

Anderson Fernandes Santos

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE MARCAS
COMERCIAIS DE BIOCIDAS CONTRA CLONES BACTERIANOS
DISSEMINADOS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.**

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Anderson Fernandes Santos

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE MARCAS
COMERCIAIS DE BIOCIDAS CONTRA CLONES BACTERIANOS
DISSEMINADOS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola
Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências pelo programa de pós-
graduação em Infectologia.**

Orientadora: Ana Cristina Gales

São Paulo

2009

Santos, Anderson Fernandes

Comparação da atividade *in vitro* de marcas comerciais de biocidas contra clones bacterianos disseminados no território brasileiro. / Anderson Fernandes Santos -- São Paulo, 2009.

xvi, 108f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Infectologia.

Título em inglês: Assesment of the *in vitro* activity of different commercial brands of biocides against bacterial clones disseminated in the Brazilian territory.

1. Biocidas. 2. Desinfetantes. 3. Antissépticos. 4. Resistência bacteriana. 5. Clorexidina.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento: Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola
Coordenador do Curso de Pós-graduação: Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Andeson Fernandes Santos

**COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DE MARCAS
COMERCIAIS DE BIOCIDAS CONTRA CLONES BACTERIANOS
DISSEMINADOS NO TERRITÓRIO BRASILEIRO**

Presidente da banca:

Profa. Dra. Ana Cristina Gales

BANCA EXAMINADORA

Titular: Profa. Dra. Marinês Dalla Valle Martino

Titular: Profa. Dra. Julia Yaeko Kawagoe

Titular: Prof. Dr. Celso Luíz Cardoso

Suplente: Profa. Dra. Luci Corrêa

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Elizabete e Agnaldo, sempre presentes em minha vida, me encorajando para seguir em frente em todos os momentos difíceis que passei até aqui. Obrigado pelo amor incondicional, exemplo de caráter e pela sabedoria que não se encontra em livro algum.

Às minhas irmãs, Amanda e Caroline,
pelo companheirismo e amor incondicional
que nos une. Vocês são e sempre serão
o meu maior elo com o passado.

Ao meu querido primo
Diogo (*in memoriam*),
com todo meu amor.

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e pela força para eu chegar até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Cristina Gales, exemplo de garra e caráter a ser seguido. Muito obrigado por ter confiado em mim, no meu trabalho e por todas as oportunidades concedidas nesses anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos C. Pignatari por sempre estimular os jovens pesquisadores com os ensinamentos diários. Obrigado pela confiança.

À toda minha família, principalmente minhas avós, Josepha Serafim e Maria Plácido, meus tios, Hélio, Sidney, Cido e Sílvio, e meus primos, Marcos, Daniel, Fernando, Priscila, Bruno e Murilo.

À Stephanie Ghise, namorada, amiga e companheira, pelo incentivo, não só neste, mas em todos os meus projetos. Obrigado por abrir mão de tantos momentos, por toda a paciência, amor e carinho.

Aos mestrandos Adriana Nicoletti e Vinícius Gomes, pela ajuda na realização da fase experimental desse trabalho e incontáveis momentos de descontração.

Aos amigos Leandro, Natalie Ghise, Thiago Fedele, Heder Frank, Franciele Saito, Michelli Saito, Valter Válido, Felipe Cupolilo, Cristina, Paula Terra, Luana, Rafael, Danilo Aquino, Danilo Evangelista, Filipe Salatino, Thiago Tonhon e Greg. Muito obrigado pela força e pelos momentos de alegria proporcionados.

Aos amigos e colegas do grupo LEMC/ALERTA da UNIFESP, Jussimara, Renata, Paulo, Fernanda Inoue, Alinne, Paula Ignez, Danilo, Andréa, Marco Zonta, Kelly, Rodrigo, Kátia, Thomas, Eliete, Vitor, Raquel, André, Cecília Godoy, Mirian, Soraya, Charlys, Rosana, Ana Carolina, Paula Peraro, Eloiza, Fernanda Marquês, Bruna, Cecília Cergoli, Roberto, Adryela, Guilherme Furtado, Martha, Loren, Talita e Cynthea.

À Mariana Castanheira, Rodrigo Mendes, Prof. Dr. Hélio Sader e ao grupo do Special Microbiology Laboratory, em Iowa City, especialmente, Linda Boyken, Sam Messer, Rick Hollis, Jennifer Kroeger e Shailesh Tendolkar, pelos ensinamentos em PFGE, momentos de descontração e calorosa acolhida.

Ao Sr. Orazil e Elaine, pelo exemplo de determinação e caráter.

