, S133T, N147T, N206A, I233V, S242N, L244V, K262R, L316V, E323Q, T382S, S427P, D430E, V466I, G503E, S517T, V521L, L527I, M528I, L530F, I532V, V537I, I542L, L544I, V545I, G548A, I549A, Y556F, M571L, S573T, T581S, A582T, R586K, N590K, Q591E, N594T, N595S, L596I, K597Q, D598N, P600S, T607S, S614G, A616S, T634K, K639E, S642N, A643S, V644I, T646G, S647T, M648L, N650H, T652K, E655S, T656S, E694Q, E726D, S729N, S736A, Q774K, K776Q, S786A, E831D, A888S, S910T, R911K, I952V, I978V, I1020V, V1024A, K1032Q, S1035K. Todos os isolados eram sensíveis à clorexidina e não tinham as mutações descritas nos demais isolados.

O gene *adeC* não foi encontrado em 41,4% (n=12) das amostras analisadas. Em 55,2% (n=16) foi observado íntegro e em 3,44% (n=1) estava quebrado, além disso, nenhuma mutação foi observada nesse gene durante as análises. Não foi possível estabelecer uma associação entre a presença dos genes e o aumento da CIM para clorexidina, pois os isolados apresentavam um padrão genômico semelhante. A Figura 32 mostra as diferenças associadas à presença dos genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina entre os isolados do estudo.

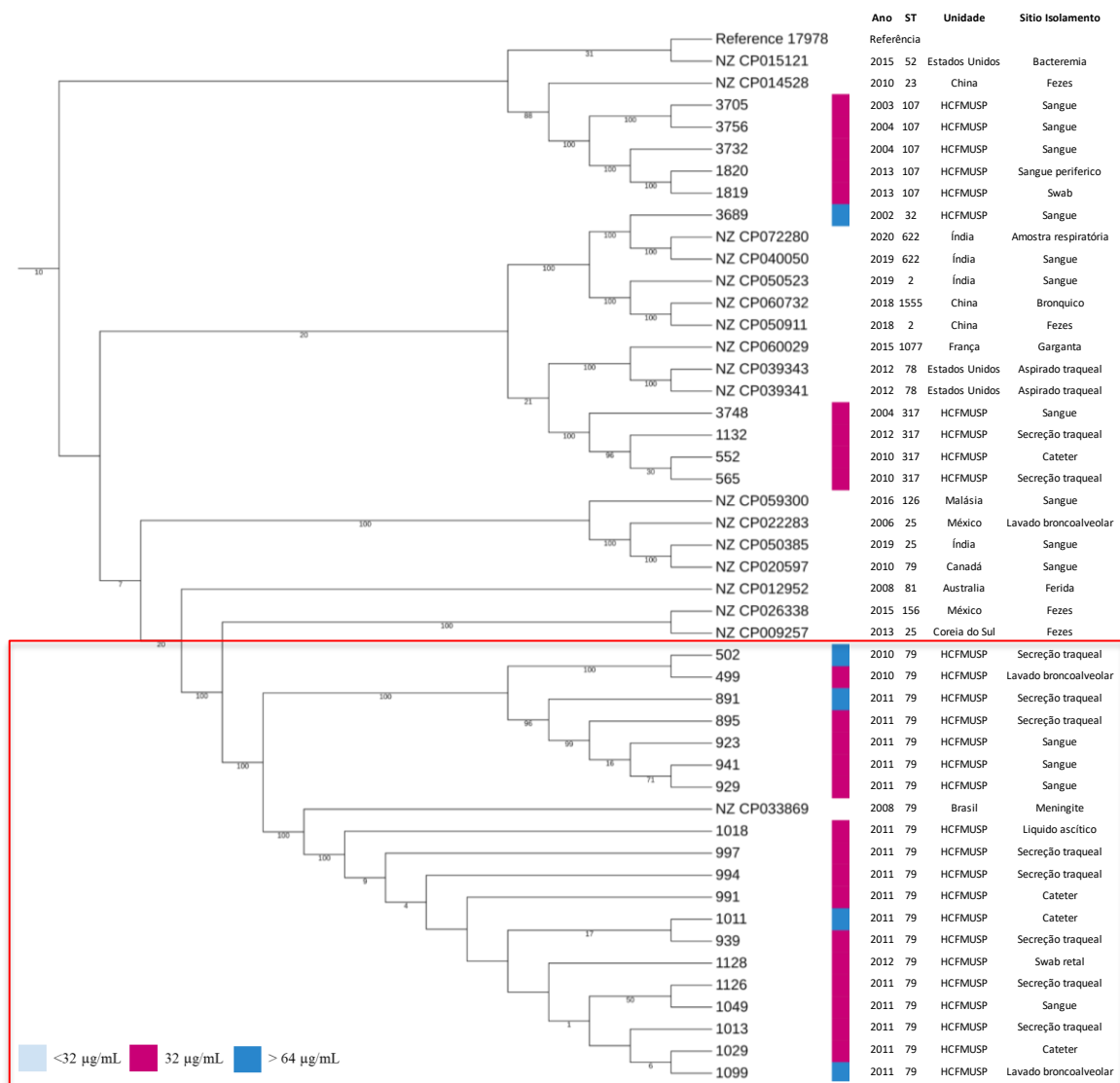
Amostra	CIM	<i>qac E</i>		<i>qac EΔ</i>		<i>ace I</i>		<i>ace R</i>							<i>ade A</i>					<i>ade B</i>						<i>ade C</i>												
		Ausente	Íntegro	Ausente	Íntegro	Ausente	Disrupted	Y129H	No gene	Disrupted	V3I	A13T	A13D	M15V	N46S	S142T	Q188H	L295P	Íntegro	Disrupted	A368T	T376A	L6F	T386N	Íntegro	Disrupted	S427N	T536I	A643D	T646S	E726K	I1010F	E214D	Íntegro	Ausente	Disrupted		
499	32																																					
552	32																																					
565	32																																					
895	32																																					
923	32																																					
929	32																																					
939	32																																					
941	32																																					
991	32																																					
994	32																																					
997	32																																					
1013	32																																					
1018	32																																					
1029	32																																					
1049	32																																					
1126	32																																					
1128	32																																					
1132	32																																					
1819	32																																					
1820	32																																					
3705	32																																					
3732	32																																					
3748	32																																					
3756	32																																					
502	64																																					
891	64																																					
1011	64																																					
3689	64																																					
1099	128																																					

**Figura 32:** Diferenças associadas à presença dos genes relacionados ao aumento da CIM para CHG em isolados de *A. baumannii*. Isolados sensíveis destacados em vermelho.

Para dar maior robustez e confiabilidade nas análises filogenéticas, outros 16 genomas foram selecionados na base de dados do GenBank utilizando como critério de seleção: ano de isolamento, local de coleta e País de origem (Figura 33)..

O número total de SNPs de todos os isolados analisados na árvore é de aproximadamente 79.201 SNPs e entre 29 isolados do estudo, são observados em torno de 43.367 diferenças. O cluster principal da árvore, com 20 isolados pertencentes ao ST79 possuem aproximadamente 1.133 SNPs. É possível observar que, nesse cluster, uma amostra pertencente a outra localidade do Brasil agrupa-se com 100% de *bootstrap*, mostrando a existência de uma proximidade genética desse isolado com os isolados do estudo.

Dois clusters com somente isolados do estudo pertencentes aos ST107 (n=5) e ST317 (n=4) apresentam em torno de 470 e 255 SNPs, respectivamente. Um isolado do estudo pertencente ao ST32 agrupou em um cluster com isolados pertencentes a amostras de outros países com STs distintos (ST622, ST2 e ST1555) com 31.769 SNPs.



**Figura 33:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *A. baumannii*. ST, Sequência tipo, Cluster principal (ST79) destacado em vermelho.

#### 5.8.1.4 *P. aeruginosa*

A análise dos 15 isolados de *P. aeruginosa* evidenciou que onze isolados pertenciam ao ST277. Outros isolados também foram observados como: ST245 (n=2) e ST380, ST446 e ST1853 com um isolado pertencente a cada ST.

O gene *mexC* estava íntegro em 53,3% (n=8) dos isolados e *disrupted* em 26,6% (n=4) das amostras. Com relação a análise das mutações, as alterações E251Q, A262E, A277T foram observadas em somente um isolado. Dois isolados tinham as mutações H310R, A378T, P383S, A384V. A mutação S330A estava presente em 13,3% (n=2) e a mutação Q381L em 6,7% (n=1) dos isolados.

Já no gene *mexD*, 93,75% (n=14) dos isolados tinham as alterações (G22A, R266L, C267A, A269V, P270A, G271R, T272L, R273E, E276K, L277E, Q278S, H279Y, F280N, L281I, A282S, T283S, G290L, R291N, Y923T, A295T, R298G, G299A, R301L, D302S, D304T, P305A, E362Q, F499L, S641A e S845A). As mutações E257Q e R268D foram observadas em 86,6% (n=13) e a mutação Q274L em 73,3% (n=11) das amostras. Já as mutações T87S e E268D foram encontradas em apenas um isolado e 26,6% e quatro isolados (26,6%) tinham a alteração Q274A. Em apenas um isolado o gene estava quebrado.

A análise do terceiro componente do operon *mexCD*, o gene *oprJ*, evidenciou a presença de três diferentes mutações (D68G, M69V, T376S) que foram identificadas em 53,3% (n=8), 66,6% (n=10) e 6,6% (n=1) dos isolados, respectivamente. Somente em um isolado o gene estava íntegro e em cinco isolados o gene estava *quebrado*.

No gene *nfxB*, regulador do operon *mexCD*, 93,3% (n=14) havia a mutação F5S e em um dos isolados este gene não foi encontrado.

No gene *qacE* duas mutações foram observadas, R28K foi observada somente em um isolado, já a mutação I88V foi encontrada em 80,0% (n=12) dos isolados. Em dois isolados o gene *qacE* estava íntegro e em outro isolado o gene estava quebrado.

O gene *qacEΔ* foi encontrado íntegro em 86,6% (n=13) das amostras, ausente em um isolado e *disrupted* em um outro isolado.