À Prof. Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim, por nos ceder gentilmente uma amostra de *P. aeruginosa* com sensibilidade reduzida a biocidas.

A todos os colegas e amigos do Hospital Albert Einstein, especialmente, Dra. Marinês, Itacy Siqueira, Dr. Jacyr e Dra. Luci.

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos	4
1.1.1 Objetivo principal	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Biocidas.....	5
2.1.1 Mecanismo de Ação dos Biocidas	6
2.1.2 Clorexidina.....	6
2.1.3 Triclosan	8
2.1.4 Cloreto de Benzalcônio	9
2.1.5 PVP-I	11
2.1.6 Teste de sensibilidade e tolerância aos biocidas.....	11
2.1.7 Mecanismos de resistência aos biocidas	14
2.2 Desinfecção em instituições de assistência à saúde.....	17
2.3 Infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros ..	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Amostras Bacterianas	27
3.2 Biocidas.....	28
3.2.1 Biocidas testados	28
3.2.2 Concentração das soluções de teste dos Biocidas	28
3.4 Teste de Sensibilidade aos Biocidas pelo Método de Suspensão Direta	29
3.4.1 Preparação das Culturas de Trabalho.....	30
3.4.2. Suspensão Teste.....	30
3.4.3 Suspensão de Validação	30
3.4.4 Contagem de Colônias	30
3.4.5 Critérios para contagem das colônias	31

3.4.6	Determinação da atividade do Biocida	31
3.5	Controles da técnica.....	32
3.5.1	Controle experimental “A”	32
3.5.2	Controle experimental “B”	32
3.5.3	Controle experimental “C”	33
3.6	Cálculo dos Dados Experimentais.....	33
3.6.1	Cálculo do número de colônias bacterianas das soluções testes.....	33
3.6.2	Cálculo do número de colônias bacterianas dos testes Na (Determinação da atividade do Biocida).....	34
3.6.3	Cálculo do número de colônias bacterianas das soluções de validação	34
3.6.4	Cálculo das UFC/mL dos testes de validação	35
3.6.	Análise dos resultados	36
3.6.1.	Limites Básicos.....	36
3.6.2.	Redução Logarítmica	36
3.7.	Análise do DNA cromossômico	36
4	RESULTADOS	39
4.1	Determinação da atividade dos Biocidas	39
4.2	Digluconato de Clorexidina.....	39
4.3	PVP-I.....	42
4.4	Cloreto de Benzalcônio	43
4.5	Triclosan.....	44
4.7	Controles da Técnica	52
4.8	Amostras com sensibilidade reduzida aos biocidas.	54
4.9	Análise do DNA Cromossômico	56
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	70
7	ANEXOS.....	72
8	GLOSSÁRIO	74
9	REFERÊNCIAS	76
	Abstract	92

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química da Clorexidina.....	7
Figura 2. Estrutura química do Triclosan.....	8
Figura 3. Estrutura química do Cloreto de Benzalcônio.....	10
Figura 4. Limites básicos de cada inóculo utilizado no estudo.....	36
Figura 5. Representação gráfica da redução logarítima do biocida digluconato de clorexidina marca Sigma contra as amostras avaliadas.....	41
Figura 6. Representação gráfica da redução logarítima do biocida clorexidina marca Via Farma contra as amostras avaliadas.....	41
Figura 7. Representação gráfica da redução logarítima do biocida clorexidina marca Rioquímica contra as amostras avaliadas.....	42
Figura 8. Representação gráfica da redução logarítima do biocida cloreto de benzalcônio marca Sigma contra as amostras avaliadas.....	44
Figura 9. Representação gráfica da redução logarítima do biocida triclosan marca Segmenta contra as amostras testadas.....	45
Figura 10. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 para todos os biocidas testados.....	46
Figura 11. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>S. aureus</i> MR108 SCC <i>mec</i> IVc para todos os biocidas testados.....	46
Figura 12. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>S. aureus</i> ATCC A1721 SCC <i>mec</i> III para todos os biocidas testados.....	47
Figura 13. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>E. faecalis</i> A29964 <i>vanA</i> para todos os biocidas testados.....	48
Figura 14. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 para todos os biocidas testados.....	49
Figura 15. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>P. aeruginosa</i> P10093 para todos os biocidas testados.....	49
Figura 16. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>P. aeruginosa</i> P1088 SPM-1 para todos os biocidas testados.....	50
Figura 17. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>A. baumannii</i> A1069 polimixina (R) para todos os biocidas testados.....	51
Figura 18. Representação gráfica da redução logarítima da amostra de <i>K. pneumoniae</i> A13309 IMP-1, para todos os biocidas testados.....	51
Figura 19. Análise comparativa da atividade antimicrobiana dos diferentes biocidas testados nas concentrações e tempos de contatos definidos contra todas amostras avaliadas.....	52
Figura 20. Controle “C”. Verificação da eficiência do neutralizador em inativar o biocida.....	54
Figura 21. Padrão genotípico das amostras um a 11.....	56