A Figura 34 evidencia as diferenças com relação a presença e ausência dos genes relacionados ao aumento da CIM para clorexidina nos isolados analisados.

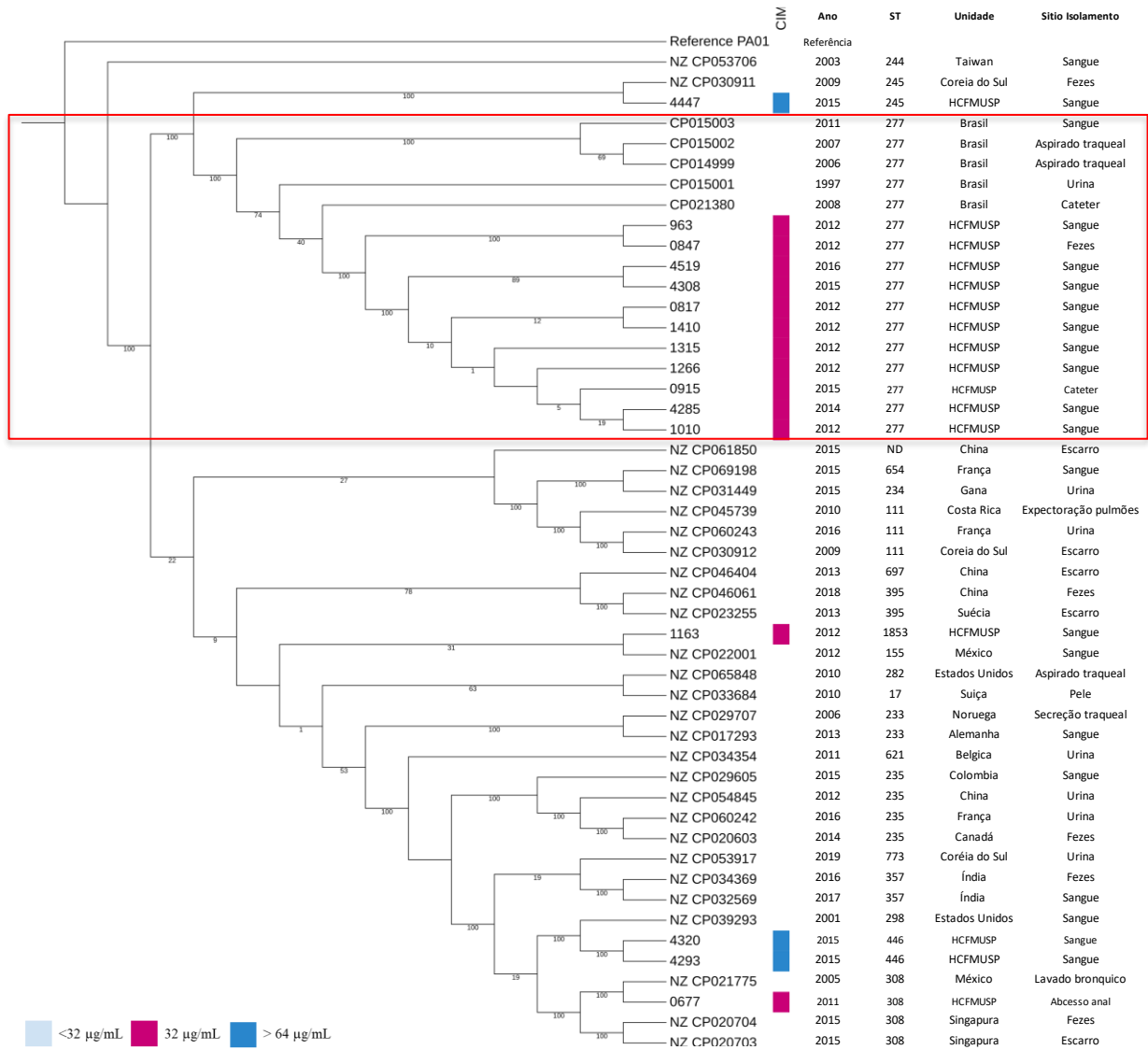




A árvore de SNP dos 15 isolados de *P. aeruginosa* do estudo, foi realizada utilizando mais trinta e cinco isolados selecionados da ferramenta Genbank com o intuito de melhorar a comparação entre eles considerando o baixo número de amostras, totalizando então 50 isolados (Figura 35). O número total foi de aproximadamente 97.846 SNPs, porém, quando analisamos somente os 15 isolados do estudo, o número de diferenças é em torno de 52.906 SNPs.

Um cluster com 15 isolados do Brasil, todos pertencentes ao ST277, apresentou aproximadamente 1.442 SNPs. Nesse cluster estão incluídos 10 isolados do estudo e outros 5 isolados de outras localidades do Brasil. Um baixo número de SNPs (198) foi observado no cluster com os isolados do ST308, onde um isolado do estudo está agrupado no mesmo cluster com dois isolados de Singapura e um do México.

Já o isolado pertencente ao ST245 está agrupado com um isolado da Coréia do Sul, com 100% de *bootstrap* apresentando aproximadamente 4.273 SNPs entre si. Outros dois isolados do ST446 está agrupado em um cluster com um isolado do ST298, dos Estados Unidos com 164 SNPs, evidenciando a existência de uma proximidade genética.



**Figura 35:** Árvore de SNPs e informações clínicas dos isolados de *P. aeruginosa* do estudo. ST, Sequência tipo; Cluster principal (ST277) destacado em vermelho.

## **6. DISCUSSÃO**

---

Clorexidina é um antisséptico amplamente utilizado no ambiente hospitalar, em diferentes concentrações, como uma importante ferramenta na prevenção de IRAS, entretanto, com seu uso expressivo, há uma preocupação se a ocorrência de uma pressão seletiva pode levar ao aumento da CIM para clorexidina entre os microrganismos (KAMPF et al, 2016; SEHULSTER et al, 2004).

A determinação da concentração inibitória mínima para clorexidina foi avaliada por dois diferentes métodos (ágar diluição e microdiluição em caldo). Pelo método de ágar diluição, para *K. pneumoniae*, 62,5% dos isolados tiveram diminuição da sensibilidade a CHG com intervalo das CIMs de 8-128 µg/mL. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Naparstek e colaboradores no ano de 2012 que também observaram valores de CIM de 8 – 256 µg/mL entre 126 isolados analisados. Já pelo método de diluição em caldo, somente 3,12% dos isolados tinham CIM elevada para CHG com intervalo das CIMs de 4 - 64 µg/mL. Esses valores contrastam com um estudo publicado por Chen e colaboradores em 2020 que, apesar de uma casuística muito parecida com a nossa de 50 isolados divididos entre sensíveis e resistentes a carbapenêmicos, verificaram valores de CIM variando de 4 – 512 µg/mL.

Entre os 24 isolados de *S. marcescens*, 70,8% dos isolados tiveram diminuição da CIM para CHG com intervalos das CIM de 8 – 256 µg/mL no método de diluição em ágar. Já no método de diluição em caldo, a diminuição da sensibilidade ocorreu em 62,5% com intervalos de CIM de 4 – 256 µg/mL. Poucos estudos avaliam a tolerância a clorexidina nessa população de microrganismos, entretanto, um estudo avaliou a resistência a CHG em 54 isolados de *S. marcescens* de um hospital veterinário entre 2009 e 2018 e observou intervalos similares ao nosso (16 - 128 µg/mL). No geral, os valores utilizados em estudos *in vitro* são menores que os utilizados na prática clínica. Os autores supõem que a tolerância *in vivo* possa ser ainda maior, uma vez que tal não sensibilidade aos desinfetantes facilita a formação de biofilme (KECK et al 2020).

Nosso estudo avaliou a sensibilidade a clorexidina entre isolados de *A. baumannii*, os dados mostraram que entre os 29 isolados analisados, a diferença foi pequena entre os intervalos das CIM nos dois métodos avaliados. No método de ágar diluição o intervalo das CIMs foi de 32 – 128 µg/mL e no método de microdiluição em caldo de 16 - 64 µg/mL. Nossos resultados corroboram com os dados publicados por Mendes e colaboradores no ano de 2016 que verificaram intervalos de 8 – 64 µg/mL da CIM, pelo método de ágar diluição, em isolados de *A. baumannii* após intervenção com banho de

clorexidina em pacientes de uma unidade de transplante de medula óssea em um hospital na cidade de São Paulo. Dados próximos ao nosso também foram descritos por Leshem e colaboradores (2022) onde, em estudo com 17 amostras clínicas, utilizando o método de diluição em caldo, observou que os isolados tinham um intervalo das CIM de 8 - 64  $\mu\text{g/mL}$ .

A avaliação da CIM para CHG entre os 15 isolados de *P. aeruginosa* também evidenciou semelhanças entre os métodos de sensibilidade avaliados onde um intervalo entre 16 - 64  $\mu\text{g/mL}$  nas CIM por ágar diluição e 16 - 32  $\mu\text{g/mL}$  pelo método de microdiluição em caldo. Os dados publicados por Mendes e colaboradores (2016), pelo método de ágar diluição, são concordantes com a nossa casuística onde observaram intervalos de 4 - 64  $\mu\text{g/mL}$  entre os isolados de *P. aeruginosa*. Os achados de Goodarzi e colaboradores em 2021 são similares ao nosso, onde no método de diluição em caldo observaram intervalos de CIM de 8 - 128  $\mu\text{g/mL}$ , diferindo apenas em 1 diluição.

Nosso estudo avaliou a resposta ao inibidor de bomba de efluxo CCCP, descrito restaurar a sensibilidade dos isolados a antimicrobianos e biocidas, nos isolados que tiveram a CIM  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . Pelo método de ágar diluição um total de 65 isolados e pelo método de microdiluição em caldo 20 isolados tiveram boa resposta ao CCCP em relação a CIM para CHG. Em ambas metodologias, os isolados de *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *S. marcescens* tiveram diminuição  $\geq 4$  diluições quando o CCCP foi adicionado às placas de ágar diluição e microdiluição no teste de sensibilidade. Esses resultados são concordantes com estudos prévios que também observaram boa resposta ao CCCP entre os isolados analisados utilizando as mesmas metodologias do nosso estudo (WAND et al, 2017; MIGLIACCIO et al, 2022; MASEDA et al, 2009).

Nosso estudo evidenciou que os três isolados de *P. aeruginosa* que foram submetidos ao teste de ágar diluição com CCCP não tiveram diminuição da CIM para CHG quando associado ao inibidor. Esse resultado é concordante com um estudo publicado por Mombeshora e colaboradores em 2017 onde também não observaram diminuição do valor da CIM entre os isolados de *P. aeruginosa* analisados.

Um outro ponto importante é a diferença entre os resultados da CIM inibitória mínima entre as metodologias utilizadas para determinar a sensibilidade a CHG. Uma hipótese nossa é que essa diferença pode ser o tipo de produto utilizado para os testes, uma vez que para o teste de ágar diluição foi utilizado a clorexidina em pó (99%) e, devido a

dificuldade de solubilização, para os testes de microdiluição foi utilizado a CHG 20% líquida.

É importante dizer que, na rotina laboratorial, principalmente no método de ágar diluição, a técnica é de difícil execução e nada prática na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica. Diante da necessidade de avaliar a sensibilidade a clorexidina dos isolados de forma mais rápida e eficiente e que pudesse se encaixar na rotina laboratorial, nosso estudo propôs padronizar o método de disco difusão para atender estas demandas.

As concentrações de 5, 10, 100, 250, 500 e 1000 µg de clorexidina foram impregnadas nos discos e testadas em isolados com diferentes CIM para clorexidina e diante da pouca diferença nos tamanhos dos halos, o disco com 100 µg foi escolhido para estender os testes aos demais isolados. Os halos de inibição variaram de 4 a 17mm entre os 132 isolados do estudo. O teste de interferência do diluente mostrou que a formação do halo estava associada à presença da clorexidina no disco e não pelo uso do diluente.

Em nosso estudo simulamos dois cenários para avaliar a concordância entre disco difusão e ágar diluição, e disco difusão e diluição em caldo sob os pontos de corte de resistência de  $\geq 32$  µg/mL e  $\geq 64$  µg/mL, pelo teste de coeficiente de kappa com o intuito de propor um ponto de corte que se encaixasse nos critérios de aceitação propostos pelo CLSI, em relação às taxas de falso sensíveis (<1.5%) e falso resistentes (<3%).

Se considerarmos o cenário do ponto de corte  $\geq 32$  µg/mL, nossos resultados mostram que, pelo método de ágar diluição, no halo de 16mm, os isolados de *K. pneumoniae* apresentam o melhor desempenho, com uma concordância boa e taxa de falso sensível e falso resistente com valor aceitável de 1,6%. Nos isolados de *S. marcescens*, em ambos cenários ( $\geq 32$  µg/mL e  $\geq 64$  µg/mL) e metodologias, os intervalos de halos de 12 – 15 mm evidenciaram concordância boa entre os métodos, entretanto uma alta taxa de falso sensível ou falso resistente é observada. Não foi possível utilizar os tamanhos de halos obtidos como determinadores de resistência entre os isolados de *P. aeruginosa* e *A. Baumannii*, pois devido o baixo número de amostras analisadas e presença de ao menos uma única amostra no campo falso sensível, a taxa de erro deste parâmetro é elevada. Estudos com antimicrobianos como o publicado por Liu e colaboradores em 2016, com 115 isolados de *N. gonorrhoeae* mostraram uma boa correlação e concordância entre os testes de disco difusão e ágar diluição (considerado padrão ouro), com valores de 93,0%, 92,1% e 90,4% para ceftriaxona, cefixima e cefpodoxima. Esse dados, apesar de utilizarem outro antimicrobiano, evidenciam que

uma correlação entre disco difusão e ágar diluição pode ser observada. Além disso, não há descrição na literatura de estudos que comparem o método de disco difusão e ágar diluição ou diluição em caldo para clorexidina.

Nosso estudo evidenciou uma diferença muito pequena com relação ao tamanho dos halos nas diferentes concentrações testadas, e uma possível explicação para tal diferença está descrita num artigo publicado por Horner e colaboradores (2012). Os autores descrevem que a CHG tem uma baixa taxa de difusão em ágar sólido, portanto, o teste de DD não seria o método mais indicado para avaliação da sensibilidade.

Um outro ponto importante a considerar é a ausência de um ponto de corte para determinação da sensibilidade a clorexidina. Na literatura, como no estudo publicado por Morrisey e colaboradores (2016), os autores definem os pontos de corte epidemiológico (ECOFF/ECV) como uma ferramenta para auxiliar no monitoramento das CIM dos isolados que são definidos com base na distribuição normal de CIMs de uma determinada espécie bacteriana.

Em relação a habilidade da formação de biofilme, entre os 38 isolados analisados e, comparando com os resultados obtidos da CBM e CMEBs para CHG, nossos resultados demonstraram que os isolados na forma de biofilme apresentam um valor de CMEB até seis vezes maior quando comparados com os isolados na forma planctônica. Uma explicação para maior tolerância a CHG no ambiente poderia ser devido a uma maior capacidade de formação do filme biológico. Entretanto, nosso estudo não observou nenhuma correlação entre CMEB e produção de biofilme. Nosso estudo corrobora com os resultados de estudos anteriores usando antibióticos onde também observaram valores mais altos de CMEB de planctônicas quando comparados com biofilme, bem como nenhuma correlação entre a formação de biofilme e valores de CMEB (NAPARSTEK et al, 2014; BONCOMPAGNI et al, 2022).

Para o teste de CMEB, devido a uma tolerância a maiores concentrações de CHG, foram utilizadas concentrações muito maiores do que as que normalmente são utilizadas nos ensaios de CIM. Durante a avaliação dos resultados de biofilme, nosso estudo observou um achado interessante, descrito na literatura como “*Eagle effect*” ou “*Skipped wells*”. Nosso achado é concordante com estudos prévios publicados por Matuschek e colaboradores (2018) e Turlej-Rogacka e colaboradores (2018) que evidenciaram a presença deste fenômeno em isolados Gram-negativos de *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *E. coli* em experimentos com colistina.

O fenômeno foi descrito pela primeira vez em 1948 por Harry Eagle e é caracterizado pelo crescimento de microrganismos em concentrações de antimicrobianos superiores que as observadas em ensaios de *time-kill* ou CBM. No entanto, a causa deste fenômeno é desconhecida podendo representar um desafio quanto aos resultados produzidos pelo método de microdiluição em caldo (PRASETYOPUTRI et al, 2018; ELIAS et al, 2021).

De forma interessante, esse fenômeno também foi observado nos nossos isolados na forma planctônica quando foram submetidos ao teste de microdiluição para CHG. No estudo publicado por Prażyńska e colaboradores (2018), os autores também observaram a presença de “*Eagle effect*” em células planctônicas em diferentes espécies de *Cândida* quando testadas com antifúngicos, além disso, os autores descrevem ainda que esse fenômeno é mais frequentemente observado em células sésseis. Outros dois estudos publicados por Landman e colaboradores em 2013 e Guérin e colaboradores em 2016 também descrevem “*Skipped wells*” como fenômeno e que esses isolados podem apresentar um maior grau de heterorresistência.

Em relação a análise molecular dos genes codificadores de bomba de efluxo nas amostras de *K. pneumoniae*, nosso estudo evidenciou os genes *cepA* e *qacEΔ* como os mais frequentes em 100% e 85,9% dos isolados, respectivamente. Nossos achados corroboram com estudos prévios que observaram uma alta frequência dos genes *cepA* e *qacEΔ* entre isolados de *K. pneumoniae*. Esses genes são amplamente descritos na literatura por desempenharem um papel importante no aumento da CIM para CHG em isolados de *K. pneumoniae*, além disso, são descritos também por apresentarem estreita relação na sensibilidade aos antissépticos em cepas de Enterobacterales (CHEN et al, 2020; ABUZAIID et al, 2015).

A frequência do gene *qacE* foi baixa em nosso estudo, presente somente em 15,6% dos isolados. Nossos resultados são concordantes com estudos prévios conduzidos por Guo e colaboradores (2015), Mendes e colaboradores (2016) que observaram baixa frequência (15%, 10%) respectivamente, desse gene nos isolados de *K. pneumoniae* analisados.

A bomba *smvAR* é descrita como uma importante bomba na extrusão de biocidas catiônicos como a clorexidina e foi observada em 16 dos 17 isolados de *K. pneumoniae* num estudo conduzido por Gual-de-Torrella e colaboradores em 2021. Esses dados



concordam com nossos achados onde observamos a presença desse mecanismo em 90,6% dos isolados.

Não foram observadas alterações cromossômicas nos genes *cepA* e *qacEΔ*. A ocorrência de genes truncados foi observada nos genes *qacEΔ* (n=7), *smvA* (n=22) e *smvR* (n=19), o que nos leva a acreditar que isso possa ter acontecido devido a um erro na montagem do genoma após o sequenciamento.

A análise filogenética dos isolados de *K. pneumoniae* evidenciou a presença de três clusters principais agrupados por ST com isolados pertencentes aos ST258, ST11 e ST340. Todos os isolados do ST258 apresentam CIM >64 µg/mL, diferente dos achados dos clusters do ST11 e ST340 onde observa-se uma heterogeneidade com relação a sensibilidade a clorexidina dos isolados. Esses dados são concordantes com os resultados descritos por Naparstek e colaboradores (2012) onde a maioria dos 70 isolados do ST258 com maior proporção dos isolados com CIM de 128 e 256 µg/mL e, entre os isolados pertencentes ao ST340, as CIM variaram de 8 a 256 µg/mL, entretanto os autores não avaliaram isolados do ST11. A relevância clínica desses achados refere-se à capacidade dos clones pertencentes ao complexo clonal 258, em especial aos isolados do ST258, de sobreviver ao efeito residual da clorexidina. Além disso, a relevância clínica de CIMs mais altas de clorexidina deve ser considerada, uma vez que são linhagens de alto risco e altamente resistentes.