Figura 22. Padrão genotípico das amostras 12 a 16.....	57
Figura 23. Padrão genotípico das amostras 17 a 21.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos de ação antibacteriana dos antissépticos e desinfetantes.....	6
Tabela 2. Hierarquia descendente da resistência relativa aos germicidas entre diferentes classes microbianas.....	15
Tabela 3. Relação dos microrganismos estudados e suas características.....	28
Tabela 4. Concentração dos biocidas que foram avaliados nesse estudo.....	29
Tabela 5. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida digluconato de clorexidina das marcas comerciais Sigma, ViaFarma e Rioquímica contra as amostras estudadas.....	40
Tabela 6. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida PVP-I das marcas comerciais Rioquímica e Biosintética contra as amostras estudadas.....	42
Tabela 7. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida cloreto de benzalcônio da marca comercial Sigma contra as amostras estudadas.....	43
Tabela 8. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida Triclosan da marca comercial Segmenta contra as amostras estudadas.....	44
Tabela 9. Controles da técnica para o biocida clorexidina.....	53
Tabela 10. Controles da técnica para os biocidas triclosan e cloreto de benzalcônio.....	53
Tabela 11. Amostras bacterianas com sensibilidade reduzida aos biocidas.....	55
Tabela 12. . Padrão genotípico das amostras com sensibilidade reduzida a biocidas submetidas ao PFGE.....	56

Lista de Abreviaturas

µg - Micrograma

ATCC - "American Type Culture Collection"

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – "Clinical and Laboratory Standards Institute"

CHX - Clorexidina

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ESBL - "Extended spectrum β-lactamase"

EUA – Estados Unidos da América

IMP-1 - Imipenemase-1

IRAS – Infecções relacionadas à assistência à saúde

KPC – *Klebsilla pneumoniae* carbapenemase

LEMC - Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

mg - Miligrama

mL - Mililitro

MRSA - *S. aureus* resistente à meticilina

MSSA - *S. aureus* sensível à meticilina

OXA – Oxacilinase

PFGE – "Pulsed-field gel electrophoresis"

pH - potencial hidrogeniônico

PVP-I – Polivinil pirrolidona-iodo

QAC – Composto quaternário de amônio

SCC*mec* - "Staphylococcal Cassette Chromosome" *mec*

SPM – São Paulo Metalo-β-lactamase

TSA – Ágar de soja triptonado

TSB - Caldo soja triptonado

UFC – Unidades formadoras de colônias

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VRE - *Enterococcus* resistente à vancomicina

Resumo

Objetivo. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito microbiocida dos biocidas clorexidina, triclosan, PVP-I e cloreto de benzalcônio contra clones bacterianos resistentes disseminados no território brasileiro. **Métodos.** O efeito microbiocida do gluconato de clorexidina (nas concentrações de 0,2 e 2%), PVP-I (0,5 e 1%), cloreto de benzalcônio (5 e 10%) e triclosan (0,2 e 0,5%) foi avaliado contra duas amostras de *Staphylococcus aureus* (MRSA - SCCmec tipos III e IVc); uma amostra de *E. faecalis* resistente a vancomicina (VRE; *vanA*); uma amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1; uma amostra de *A. baumannii* resistente a polimixina e uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de IMP-1. Os testes foram realizados de acordo com "European Standard EN1040 - Quantitative Suspension Test". O neutralizador utilizado também foi preparado de acordo com a padronização EN 1040. Biocidas foram inativados após um minuto e cinco minutos de contato com as amostras testadas. O biocida que demonstrou redução ≥ 5 log no número de UFC/mL foi considerado ativo. As cepas *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 foram utilizadas como controle de qualidade do teste. A relação genética dos isolados que apresentaram redução de sensibilidade aos biocidas testados foi confirmada pela técnica de eletroforese em campo pulsado. **Resultados.** O gluconato de clorexidina e PVP-I apresentaram redução \geq cinco log no número de UFC/ml na concentração de 2%. O cloreto de benzalcônio não apresentou efeito microbiocida na concentração de 5% para as amostras de *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* Sccmec IVc, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* P10093 e ATCC 15442. Na concentração de 10% apresentou efeito microbiocida contra quase todas as amostras do teste, exceto *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* P10093 e *K. pneumoniae*. Triclosan apresentou atividade contra as amostras Gram positivas, com exceção da amostra de *E. faecalis* na concentração de 0,2%, entretanto para as amostras de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* não foi efetivo. **Conclusão.** PVP-I e clorexidina foram os agentes mais ativos contra os clones bacterianos multirresistentes. Em contraste, triclosan não apresentou efeito microbiocida contra isolados clínicos Gram negativos. A correlação da resistência entre antibióticos e biocidas ainda é pouco esclarecida e pode ser mediada por diversos mecanismos. Estudos adicionais nesse tema são extremamente importantes para determinar a importância epidemiológica dos nossos achados.