Com relação aos isolados de *S. marcescens*, é sabido que esses microorganismos são capazes de sobreviver em diferentes condições, incluindo soluções de clorexidina. Nosso estudo também evidenciou a presença dos genes *qacE* em todos os isolados do estudo, já o gene *qacEΔ* foi encontrado em somente três isolados. Nossos dados corroboram com estudos prévios que verificaram o gene *qacE* como mais frequente entre os isolados analisados (SANDNER-MIRANDA et al, 2018; KAZAMA et al, 1998).

Nosso estudo também observou a presença dos genes *sdeXY* em todos os isolados, não diferenciando entre isolados sensíveis e resistentes a CHG. Os poucos relatos na literatura têm associado a presença desses genes com a diminuição da sensibilidade a clorexidina em isolados de *S. marcescens*. (MASEDA et al, 2009). Chen e colaboradores (2003) descrevem que a bomba *sdeXY* faz parte de um conjunto de três bombas de efluxo (*sdeAB*, *sdeCDE* e *sdeXY*), presentes em isolados de *S. marcescens* descritas como responsáveis pelo transporte de antimicrobianos como ciprofloxacino,

norfloxacino, ofloxacino, cloranfenicol e surfactante (*sdeAB*), novobiocina (*sdeCDE*) e eritromicina, tetraciclina, norfloxacina, ampicilina e biocidas (*sdeXY*).

A análise filogenética dos isolados de *S. marcescens* evidenciou um cluster principal, onde a maioria dos isolados desse estudo, com a exceção de 4 amostras (1763, 1058, 4116, 1299), agruparam com um isolado dos EUA. Um fato interessante é que isolados clínicos foram agrupados junto com isolados ambientais, indicando uma possível fonte de transmissão. Não há esquema de MLST disponível para isolados de *S. marcescens* para que pudéssemos verificar a relação genética entre os diferentes isolados.

A caracterização molecular dos 32 isolados de *A. Baumannii* em nosso estudo evidenciou a ausência do gene *qacE* nos isolados e do gene *qacEΔ* em apenas um isolado. Nossos resultados divergem de um estudo publicado por Liu e colaboradores (2018) que dos 51 isolados analisados, com CIM que variaram de 4 – 64μg/mL, observaram uma presença maior dos genes *qacE* e *qacEΔ* em 23,5% e 96,0% dos isolados, respectivamente. Num outro estudo realizado por Guo e colaboradores em 2019, os autores também verificaram um percentual maior dos genes *qacE* (30,48%) e *qacEΔ* (76,82%) entre os 82 isolados de *A. baumannii*.

Diferente dos outros sistemas de efluxo que utilizam a força *proton motive* como fonte de energia, a bomba de efluxo do tipo ABC (*adeABC*) utiliza ATP como fonte de energia. Nosso estudo evidenciou a presença desse sistema, onde os genes *adeA* e *adeB* aparecem em todos os isolados e o gene *adeC* em 62,5% das amostras. Estudos descrevem a importância desse sistema de efluxo na diminuição da sensibilidade a CHG e observaram que a inativação do gene *adeB* levou ao aumento da suscetibilidade aos biocidas. (RAJAMOHAN et al, 2010; HASSAN et al, 2013). Além disso, a bomba *adeABC* desempenha um papel importante na resistência adquirida em isolados de *A. baumannii*, sendo super expressa em cepas multidroga resistentes (KRISHNAMOORTHY et al, 2015).

Nosso estudo evidenciou também a presença do mecanismo de efluxo *aceI* e seu regulador *aceR* foi observado em 93,7% dos isolados. Esse mecanismo está associado a resistência a CHG em *A. baumannii*. A literatura descreve esse mecanismo da família PACE onde o gene homólogo *aceI* induz resistência à clorexidina e sua super expressão também leva à resistência ao cloreto de benzalcônio e acriflavina (HASSAN et al, 2013).

A caracterização filogenética dos isolados de *A. baumannii* observou um cluster predominante somente em isolados do ST79 compartilhando 1.133 SNPs, incluindo um

isolado de outro estudo brasileiro. Este ST foi o mais frequente, observado em 19 isolados do nosso estudo. Nosso estudo também não observou diferença entre os perfis de sensibilidade dos isolados do cluster. Um estudo publicado por Carrasco e colaboradores em 2021, analisando isolados de *A. baumannii* de diferentes ST, verificou que, o único isolado pertencente ao ST79 tinha CIM mais baixa para CHG (16 µg/mL). Os outros isolados pertencentes aos STs 107, 32 e 317 agruparam entre si e com isolados de diferentes países e regiões. Esse agrupamento ao acaso é esperado, uma vez que os isolados pertencem a STs diferentes.

Entre os genes mais comumente descritos isolados de *P. aeruginosa*, os genes *cepA*, *qacE* e *qacEΔ* foram observados em 100% e 93,3% entre os 15 isolados do estudo, respectivamente. Nossos dados concordam com um estudo publicado por Goordazi e colaboradores em 2021 que analisaram 62 isolados de *P. aeruginosa* e verificaram um alta frequência dos genes *cepA* e *qacEΔ* em 60,9% e 36,9% das amostras. Entretanto, os autores encontraram o gene *qacE* em somente 1 isolado, o que difere dos nossos resultados onde o gene estava presente em 93,3% das amostras. Outro estudo publicado por Kadry e colaboradores em 2017 também observou a presença do gene *qacE* em somente 30,5% dos 104 isolados de *P. aeruginosa* analisados.

O mecanismo de efluxo *mexCD-oprJ* e o regulador *nfxB* foram observados em 100% e 93,3% dos nossos isolados. Estudos descrevem que a bomba de efluxo MexCD-OprJ do tipo RND é induzida por concentrações sub-inibitórias de desinfetantes como cloreto de benzalcônio ou clorexidina, além disso, sub-populações tolerantes à clorexidina em biofilmes de *P. aeruginosa* também são dependentes dos genes *mexCD-oprJ* e que biocidas, como clorexidina, são conhecidos por interagir e romper membranas bacterianas, com a possibilidade de que a expressão de *mexCD-oprJ* seja uma resposta ao dano da membrana/estresse do envelope (MORITA et al, 2014).

A caracterização filogenética dos isolados de *P. aeruginosa* observou um cluster predominante com isolados do ST277 compartilhando 1.442 SNPs, incluindo outros cinco isolados brasileiros sendo o ST mais frequente entre os isolados do nosso estudo. Estudos descrevem o ST277 está disseminado no Brasil, e está associado principalmente à presença da metalo-β-lactamase SPM-1, além disso, importantes genes de virulência como adesão, *quorum sensing* e produção de biofilme estão envolvidos, o que pode explicar a permanência desse clone no ambiente hospitalar (SILVEIRA ET AL, 2016; CHAVES et al, 2017). Os outros isolados pertencentes aos STs 308, 245 e 446 agruparam

com isolados do México, Coreia do Sul e Estados Unidos com 198, 4.273 e 146 SNPs, respectivamente. Esse resultado evidencia que, apesar dos isolados estarem em localizações diferentes a existência de uma proximidade genética pode ser verificada.

Nosso estudo evidenciou a presença de alterações genéticas (mutações, deleções e/ou inserções) nos genes pesquisados isolados analisados e, nenhum dos eventos foi considerado como fator determinante para resistência a CHG, uma vez que foram observadas em cepas sensíveis e resistentes a clorexidina. Estudos descrevem mutações como uma importante origem da resistência aos antimicrobianos e ocorrem de forma espontânea nas bactérias. A resistência aos biocidas a partir de mutações genéticas são raras quando comparadas com as mutações que conferem resistência aos antimicrobianos, isso ocorre porque os biocidas geralmente visam vários componentes celulares ou alvos não específicos, sendo pouco provável que as mutações em um único local-alvo causem resistência a esses compostos. (WANG et al, 2022)

O estudo tem várias limitações como a ausência de isolados multi-sensíveis para a análise da comparação dos métodos de disco-difusão com DA e DC, bem como a não realização do estudo de expressão gênica para avaliar o real papel da bomba de efluxo na diminuição da sensibilidade a clorexidina.

## **7. CONCLUSÃO**

---

- A clorexidina é um antisséptico amplamente utilizado no ambiente hospitalar e é efetiva contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e seu uso está relacionado a seleção de isolados resistentes a esse produto.
- Neste estudo demonstramos um grande percentual de isolados com CIM elevadas para clorexidina, em especial nos isolados de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*.
- Foi observada uma diferença nos valores de CIM entre os métodos de ágar diluição e microdiluição, o que pode estar relacionado ao tipo da clorexidina utilizada nos testes.
- O CCCP foi capaz de reduzir a CIM para CHG nos isolados de *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *A. baumannii*, exceto para *P. aeruginosa* que não teve diminuição dos valores da CIM, indicando um papel das bombas de efluxo na resistência à CHG.
- O teste de disco difusão não foi capaz de discriminar isolados sensíveis e resistentes a clorexidina, pois não houve diferenças significativas nos tamanhos dos halos entre os isolados.
- Nosso estudo sugere que a utilização da técnica de disco difusão não é indicada para avaliar resistência a CHG.
- Os isolados apresentaram um aumento de até 6,6 vezes na tolerância à CHG no ambiente de biofilme quando comparado com a forma plactônica.
- O fenômeno *Eagle effect* foi um importante achado no nosso estudo, observado tanto em células planctônicas quanto na forma de biofilme. Evidenciamos que os microrganismos foram capazes de sobreviver em concentrações acima da CMI e CMEB. Algumas das concentrações testadas são as mesmas utilizadas no ambiente hospitalar e não foram capazes de impedir o crescimento bacteriano. Essa é primeira vez que *Eagle effect* é descrito para CHG e esses dados sugerem uma atenção especial para a ocorrência desse fenômeno para evitar resultados falsos sensíveis.
- Não houve diferenciação entre a presença dos genes de resistência e o perfil de sensibilidade a clorexidina em nenhum dos microrganismos analisados, uma vez que tanto os isolados sensíveis e resistentes tinham os mesmos mecanismos.
- A variabilidade de eventos genéticos como mutações, deleções e inserções não foram considerados fatores de diferenciação de resistência, uma vez que esses

eventos ocorrem de forma espontânea, o que nos leva a acreditar que a tolerância a clorexidina pode ser multifatorial.





**Anexo 1:** Parecer de aprovação do estudo no Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



## **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/06/2019, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 214/19 intitulado: Uso de disco difusão para determinação *in vitro* de sensibilidade a clorexidina e avaliação e resistência em isolados de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas multirresistentes. Apresentado pelo Departamento de Moléstias Infeciosas e Parasitárias .

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dra. Silvia Figueiredo Costa

Pesquisador (a) Executante: Ana Paula Marchi Rosin

CEP-FMUSP, 19 de Junho de 2019.

**Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa

## Anexo 2: Produção Científica

Brazilian Journal of Microbiology (2022) 53:245–250  
<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00634-9>

CLINICAL MICROBIOLOGY - SHORT COMMUNICATION

Genetic description of VanD phenotype *vanA* genotype in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from a Bone Marrow Transplantation Unit

Ana Paula Marchi<sup>1</sup> · Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1,2,3</sup> · Marina Farrel Cortés<sup>1,2</sup> · Victor Augusto Camarinha de Castro Lima<sup>1,2</sup> · Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>2</sup> · Lucas Augusto Moyses Franco<sup>1,4</sup> · Flavia Rossi<sup>1</sup> · Vanderson Rocha<sup>5</sup> · Anna S. Levin<sup>1,2,3</sup> · Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

BRIEF COMMUNICATION

MRSA outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit in a developed country: importance of rapid detection of reservoirs and implementation of intervention measures

Maria Luisa Moura<sup>1</sup>, Camila Fonseca Rizek<sup>1</sup>, Elissa Aguiar<sup>1</sup>, Ana Natiele da Silva Barros<sup>1</sup>, Sibeli Costa<sup>1</sup>, Sania Alves dos Santos<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Maria Augusta Bento Ciconeri Gibelli<sup>1</sup>, Carla Regina Tragante<sup>1</sup>, Maria Rita Elmora de Araujo<sup>1</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORIGINAL ARTICLE

Conjugative transfer of plasmid p\_8N\_qac(MN687830.1) carrying *qacA* gene from *Staphylococcus aureus* to *Escherichia coli* C600: potential mechanism for spreading chlorhexidine resistance

Taniela Marli Bes<sup>1,2</sup>, Debora Satie Nagano<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Gaspar Camilo<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão-Neto<sup>1,2</sup>, Roberta Ruedas Martins<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1,2</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

International Journal of Antimicrobial Agents

Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen

Gladys Prado<sup>1</sup>, Elisa Teixeira Mendes<sup>1,2</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão-Neto<sup>1</sup>, Maristela Pinheiro Freire<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Marina Farrel Cortés<sup>1</sup>, Victor Augusto Camarinha de Castro Lima<sup>1</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1,2</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY

SHORT COMMUNICATION

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection is associated with lower overall survival in a cohort of haematopoietic stem-cell transplantation patients: mechanism of resistance and virulence by whole-genome sequencing

Hermes Ryoiti Higashino<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>1</sup>, Laina Bubach Carvalho<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1</sup>, Marina Farrel Cortés<sup>1</sup>, Fernando Nivaldo de Oliveira<sup>1</sup>, Edson Luiz Tarsia Duarte<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Aliana M. Ferreira<sup>1</sup>, Vanderson Rocha<sup>1</sup> and Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials

Bloodstream Infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2

Taniela Bes<sup>1,2\*</sup>, Debora Nagano<sup>2</sup>, Roberta Martins<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Lauro Perdigão-Neto<sup>1,2,3</sup>, Hermes Higashino<sup>1</sup>, Gladys Prado<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1,3</sup>, Anna S. Levin<sup>1,2,3</sup> and Sílvia Costa<sup>1,2,3</sup>

antibiotics

Virulomic Analysis of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Experimental Virulence Model Using *Danio rerio* (Zebrafish)

Edson Luiz Tarsia Duarte<sup>1</sup>, Camila Fonseca Rizek<sup>1,2\*</sup>, Evelyn Sanchez Espinoza<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Saily Vasconez Nogueira<sup>1,3</sup>, Marina Farrel Cortés<sup>1</sup>, Bianca H. Ventura Fernandes<sup>2</sup>, Thais Guimaraes<sup>1,3</sup>, Claudia M. D. de Maio Carrilho<sup>4</sup>, Lauro V. Perdigão Neto<sup>1</sup>, Priscila A. Trindade<sup>5</sup> and Sílvia Figueiredo Costa<sup>1</sup>

Journal Pre-proof

*Neisseria gonorrhoeae* arthritis in a patient with Systemic Lupus: resistance and virulence profiles

Vitor Falcão de Oliveira, MD, Adriana Coracini Tonacio, MD, Ana Paula Marchi<sup>1</sup> PhD, Marina Farrel Cortés, PhD, Maria Luiza Bazzo, PhD, Gabriela Takeshigue Lemos, MD, Jose Victor Bortolotto Bampi, MD, Evelyn Patricia Sanchez Espinoza, MD, Edson Luiz Tarsia Duarte, MD, Roberta Cristina Ruedas Martins, PhD, Sânia Alves dos Santos, PhD, Lauro Vieira Perdigão Neto, PhD, Ana Paula Ramalho da Costa-Lourenço, PhD, Raquel Regina Bonelli, PhD, Maria Rita Elmora, PhD, Flavia Rossi, PhD, Gwenda Hughes, PhD, Sílvia Figueiredo Costa, PhD

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORIGINAL ARTICLE

Conjugative transfer of plasmid p\_8N\_qac(MN687830.1) carrying *qacA* gene from *Staphylococcus aureus* to *Escherichia coli* C600: potential mechanism for spreading chlorhexidine resistance

Taniela Marli Bes<sup>1,2</sup>, Debora Satie Nagano<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Gaspar Camilo<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão-Neto<sup>1,2</sup>, Roberta Ruedas Martins<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1,2</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

BRIEF COMMUNICATION

Colistin-resistant *Escherichia coli* belonging to different sequence types: genetic characterization of isolates responsible for colonization, community- and healthcare-acquired infections

Yrving Paiva<sup>1</sup>, Debora Satie Nagano<sup>1</sup>, Andre Luis Franco Cortia<sup>1</sup>, Thais Guimaraes<sup>1</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>1</sup>, Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1</sup>, Marina Farrel Cortés<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Luíse Corscadden<sup>1</sup>, Anna Silva Machado<sup>1</sup>, Alexandre Inacio de Paula<sup>1</sup>, Lucas Augusto Moyses Franco<sup>1</sup>, Patricia Regina Neves<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORIGINAL ARTICLE

Susceptibility to chlorhexidine and mupirocin among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from a teaching hospital

Taniela Marli Bes<sup>1,2</sup>, Lauro Perdigão-Neto<sup>1,2</sup>, Roberta Ruedas Martins<sup>1</sup>, Inneke Heijden<sup>3</sup>, Priscila de Arruda Trindade<sup>1</sup>, Gaspar Camilo<sup>1</sup>, Debora Satie Nagano<sup>1,2</sup>, Diego Mongeloz<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Mariama Tomaz<sup>1</sup>, Larissa Marques de Oliveira<sup>1</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2</sup>

REVISTA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

ORIGINAL ARTICLE

Clinical and microbiological characteristics of patients colonized or infected by *Stenotrophomonas maltophilia*: is resistance to sulfamethoxazole/trimethoprim a problem?

Elisa Teixeira Mendes<sup>1</sup>, Jorge Isaac Garcia Paez<sup>1</sup>, Juliana Rosa Ferraz<sup>1</sup>, Ana Paula Marchi<sup>1</sup>, Ivan Leonardo Avelino França e Silva<sup>1</sup>, Marjorie Vieira Batista<sup>1</sup>, Ana Lucia Munhoz de Lima<sup>1</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Anna Sara Levin<sup>1</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>1,2,3</sup>

Short Communication

Alternative drugs against multiresistant Gram-negative bacteria

Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>a,b,c</sup>, Maura Salaroli Oliveira<sup>a</sup>, Tatiana D'Annibale Orsi<sup>b</sup>,  
Cláudia Villas Boas do Prado<sup>d</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>d</sup>, Gleice Cristina Leite<sup>b</sup>,  
Ana Paula Marchi<sup>d</sup>, Esther Sant'Ana de Lira<sup>e</sup>, Marina Farrel Côrtes<sup>e</sup>,  
Evelyn Patrícia Sanchez Espinoza<sup>f</sup>, Cláudia Maria Dantas de Maio Carrilho<sup>g</sup>,  
Ícaro Boszczowski<sup>h</sup>, Thais Guimarães<sup>h</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>h</sup>, Anna S. Levin<sup>a,b</sup>

Bone Marrow Transplantation (2019) 54:1118–1120  
<https://doi.org/10.1038/s41409-018-0416-x>

CORRESPONDENCE

Colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit

Hermes Ryoiti Higashino<sup>a</sup>, Ana Paula Marchi<sup>d</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>d</sup>, Marjorie Vieira Batista<sup>1</sup>,  
Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>a</sup>, Victor Augusto Camarinha de Castro Lima<sup>a</sup>, Flavia Rossi<sup>1</sup>, Thais Guimarães<sup>h</sup>,  
Anna Sara Levin<sup>1,2</sup>, Vanderson Rocha<sup>3</sup>, Sílvia Figueiredo Costa<sup>3,2</sup>

Fosfomycin in severe infections due to genetically distinct pan-drug-resistant Gram-negative microorganisms: synergy with meropenem

Lauro Vieira Perdigão Neto<sup>1,2\*</sup>, Mauro S. Oliveira<sup>1,2</sup>, Roberta Cristina Ruedas Martins<sup>3</sup>, Ana Paula Marchi<sup>2</sup>,  
Juliana Januário Gaudereto<sup>2</sup>, Lucianne Auxi Teixeira Josino da Costa<sup>4</sup>, Lúcia Fernandes Alves de Lima<sup>5</sup>,  
Christianne Fernandes Valente Takeda<sup>6</sup>, Sílvia F. Costa<sup>2</sup> and Anna S. Levin<sup>1,2</sup>