1. INTRODUÇÃO

Antissépticos e desinfetantes vêm sendo utilizados há um longo tempo. Em meados do Século XIX, Ignaz Semmelweis instituiu a desinfecção das mãos de médicos com solução clorada para prevenir a febre puerperal em clínicas obstétricas, fornecendo evidências científicas para justificar a utilização de biocidas no ambiente hospitalar (1). Desde então, vários compostos foram utilizados na prevenção de infecções bacterianas. Em instituições de assistência à saúde, são empregados, por exemplo, na desinfecção de superfícies rígidas e na assepsia tópica, sendo essenciais nas medidas de controle e prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde (2). Uma ampla variedade de agentes químicos, ou “biocidas”, pode compor o princípio ativo destes produtos, como, por exemplo, o iodo, utilizado para a limpeza de feridas e o álcool utilizado para antisepsia das mãos. O uso dos compostos quaternários de amônio como biocidas foi iniciado na década de 30. Um pouco mais tarde vários outros agentes foram introduzidos, como álcoois e fenólicos, formaldeído e peróxido de hidrogênio, e posteriormente, bisguanidas, iodoforos, bisfenóis, aldeídos, diamidinas, isocianuretos, isotiazolonas e ácido peracético. Hoje, esses produtos são constantemente utilizados com o intuito de prevenir infecção e impedir a disseminação de patógenos nosocomiais (3). Apesar disso, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação antimicrobiana desses agentes.

Além de serem amplamente utilizados em instituições de saúde, são também muito utilizados pelas indústrias e também como produtos domissanitários. Entende-se por saneante domissanitário substâncias

destinadas à higienização e desinfecção domiciliar, em ambientes coletivos ou públicos. Perencevich e colaboradores demonstraram que o triclosan estava presente em 76% dos sabonetes líquidos e em 29% dos sabonetes em barra vendidos nos Estados Unidos (4). Além disso, houve um aumento acentuado no uso destes saneantes na descontaminação de alimentos para prevenir as infecções veiculadas por água e alimentos. Nos Estados Unidos, estima-se que a ingestão de alimentos contaminados cause 76 milhões de doenças, 325 mil hospitalizações e cinco mil mortes por ano (5).

A perda de sensibilidade aos biocidas foi descrita inicialmente na década de 50 e 60, porém a resistência a desinfetantes, como, peróxido de hidrogênio, glutaraldeído, cloro e álcool nas concentrações de uso em desinfecção ainda não foi descrita. Os biocidas catiônicos (compostos quaternários de amônio - QACs, clorexidina, diamidinas e acridinas) e o triclosan são os mais utilizados no ambiente hospitalar e têm sido associados a possíveis causas de seleção e persistência de amostras bacterianas com sensibilidade reduzida a antibióticos (6). Há relatos que associam o surgimento dos determinantes de resistência *qacA* e *qacB* em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* ao uso de biocidas catiônicos (7).

Estudos laboratoriais nesse segmento são extremamente importantes para avaliar os mecanismos básicos de ação e de perda de sensibilidade aos agentes antibacterianos. O entendimento desses achados em ambientes clínicos e ambientais podem fornecer evidências da possível relação entre o uso dos biocidas e o surgimento da resistência aos antibióticos. Esses temas são complexos e merecem grande atenção já que infecções relacionadas à

assistência à saúde representam um dos principais motivos da morbimortalidade em pacientes hospitalizados.