## **9. REFERÊNCIAS**

---

1. Abuzaid AA, Amyes SG. The genetic environment of the antiseptic resistance genes *qacEΔ1* and *cepA* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Chemother*. 2015 Jun;27(3):139-44. doi: 10.1179/1973947814Y.0000000181. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24617302.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa 2021. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos-1/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos>. Disponível em: Acesso em 28 de outubro de 2022.
3. Alav I, Kobylka J, Kuth MS, Pos KM, Picard M, Blair JMA, Bavro VN. Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. *Chem Rev*. 2021 May 12;121(9):5479-5596. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00055. Epub 2021 Apr 28. PMID: 33909410.
4. Al-Hazmi HH, Al-Zahrani T, Elmalky AM. Hospital acquired blood stream infection as an adverse outcome for patients admitted to hospital with other principle diagnosis. *Saudi J Anaesth*. 2014 Nov;8:S84-8. doi: 10.4103/1658-354X.144084.
5. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
6. Anyiwo CE, Coker AO, Daniel SO. *Pseudomonas aeruginosa* in postoperative wounds from chlorhexidine solutions. *J Hosp Infect*. 1982 Jun;3(2):189-91. doi: 10.1016/0195-6701(82)90013-5. PMID: 6181138.
7. Assefa M, Amare A. Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections: A Review. *Infect Drug Resist*. 2022 Aug 31;15:5061-5068. doi: 10.2147/IDR.S379502. PMID: 36068834; PMCID: PMC9441148.
8. Bassett DC, Stokes KJ, Thomas WR. Wound infection with *Pseudomonas multivorans*. A water-borne contaminant of disinfectant solutions. *Lancet*. 1970 Jun 6;1(7658):1188-91. doi: 10.1016/s0140-6736(70)91783-6. PMID: 4192375.
9. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, Piddock LJ, Webber MA. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. *J Antimicrob*

- Chemother. 2014 Mar;69(3):673-81. doi: 10.1093/jac/dkt420. Epub 2013 Oct 31. PMID: 24176982.
10. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol.* 2014 May;31(5):1077-88. doi: 10.1093/molbev/msu088. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24600054; PMCID: PMC3995342.
  11. Bhatta DR, Hamal D, Shrestha R, Hosuru Subramanya S, Baral N, Singh RK, Nayak N, Gokhale S. Bacterial contamination of frequently touched objects in a tertiary care hospital of Pokhara, Nepal: how safe are our hands? *Antimicrob Resist Infect Control.* 2018 Aug 6;7:97. doi: 10.1186/s13756-018-0385-2. PMID: 30128144; PMCID: PMC6091187.
  12. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2014;9(10):1165-77. doi: 10.2217/fmb.14.66. PMID: 25405886.
  13. Bolla JR, Howes AC, Fiorentino F, Robinson CV. Assembly and regulation of the chlorhexidine-specific efflux pump AceI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jul 21;117(29):17011-17018. doi: 10.1073/pnas.2003271117. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32636271; PMCID: PMC7382281.
  14. Boncompagni SR, Micieli M, Di Maggio T, Aiezza N, Antonelli A, Giani T, Padoani G, Vailati S, Pallecchi L, Rossolini GM. Activity of fosfomycin/colistin combinations against planktonic and biofilm Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2022 Jul 28;77(8):2199-2208. doi: 10.1093/jac/dkac142. PMID: 35512342.
  15. Boonyasiri A, Thaisiam P, Permpikul C, Judaeng T, Suiwongsa B, Apiradeewajeset N, Fakthongphan T, Suddee S, Laoagtipparos W, Thamlikitkul V. Effectiveness of Chlorhexidine Wipes for the Prevention of Multidrug-Resistant Bacterial Colonization and Hospital-Acquired Infections in Intensive Care Unit Patients: A Randomized Trial in Thailand. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2016; 37:245–253.
  16. Braga IA, Campos PA, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Multi-hospital point prevalence study of healthcare-associated infections in 28 adult intensive care units in Brazil. *J Hosp Infect.* 2018 Jul;99(3):318-324. doi: 10.1016/j.jhin.2018.03.003.

17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Brasília: Anvisa, 2017
18. Carrasco LDM, Dabul ANG, Boralli CMDS, Righetto GM, Carvalho ISE, Dornelas JV, Martins da Mata CPS, de Araújo CA, Leite EMM, Lincopan N, Camargo ILBDC. Polymyxin Resistance Among XDR ST1 Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clone Expanding in a Teaching Hospital. *Front Microbiol.* 2021 Mar 26;12:622704. doi: 10.3389/fmicb.2021.622704. PMID: 33897637; PMCID: PMC8063854.
19. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE) 2020. Disponível em: [https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/dados/ih2020\\_dados\\_hospitais\\_gerais.pdf](https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/dados/ih2020_dados_hospitais_gerais.pdf)
20. Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, Rizek C, Neves P, Batista MV, Amigo U, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *J Med Microbiol.* 2017 Dec;66(12):1722-1729. doi: 10.1099/jmm.0.000631. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29095142.
21. Chen J, Kuroda T, Huda MN, Mizushima T, Tsuchiya T. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Aug;52(2):176-9. doi: 10.1093/jac/dkg308. Epub 2003 Jul 1. PMID: 12837741.
22. Chen Y, Liao K, Huang Y, Guo P, Huang H, Wu Z, Liu M. Determining the susceptibility of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains against common disinfectants at a tertiary hospital in China. *BMC Infect Dis.* 2020 Jan 30;20(1):88. doi: 10.1186/s12879-020-4813-6. PMID: 32000698; PMCID: PMC6993419.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), supplement M100. Wayne, PA: 2018
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Control Parameters. 5th ed. CLSI guideline M23. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Institute, 2018.
25. Controle de Infecção em Serviços de Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Disponível em:

- <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/legis.htm>. Acesso em 31/10/2022.
26. Coyle-Gilchrist MM, Crewe P, Roberts G. *Flavobacterium meningosepticum* in the hospital environment. *J Clin Pathol*. 1976 Sep;29(9):824-6.
  27. de Frutos M, López-Urrutia L, Domínguez-Gil M, Arias M, Muñoz-Bellido JL, Eiros JM, Ramos C. *Serratia marcescens* outbreak due to contaminated 2% aqueous chlorhexidine. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Dec;35(10):624-629. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2016.06.016. Epub 2016 Aug 3. PMID: 27495382.
  28. Duszyńska W, Adamik B, Lentka-Bera K, Kulpa K, Nieckula-Schwarz A, Litwin A, Stróżecki Ł, Kübler A. Effect of universal chlorhexidine decolonisation on the infection rate in intensive care patients. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2017;49(1):28-33. doi: 10.5603/AIT.2017.0007. PMID: 28362030.
  29. Ebrahimi A, Hemati M, Habibian Dehkordi S, Bahadoran S, Khoshnood S, Khubani S, Dokht Faraj M, Hakimi Alni R. Chlorhexidine digluconate effects on planktonic growth and biofilm formation in some field isolates of animal bacterial pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2014 Apr 14;9(2):e14298. doi: 10.17795/jjnpp-14298. PMID: 24872940; PMCID: PMC4036379.
  30. Elias R, Melo-Cristino J, Lito L, Pinto M, Gonçalves L, Campino S, Clark TG, Duarte A, Perdigão J. *Klebsiella pneumoniae* and Colistin Susceptibility Testing: Performance Evaluation for Broth Microdilution, Agar Dilution and Minimum Inhibitory Concentration Test Strips and Impact of the "Skipped Well" Phenomenon. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Dec 14;11(12):2352. doi: 10.3390/diagnostics11122352. PMID: 34943590; PMCID: PMC8700027.
  31. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol*. 2016 Apr-Jun;33(2):63-75. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.001. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27296911.
  32. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distributions and epidemiological cut-off value (ECOFF) setting, EUCAST SOP 10.1, 2019. <http://www.eucast.org>.
  33. Fernández AL, Adrio B, Martínez Cereijo JM, Martínez Monzonis MA, El-Diasty MM, Alvarez Escudero J. Clinical study of an outbreak of postoperative



- mediastinitis caused by *Serratia marcescens* in adult cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2020 Apr 1;30(4):523-527. doi: 10.1093/icvts/ivz312. PMID: 31958124.
34. Fleiss J. 1981. *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed. New York: Wiley.
  35. Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci*. 1996 Dec;12(6):543-8. doi: 10.1093/bioinformatics/12.6.543. PMID: 9021275.
  36. Goodarzi R, Yousefimashouf R, Taheri M, Nouri F, Asghari B. Susceptibility to biocides and the prevalence of biocides resistance genes in clinical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Hamadan, Iran. *Mol Biol Rep*. 2021 Jun;48(6):5275-5281. doi: 10.1007/s11033-021-06533-4. Epub 2021 Jul 10. PMID: 34245410.
  37. Gual-de-Torrella A, Delgado-Valverde M, Pérez-Palacios P, Oteo-Iglesias J, Pascual Á, Fernández-Cuenca F. In vitro activity of six biocides against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and presence of genes encoding efflux pumps. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2022 Aug-Sep;40(7):371-376. doi: 10.1016/j.eimce.2021.05.016. PMID: 35906031.
  38. Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, Giard JC. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov;71(11):3058-3061. doi: 10.1093/jac/dkw260. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27494907.
  39. Guo J, Li C. Molecular epidemiology and decreased susceptibility to disinfectants in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients in central China. *J Infect Public Health*. 2019 Nov-Dec;12(6):890-896. doi: 10.1016/j.jiph.2019.06.007. Epub 2019 Jun 21. PMID: 31230951.
  40. Hassan KA, Jackson SM, Penesyan A, Patching SG, Tetu SG, Eijkelkamp BA, Brown MH, Henderson PJ, Paulsen IT. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 10;110(50):20254-9. doi: 10.1073/pnas.1317052110. Epub 2013 Nov 25. PMID: 24277845; PMCID: PMC3864336.
  41. Hemati S, Kouhsari E, Sadeghifard N, Maleki A, Omidi N, Mahdavi Z, Pakzad I. Sub-minimum inhibitory concentrations of biocides induced biofilm formation in

- Pseudomonas aeruginosa*. *New Microbes New Infect.* 2020 Oct 19;38:100794. doi: 10.1016/j.nmni.2020.100794. PMID: 33240514; PMCID: PMC7674602.
42. Heo ST, Kim SJ, Jeong YG, Bae IG, Jin JS, Lee JC. Hospital outbreak of *Burkholderia stabilis* bacteraemia related to contaminated chlorhexidine in haematological malignancy patients with indwelling catheters. *J Hosp Infect.* 2008 Nov;70(3):241-5. doi: 10.1016/j.jhin.2008.07.019. PMID: 18799235.
43. Hervé B, Chomali M, Gutiérrez C, Luna M, Rivas J, Blamey R, Espinoza R, Izquierdo G, Cabezas C, Alvarez C, de la Fuente S. Brote de infección nosocomial por *Serratia marcescens* asociado a contaminación intrínseca de clorhexidina acuosa [Outbreak due to *Serratia marcescens* associated with intrinsic contamination of aqueous chlorhexidine]. *Rev Chilena Infectol.* 2015 Oct;32(5):517-22. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182015000600004. PMID: 26633107.
44. Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing, and does it matter? *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov;67(11):2547-59. doi: 10.1093/jac/dks284. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22833635.
45. Kadry AA, Serry FM, El-Ganiny AM, El-Baz AM. Integron occurrence is linked to reduced biocide susceptibility in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Br J Biomed Sci.* 2017 Apr;74(2):78-84. doi: 10.1080/09674845.2017.1278884. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28281934.
46. Kampf, G. Acquired resistance to chlorhexidine e is it time to establish an ‘antiseptic stewardship’ initiative? *Journal of Hospital Infection*, 94:213-227, 2016.
47. Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacE* delta 1 in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Feb 15;159(2):173-8. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb12857.x. PMID: 9503610.
48. Keck N, Dunie-Merigot A, Dazas M, Hirchaud E, Laurence S, Gervais B, Madec JY, Haenni M. Long-lasting nosocomial persistence of chlorhexidine-resistant *Serratia marcescens* in a veterinary hospital. *Vet Microbiol.* 2020 Jun;245:108686. doi: 10.1016/j.vetmic.2020.108686. Epub 2020 Apr 15. PMID: 32456825.

49. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*. 2018 Dec 28;4(12):e01067. doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067. PMID: 30619958; PMCID: PMC6312881.
50. Ko S, An HS, Bang JH, Park SW. An outbreak of *Burkholderia cepacia* complex pseudobacteremia associated with intrinsically contaminated commercial 0.5% chlorhexidine solution. *Am J Infect Control*. 2015 Mar 1;43(3):266-8. doi: 10.1016/j.ajic.2014.11.010. Epub 2015 Jan 1. PMID: 25557770.
51. Konwar AN, Hazarika SN, Bharadwaj P, Thakur D. Emerging Non-Traditional Approaches to Combat Antibiotic Resistance. *Curr Microbiol*. 2022 Sep 25;79(11):330. doi: 10.1007/s00284-022-03029-7. PMID: 36155858; PMCID: PMC9510247.
52. Krishnamoorthy S, Shah BP, Lee HH, Martinez LR. Microbicides Alter the Expression and Function of RND-Type Efflux Pump AdeABC in Biofilm-Associated Cells of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct 12;60(1):57-63. doi: 10.1128/AAC.01045-15. PMID: 26459900; PMCID: PMC4704159.
53. La Combe B, Bleibtreu A, Messika J, Fernandes R, Clermont O, Branger C, Billard-Pomares T, Barnaud G, Magdoud F, Eveillard M, Kouatchet A, Lasocki S, Asfar P, Corvec S, Lakhal K, Armand-Lefevre L, Wolff M, Timsit JF, Bourdon S, Reignier J, Martin S, Fihman V, de Prost N, Bador J, Charles PE, Goret J, Boyer A, Wallet F, Jaillette E, Nseir S, Landraud L, Ruimy R, Danin PE, Dellamonica J, Cremniter J, Frat JP, Jauréguy F, Clec'h C, Decré D, Maury E, Dreyfuss D, Denamur E, Ricard JD. Decreased susceptibility to chlorhexidine affects a quarter of *Escherichia coli* isolates responsible for pneumonia in ICU patients. *Intensive Care Med*. 44(4):531-533, 2018
54. Lamy B1, Laurent F, Kodjo A, Roger F, Jumas-Bilak E; colBVH Study Group, Marchandin H. Which antibiotics and breakpoints should be used for *Aeromonas* susceptibility testing? Considerations from a comparison of agar dilution and disk diffusion methods using Enterobacteriaceae breakpoints. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 31(9):2369-2377, 2012.
55. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Clin Microbiol*.

- 2013 Dec;51(12):4106-11. doi: 10.1128/JCM.02129-13. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24088860; PMCID: PMC3838098.
56. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012 Apr;50(4):1355-61. doi: 10.1128/JCM.06094-11. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22238442; PMCID: PMC3318499.
57. Lee S, Han SW, Kim G, Song DY, Lee JC, Kwon KT. An outbreak of *Burkholderia cenocepacia* associated with contaminated chlorhexidine solutions prepared in the hospital. *Am J Infect Control.* 2013 Sep;41(9):e93-6. doi: 10.1016/j.ajic.2013.01.024. Epub 2013 Apr 19. PMID: 23608047.
58. Leshem T, Gilron S, Azrad M, Peretz A. Characterization of reduced susceptibility to chlorhexidine among Gram-negative bacteria. *Microbes Infect.* 2022 Mar;24(2):104891. doi: 10.1016/j.micinf.2021.104891. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34628010.
59. Lin F, Xu Y, Chang Y, Liu C, Jia X, Ling B. Molecular Characterization of Reduced Susceptibility to Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2017 Sep 26;8:1836. doi: 10.3389/fmicb.2017.01836. PMID: 29018420; PMCID: PMC5622949.
60. Litwin A, Fedorowicz O, Duszynska W. Characteristics of Microbial Factors of Healthcare-Associated Infections Including Multidrug-Resistant Pathogens and Antibiotic Consumption at the University Intensive Care Unit in Poland in the Years 2011-2018. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Sep 23;17(19):6943. doi: 10.3390/ijerph17196943. PMID: 32977435; PMCID: PMC7579392.
61. Liu Q, Hassan KA, Ashwood HE, Gamage HKAH, Li L, Mabbutt BC, Paulsen IT. Regulation of the *aceI* multidrug efflux pump gene in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother.* 2018 Jun 1;73(6):1492-1500. doi: 10.1093/jac/dky034. PMID: 29481596; PMCID: PMC5961012.
62. Marion-Sanchez K, Pailla K, Cesarine M, Platon MG, Derancourt C, Olive C. *Achromobacter xylosoxidans* resistance to antiseptics and disinfectants is far from obvious. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 Jun 1;113(6):356-358. doi: 10.1093/trstmh/trz016. PMID: 30892650.

63. 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 Dec;53(12):5230-5. doi: 10.1128/AAC.00631-09. Epub 2009 Sep 14. PMID: 19752278; PMCID: PMC2786342.
64. Matuschek E, Åhman J, Webster C, Kahlmeter G. Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2018 Aug;24(8):865-870. doi: 10.1016/j.cmi.2017.11.020. Epub 2017 Dec 5. PMID: 29221995.
65. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics, and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jan;12(1):147-79. doi: 10.1128/CMR.12.1.147. Erratum in: *Clin Microbiol Rev* 2001 Jan;14(1):227. PMID: 9880479; PMCID: PMC88911.
66. Mendes, E.T.; Ranzani, O. T.; Marchi, A. P.; Silva, M. T; Filho, J. U. A.; Alves, T.; Guimarães, T., Levin, A. S.; Costa, S. F. Chlorhexidine bathing for the prevention of colonization and infection with multidrug-resistant microorganisms in a hematopoietic stem cell transplantation unit over a 9-year period: Impact on chlorhexidine susceptibility. *Medicine*, 95:1-8, 2016.
67. Migliaccio A, Esposito EP, Bagattini M, Berisio R, Triassi M, De Gregorio E, Zarrilli R. Inhibition of AdeB, AceI, and AmvA Efflux Pumps Restores Chlorhexidine and Benzalkonium Susceptibility in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. *Front Microbiol*. 2022 Feb 7;12:790263. doi: 10.3389/fmicb.2021.790263. PMID: 35197939; PMCID: PMC8859242.
68. Mombeshora M, Mukanganyama S. Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes*. 2017 Jul 26;10(1):328. doi: 10.1186/s13104-017-2637-2. PMID: 28747232; PMCID: PMC5530522.
69. Morillo Á, Torres MJ, Alonso Salas MT, Conde M, Aznar J. Implicación de un brote nacional de infección por *Serratia marcescens* asociado a clorhexidina contaminada en un hospital pediátrico [Implication of a national outbreak of