Com esse trabalho pretendemos avaliar se os clones bacterianos multirresistentes apresentam redução da sensibilidade ou tolerância aos biocidas utilizados no ambiente hospitalar. Por outro lado, pretendemos avaliar se uma das razões que justificaria a disseminação de clones bacterianos resistentes em vários hospitais brasileiros, não poderia ser consequente à redução da sensibilidade dessas amostras aos biocidas, causada pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo principal

Avaliar a atividade bactericida *in vitro* de distintos tipos e marcas comerciais de biocidas, incluindo, digluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio, triclosan e PVP-I (polivinil pirrolidona-iodo) contra clones bacterianos multirresistentes disseminados em vários hospitais brasileiros.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Padronizar a técnica de diluição-neutralização no Laboratório ALERTA para determinação da atividade antibacteriana de biocidas, de acordo com as recomendações da “European Norm”, EN1040.
2. Avaliar a se os clones multirresistentes disseminados em hospitais brasileiros apresentam sensibilidade reduzida aos principais biocidas usados no ambiente hospitalar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biocidas

Os biocidas, também chamados germicidas, incluem substâncias químicas que apresentam atividade antisséptica, desinfetante e esterilizante. São empregados tanto em objetos inanimados como na pele, para prevenir ou limitar infecções microbianas. Alguns agentes são antissépticos e desinfetantes como, por exemplo, a clorexidina e os compostos quaternários de amônio (QACs); já outros como o glutaraldeído são empregados apenas como desinfetantes (8).

A atividade de um agente biocida pode ser diminuída por diversos fatores, notavelmente, a concentração, o tempo de contato, o pH, a temperatura e a presença de matéria orgânica; e naturalmente, o número, a localização topográfica e o tipo de organismo envolvido, bactéria, esporo, fungos leveduriformes ou filamentosos, protozoários, príons, ou vírus (9).

A concentração é o principal fator a ser considerado na atividade de um biocida, pois é diretamente proporcional ao número de alvos atingidos na célula bacteriana (10). A concentração expoente mensura o efeito da atividade do agente após sua diluição, ou seja, biocidas com alto valor de concentração expoente, como fenóis e alcoóis, perdem atividade rapidamente quando diluídos, enquanto que os biocidas com baixo valor expoente, como os QACs, clorexidina e glutaraldeído continuam ativos mesmo após serem diluídos (11). Esta diferença é importante quando se estima a atividade microbiocida em ambientes hospitalares, onde resíduos de biocidas podem permanecer em superfícies após sua utilização. Os biocidas, geralmente, são mais eficazes

dentro de uma faixa ótima de pH. O glutaraldeído e os biocidas catiônicos (clorexidina e QACs) são mais ativos em pH alcalino, enquanto que os hipocloritos e os fenóis são mais potentes em pH ácido (12; 13).

2.1.1 Mecanismo de Ação dos Biocidas

Existe uma diferença fundamental entre o mecanismo de ação dos biocidas e dos antibióticos. Antibióticos são alvo-específicos apresentando, geralmente, um único alvo na célula bacteriana. Em contraste, os biocidas são considerados antimicrobianos não específicos devido a seus múltiplos alvos de ação (14). Esses alvos são concentração-dependente (Tabela 1), ou seja, quanto maior a concentração do biocida em uso, maior é o número de alvos intracelulares afetados, maior sua potência e, conseqüentemente, maior a sua toxicidade (15; 16).

Tabela 1. Mecanismos de ação antibacteriana dos antissépticos e desinfetantes

Antisséptico ou desinfetante	Alvo	Mecanismo de ação
Clorexidina	Membrana citoplásmatica	Em baixas concentrações afeta a integridade da membrana. Em altas concentrações causa precipitação das proteínas e ácidos nucléicos.
Bisfenóis (triclosan)	Membrana citoplásmatica	Afeta a estrutura e a função da membrana devido à inibição da proteína FabI.
Halogênios (Iodo)	Efeitos no DNA	Penetra rapidamente nos microrganismos, atacando grupamentos proteicos e causando a inibição da síntese de DNA.
QACs	Membrana citoplásmatica	Danos generalizados à membrana celular envolvendo a bicamada lipídica.

Adaptado de McDonnell e Russell (1999)

2.1.2 Clorexidina

A clorexidina é um antisséptico tópico que tem sido utilizada desde 1954 para prevenir ou limitar infecções bacterianas, tanto em adultos como em

crianças. Trata-se de uma bisguanida catiônica que se à liga a parede celular carregada negativamente e altera o equilíbrio celular osmótico. Em baixas concentrações, a clorexidina afeta a integridade da membrana e, em altas concentrações, ela precipita o conteúdo citoplasmático resultando em morte celular. A entrada de clorexidina na célula bacteriana ocorre rapidamente e é dependente da concentração e do pH (17).