- Serratia marcescens* associated with a contaminated solution of chlorhexidine in a paediatric hospital]. *An Pediatr (Eng Ed)*. 2018 Mar;88(3):171-172. Spanish. doi: 10.1016/j.anpedi.2017.04.007. Epub 2017 May 30. PMID: 28571897.
70. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol*. 2014 Jan 8;4:422. doi: 10.3389/fmicb.2013.00422. PMID: 24409175; PMCID: PMC3884212.
71. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, Martinez JL; BIOHYPO Consortium. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically relevant microorganisms. *PLoS One*. 2014 Jan 23;9(1):e86669. doi: 10.1371/journal.pone.0086669. PMID: 24466194; PMCID: PMC3900580.
72. Musau J, Baumann A, Kolotylo C, O'Shea T, Bialachowski A. Infectious disease outbreaks and increased complexity of care. *Int Nurs Rev*. 2015 Sep;62(3):404-11. doi: 10.1111/inr.12188. Epub 2015 Apr 28. PMID: 25922983.
73. Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect*. 2012 May;81(1):15-9. doi: 10.1016/j.jhin.2012.02.007. Epub 2012 Mar 30. PMID: 22463977.
74. Neopane P, Nepal HP, Shrestha R, Uehara O, Abiko Y. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *Int J Gen Med*. 2018 Jan 18;11:25-32. doi: 10.2147/IJGM.S153268. PMID: 29403304; PMCID: PMC5779313.
75. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med*. 2010 May 13;362(19):1804-13. doi: 10.1056/NEJMra0904124. PMID: 20463340; PMCID: PMC3107499.
76. Prasetyoputri A, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. The Eagle Effect and Antibiotic-Induced Persistence: Two Sides of the Same Coin? *Trends Microbiol*. 2019 Apr;27(4):339-354. doi: 10.1016/j.tim.2018.10.007. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30448198.
77. Prażyńska M, Bogiel T, Gospodarek-Komkowska E. In vitro activity of micafungin against biofilms of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* at different stages of maturation. *Folia Microbiol (Praha)*. 2018

- Mar;63(2):209-216. doi: 10.1007/s12223-017-0555-2. Epub 2017 Oct 5. PMID: 28983822.
78. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Feb;65(2):228-32. doi: 10.1093/jac/dkp427. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20008046.
79. Rojo-Molinero E, Hidalgo O, Balliu PR, Oliver A. Análisis molecular de un brote por *Serratia marcescens* y su posible relación con el uso de una solución de clorhexidina [Molecular analysis of an outbreak of *Serratia marcescens* and its possible connection with the use of a chlorhexidine solution]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 Nov;34(9):603-604. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2016.01.002. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26850716.
80. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA and Barrell B. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2000;16;10:944-5
81. Ryan MP, Pembroke JT, Adley CC. *Ralstonia pickettii*: a persistent gram-negative nosocomial infectious organism. *J Hosp Infect.* 2006 Mar;62(3):278-84. doi: 10.1016/j.jhin.2005.08.015. Epub 2005 Dec 6. PMID: 16337309.
82. Salipante SJ, SenGupta DJ, Cummings LA, Land TA, Hoogestraat DR, Cookson BT. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol.* 2015 Apr;53(4):1072-9. doi: 10.1128/JCM.03385-14. Epub 2015 Jan 28.
83. Sandner-Miranda L, Vinuesa P, Cravioto A, Morales-Espinosa R. The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*. *Front Microbiol.* 2018 May 11;9:828. doi: 10.3389/fmicb.2018.00828. PMID: 29867787; PMCID: PMC5958200.
84. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, Bjarnsholt T. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022 Oct;20(10):608-620. doi: 10.1038/s41579-022-00767-0. Epub 2022 Aug 3. PMID: 35922483.
85. Schulster L, Chinn RY; CDC; HICPAC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare

- Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). MMWR Recomm Rep. 2003 Jun 6;52(RR-10):1-42. PMID: 12836624.
86. Sekyere, J. O.; Amoako, D. G. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in microbiology*, 8: 2017.
  87. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res.* 2019 Feb;149(2):129-145. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_2079\_17. PMID: 31219077; PMCID: PMC6563736.
  88. Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infect Genet Evol.* 2016 Aug;42:60-5. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.024. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27108807.
  89. Slipski CJ, Zhanel GG, Bay DC. Biocide Selective TolC-Independent Efflux Pumps in Enterobacteriaceae. *J Membr Biol.* 2018 Feb;251(1):15-33. doi: 10.1007/s00232-017-9992-8. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29063140; PMCID: PMC5840245.
  90. Spengler G, Kincses A, Gajdács M, Amaral L. New Roads Leading to Old Destinations: Efflux Pumps as Targets to Reverse Multidrug Resistance in Bacteria. *Molecules.* 2017 Mar 15;22(3):468. doi: 10.3390/molecules22030468. PMID: 28294992; PMCID: PMC6155429.
  91. Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, Chauhan NK, Rajamohan G. Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2014 May 13;9(5):e96288. doi: 10.1371/journal.pone.0096288. PMID: 24823362; PMCID: PMC4019481.
  92. Stallbaum LR, Pruski BB, Amaral SC, de Freitas SB, Wozeak DR, Hartwig DD. Phenotypic and molecular evaluation of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) isolates obtained from a hospital of Pelotas, RS, Brazil. *J Med Microbiol.* 2021 Nov;70(11). doi: 10.1099/jmm.0.001451. PMID: 34779756.
  93. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology, and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Oct 17;453(2):254-67. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.090. Epub 2014 May 27.



- Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Sep 11;465(1):165. PMID: 24878531.
94. Swan JT, Ashton CM, Bui LN, Pham VP, Shirkey BA, Blackshear JE, Bersamin JB, Pomer RM, Johnson ML, Magtoto AD, Butler MO, Tran SK, Sanchez LR, Patel JG, Ochoa RA Jr, Hai SA, Denison KI, Graviss EA, Wray NP. Effect of Chlorhexidine Bathing Every Other Day on Prevention of Hospital-Acquired Infections in the Surgical ICU: A Single-Center, Randomized Controlled Trial. *Crit Care Med.* 2016 Oct;44(10):1822-32. doi: 10.1097/CCM.0000000000001820. PMID: 27428384.
  95. Touzel RE, Sutton JM, Wand ME. Establishment of a multi-species biofilm model to evaluate chlorhexidine efficacy. *J Hosp Infect.* 2016 Feb;92(2):154-60. doi: 10.1016/j.jhin.2015.09.013. Epub 2015 Oct 23. PMID: 26597632.
  96. Turlej-Rogacka A, Xavier BB, Janssens L, Lammens C, Zarkotou O, Pournaras S, Goossens H, Malhotra-Kumar S. Evaluation of colistin stability in agar and comparison of four methods for MIC testing of colistin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018 Feb;37(2):345-353. doi: 10.1007/s10096-017-3140-3. Epub 2017 Nov 25. PMID: 29177612; PMCID: PMC5780530.
  97. Van den Poel B, Saegeman V, Schuermans A. Increasing usage of chlorhexidine in health care settings: blessing or curse? A narrative review of the risk of chlorhexidine resistance and the implications for infection prevention and control. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2022 Mar;41(3):349-362. doi: 10.1007/s10096-022-04403-w. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35048278.
  98. Vergnano S. Decolonization and decontamination: what's their role in infection control? *Curr Opin Infect Dis.* 2015 Jun;28(3):207-14. doi: 10.1097/QCO.000000000000164. PMID: 25918955.
  99. Verschraegen G, Claeys G, Meeus G, Delanghe M. *Pseudomonas pickettii* as a cause of pseudobacteremia. *J Clin Microbiol.* 1985 Feb;21(2):278-9. doi: 10.1128/JCM.21.2.278-279.1985. PMID: 3973002; PMCID: PMC271635.
  100. Vicari, G.; Bauer, S. R.; Neuner, E. A.; Lam, S. W. Association between colistin dose and microbiologic outcomes in patients with multidrug-resistant gram-negative bacteremia. *Clinical infectious diseases*, 56:398-404, 2012.
  101. Vijayakumar R, Sandle T, Al-Aboody MS, Alfonaisan MK, Alturaiki W, Mickymaray S, Premanathan M, Alsagaby SA. Distribution of biocide

- resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* — A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health*, Jun, 2018.
102. Vu-Thien H, Darbord JC, Moissenet D, Dulot C, Dufourcq JB, Marsol P, Garbarg-Chenon A. Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998 Oct;17(10):724-6. doi: 10.1007/s100960050168. PMID: 9865987.
103. Wand ME, Jamshidi S, Bock LJ, Rahman KM, Sutton JM. SmvA is an important efflux pump for cationic biocides in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae. *Sci Rep*. 2019 Feb 4;9(1):1344. doi: 10.1038/s41598-018-37730-0. PMID: 30718598; PMCID: PMC6362122.
104. Wand, M. E.; Bock, L. J.; Bonney, L. C.; Sutton, M. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to chlorhexidine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61: e01162-16, 2017.
105. Wang D, Ning Q, Deng Z, Zhang M, You J. Role of environmental stresses in elevating resistance mutations in bacteria: Phenomena and mechanisms. *Environ Pollut*. 2022 Aug 15;307:119603. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119603. Epub 2022 Jun 9. PMID: 35691443.
106. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Dec;51(12):4217-24. doi: 10.1128/AAC.00138-07. Epub 2007 Oct 1. PMID: 17908945; PMCID: PMC2167968.
107. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge Clean Care Is Safer Care. Geneva: World Health Organization; 2009. PMID: 23805438.
108. Zand F, Zahed L, Mansouri P, Dehghanrad F, Bahrani M, Ghorbani M. The effects of oral rinse with 0.2% and 2% chlorhexidine on oropharyngeal colonization and ventilator associated pneumonia in adults' intensive care units. *J Crit Care*. 2017; 40:318-322.

109. Zanichelli V, Pavoni C, Eastmond J, Longtin Y. Microbiological efficacy and skin tolerance of commonly used nonantiseptic inpatient bathing practices in non-ICU settings: A systematic review. *Am J Infect Control*. 2021 May;49(5):603-607. doi: 10.1016/j.ajic.2020.09.011. Epub 2020 Oct 1. PMID: 33011337.
110. Zhou Y, Zhang S. Early prediction models for extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* infection in emergency department: A protocol for systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Apr 16;100(15):e25504. doi: 10.1097/MD.00000000000025504. PMID: 33847667; PMCID: PMC8052042.
111. Zimmermann S, Klinger-Strobel M, Bohnert JA, Wendler S, Rödel J, Pletz MW, Löffler B, Tuscherr L. Clinically Approved Drugs Inhibit the *Staphylococcus aureus* Multidrug NorA Efflux Pump and Reduce Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2019 Dec 3;10:2762. doi: 10.3389/fmicb.2019.02762. PMID: 31849901; PMCID: PMC6901667.