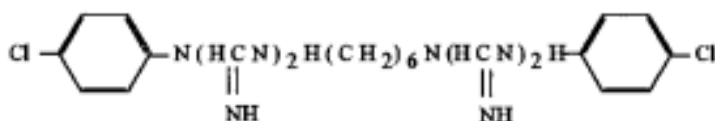


Figura 1. Estrutura química da Clorexidina

O gluconato de clorexidina é solúvel em água e é disponível comercialmente em concentrações que variam de 0,5% a 4%, sendo que algumas formulações podem apresentar álcool isopropílico ou etanol. A solução de clorexidina 0,5% apresenta amplo espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbios e anaeróbios facultativos, leveduras e alguns vírus lipídicos que possuem envelope, incluindo o HIV. Em contrapartida, apesar de não apresentar atividade contra esporos bacterianos, previne que formas vegetativas se esporulem. Embora o uso de clorexidina apresente diversas vantagens, a sua atividade é dependente de pH e é drasticamente reduzida na presença de matéria orgânica (18).

Entre os biocidas, é provavelmente o mais utilizado, apresentando segurança e eficácia em diversas aplicações, seja em soluções para lavagem das mãos, na antisepsia da pele para procedimentos cirúrgicos, antisepsia

vaginal, produtos orais, no banho de neonatos para prevenir sepse, além de seu amplo uso como desinfetante (19; 20).

2.1.3 Triclosan

O triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenileter) é o membro mais potente pertencente à classe dos bisfenóis e, desde 1960, é comercializado como agente “antibacteriano” em muitos produtos de higiene pessoal, principalmente sabonetes. Trata-se de um composto sintético, não-iônico e de amplo espectro de ação antimicrobiana (21; 22).

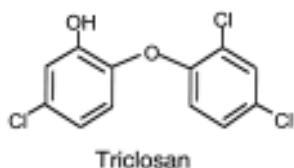


Figura 2. Estrutura química do Triclosan

Seu mecanismo de ação é variável, sendo bacteriostático em baixas concentrações e bactericida em altas concentrações. O triclosan age de maneira não-específica afetando a estrutura e a função da membrana celular, atuando na inibição de FabI, o qual é uma proteína carreadora essencial na síntese de ácidos graxos (23). Este composto possui amplo espectro de atividade, ou seja, contra vírus, fungos e a maioria das bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em contrapartida, não apresenta atividade sobre *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens* (24; 25). A maior quantidade de lipídeos na parede de *P. aeruginosa* é associada à tolerância ao triclosan. Além disso,

já foi relatado que o triclosan é um substrato do sistema de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexJK, presentes em *P. aeruginosa* (26) (27).

Um estudo conduzido por Meincke, em 1980, demonstrou que os lipídeos da parede celular de *S. aureus*, de *Escherichia coli* e de *P. aeruginosa* absorviam o triclosan por difusão, e sugeriu que a resistência ao triclosan poderia ser diretamente proporcional ao conteúdo lipídico da parede bacteriana (28).

O triclosan está presente na formulação de diversos produtos de consumo relacionados aos cuidados da saúde e em produtos hospitalares, como sabonetes, desodorantes, loções hidratantes, cremes dentais, enxaguatórios bucais, esfregões, cortinas e lençóis hospitalares (29). Por ser um composto quimicamente estável, pode ser aquecido a temperaturas de até 200°C por duas horas. Essa estabilidade termal faz dele um produto utilizado na incorporação de vários materiais plásticos reforçados utilizados tanto em ambientes domiciliares como em instituições de saúde, como, por exemplo, brinquedos, cabos de escova dental e cortadores de pizza (30). Pesquisas em bases de dados ([google.com/patents](https://www.google.com/patents)) revelam uma quantidade enorme de pedidos de patentes relacionadas ao uso de triclosan. Os materiais impregnados variam muito, desde concreto até bolas de boliche com insertos para os dedos impregnados com triclosan. No Brasil, estes produtos são distribuídos sob a marca Microban®

2.1.4 Cloreto de Benzalcônio

Substâncias surfactantes ou agente de atividade superficial (“surface-active agents”) possuem em sua estrutura duas regiões, uma hidrofóbica e

outra hidrofílica ou polar. Dependendo da carga ou da ausência de ionização da região hidrofílica os surfactantes são classificados em compostos catiônicos, aniônicos, não-iônicos ou anfotéricos. Dentre esses, os compostos quaternários de amônio (QACs) são os agentes catiônicos.

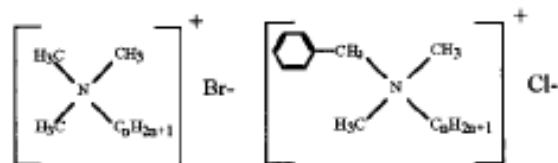


Figura 3. Estrutura química do Cloreto de Benzalcônio.

Os QACs são agentes que atuam na membrana citoplasmática bacteriana. De acordo com Salton e colaboradores ocorre a seguinte série de eventos a um organismo exposto aos agents catiônicos: (i) absorção e penetração do agente na parede celular; (ii) reação com lipídeos e proteínas da membrana citoplasmática seguida da desorganização da membrana; (iii) extravasamento do conteúdo celular de baixo peso molecular; (iv) degradação de proteínas e ácidos nucléicos; (v) lise celular causada por enzimas autolíticas. Deste modo ocorre perda da organização estrutural e integridade da membrana citoplasmática juntamente com outros efeitos deletérios à célula bacteriana. Por serem compostos catiônicos esses produtos se ligam fortemente a superfícies sujas as quais são carregadas negativamente (31; 32).

Em relação ao uso, os QACs são muito utilizados como antissépticos e desinfetantes. São empregados em ambientes clínicos na antisepsia da pele no pré-operatório, desinfecção de superfícies não-críticas, desodorização e limpeza. De acordo com relatórios da indústria química, em 2005 utilizou-se

1,97 milhões de toneladas desses produtos no mundo inteiro. São utilizados também como emulsificadores e aditivos. Nos produtos domissanitários, estão presentes na formulação de amaciantes, condicionadores de cabelo e também em alguns pesticidas. (33; 34).

2.1.5 PVP-I

O polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) é um biocida halógeno pertencente à mesma classe do cloro (compostos halogênicos); porém, o PVP-I é menos ativo. Similar ao cloro, a atividade antimicrobiana do PVP-I é rápida, mesmo em baixas concentrações, mas seu exato modo de ação ainda é desconhecido (35). O PVP-I penetra rapidamente nos microrganismos e ataca grupamentos protéicos, os aminoácidos cisteína e metionina, nucleotídeos e ácidos graxos, culminando na morte celular. Apresenta rápida ação bactericida, fungicida, tuberculicida, virucida e esporicida. (36; 37).

O PVP-I está entre os antissépticos mais utilizados na prática clínica. Embora soluções a base de iodo, aquosas ou alcoólicas, sejam usadas há mais de 150 anos, são associadas à alergia e irritação da pele e, ainda, há a inconveniência de alterarem a coloração na pele.

2.1.6 Teste de sensibilidade e tolerância aos biocidas

Existem muitas diferenças entre o teste de sensibilidade aos biocidas e aos antibióticos. No caso dos antibióticos, o principal objetivo do teste de sensibilidade é prever a chance de sucesso ou falha terapêutica no uso de determinada droga antimicrobiana para o tratamento de uma infecção bacteriana. A concentração inibitória mínima (CIM) é o parâmetro fundamental

e constitui a base para muitos testes de sensibilidade a antimicrobianos (38). A categorização de uma amostra como sensível prediz a chance de sucesso terapêutico e evolução favorável com o antibiótico escolhido, na dose recomendada de acordo com a amostra testada e o sítio de infecção (39). Os pontos de corte de um determinado antimicrobiano, que são utilizados como referência para os testes de sensibilidade, são baseados principalmente na distribuição da CIM em uma população bacteriana selvagem, nos parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica, nos resultados de modelos de infecção em animais e, posteriormente, de ensaios clínicos com seres humanos. Inúmeras variáveis podem comprometer o teste de sensibilidade, como, por exemplo, a composição do meio, o inóculo, o tempo de incubação e a temperatura.

Os métodos usados para avaliar a sensibilidade bacteriana aos antibióticos podem levar a conclusões inapropriadas se aplicados à avaliação da sensibilidade aos biocidas (40). Biocidas utilizados como antissépticos e, especialmente desinfetantes são usados, na prática, em concentrações muito altas, com exceção do triclosan Vs. *P. aeruginosa*. Neste caso, as amostras de *P. aeruginosa* apresentam CIM para triclosan próximas às concentrações normalmente atingidas. Apesar de alguns autores classificarem os microrganismos que apresentam altas CIMs a um biocida como “resistentes”; em contraste ao que ocorre com os antibióticos, esse termo não é propício quando se avalia a atividade de um biocida. O termo correto seria “sensibilidade reduzida” ou “tolerância aumentada”, pois apesar de ser observado um aumento na CIM, o biocida é ativo na concentração de uso (41; 42). De acordo com Heinzl, nos casos onde houve falha do antisséptico em

eliminar o microrganismo, o biocida foi utilizado de forma incorreta, tal como: i) o patógeno exibia resistência intrínseca ao desinfetante utilizado, ii) o produto foi aplicado ou havia sido aplicado em condições inadequadas em relação ao pH, à concentração, à temperatura ou à duração da exposição, iii) havia presença de matéria orgânica que deveria ter sido removida pela limpeza que devia anteceder a desinfecção e iv) o tempo de contato havia sido insuficiente com a superfície a ser tratada (43).

Os testes para avaliar efeito microbiocida e os fatores que afetam a atividade desses agentes devem ser realizados em laboratório, sob condições adequadas e simuladas, de acordo com as intenções de uso. Como mencionado acima, os biocidas são utilizados em concentrações muito altas. Para detectar o efeito microbiocida de um biocida é necessário realizar um teste mais específico e dinâmico, como o teste de fase 1 EN1040, o qual é preconizado pela norma europeia (44). Esse teste baseia-se em expor uma suspensão bacteriana ao desinfetante seguido da neutralização do biocida. Uma redução da contagem de colônias em $5 \log_{10}$ dos microrganismos viáveis é o critério utilizado para afirmar que o biocida apresenta efeito micobiocida (45). É muito importante neutralizar o biocida no tempo de contato determinado para evitar que a atividade antimicrobiana do biocida seja superestimada. Diversos trabalhos realizam o teste de sensibilidade aos biocidas pela técnica de microdiluição em caldo e também por diluição em ágar, o que implica em não neutralizar o biocida testado (46-48).

As padronizações da norma europeia são classificadas em fase 1, fase 2 e fase 3. Na fase 1, os testes de suspensão são realizados para avaliar a atividade bactericida básica dos agentes, enquanto que na fase 2, dividida em

dois passos, os testes simulam as condições práticas. O passo 1 da fase 2 é semelhante à fase 1; porém, com uma variação maior dos microrganismos testados. No segundo passo da fase 2, os testes simulam as condições práticas ao uso do desinfetante. Na fase 3, são realizados os testes de campo sob as condições práticas de uso e as condições do teste não são estabelecidas ou padronizadas.

2.1.7 Mecanismos de resistência aos biocidas

Patógenos de grande importância clínica, como MRSA, *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina, apresentam um perfil de sensibilidade diferenciado sendo, geralmente, resistentes a diversas classes de antimicrobianos (49). Como acontece com os antibióticos os mecanismos de resistências aos biocidas podem ser intrínsecos ou adquiridos. Além disso, os microrganismos exibem uma ampla variação na resistência intrínseca aos desinfetantes (50). Essa hierarquia pode ser apresentada por um esquema geral (Tabela 2); porém, a resistência relativa de microrganismos pode variar dependendo da classe específica do desinfetante. Os príons são os agentes mais resistentes aos germicidas e não são inativados por nenhum desinfetante de alto-nível. Cistos de coccídeos (*Cryptosporidium parvum*) são também resistentes a muitos desinfetantes de alto-nível usados em dispositivos médicos (51).

Tabela 2 – Hierarquia descendente da resistência relativa aos germicidas entre diferentes classes microbianas

Microrganismos	
Príons	
Esporos bacterianos (<i>Bacillus atrophaeus</i>)	
Coccidios (<i>Cryptosporidium</i> spp.)	
Micobactérias (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>Mycobacterium terrae</i>)	
Cistos (<i>Giardia lamblia</i>)	
Vírus não-lipídicos (poliovírus, coxsackievírus)	
Fungos (<i>Aspergillus</i> spp. e <i>Candida</i> spp.)	
Bactérias vegetativas (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
Vírus lipídicos ou vírus médios (HIV ^a , herpesvírus, vírus da hepatite B)	

Adaptado de Mailard (2002.)

^a - HIV - Vírus da imunodeficiência humana.

A perda de sensibilidade ou a tolerância bacteriana a um determinado biocida pode ser consequência da aquisição de elementos genéticos móveis, como, integrons, plasmídeos e transposons. Por exemplo, a resistência de *S. aureus* aos compostos quaternários de amônio, pode ser codificada pelos genes *qac*. Esses genes fazem parte da região conservada 3' de integrons de classe 1. (52). Também pode ocorrer a seleção de fenótipos que hiperexpressam sistemas de efluxo, frequentemente relatada em *P. aeruginosa* (53). Populações bacterianas com sensibilidade reduzida aos biocidas podem surgir na prática, mas usualmente indicam capacidade de adaptação e sobrevivência em um ambiente adverso que altera sua condição constantemente. Nesses casos, o crescimento bacteriano é limitado e a sensibilidade aos biocidas pode ser restabelecida, quando este agente é retirado, pois foi retirada também a pressão seletiva (54).

Os integrons de classe 1 são elementos genéticos que possuem, em cada uma de suas extremidades, seqüências conservadas (*conserved sequence* - CS). A extremidade 5', ou 5'-CS, é composta por; (i) um gene *intI1* que codifica uma integrase de classe 1, responsável pela integração e excisão de genes cassetes, (ii) um sítio de recombinação *attI1*, onde os genes cassetes

são preferencialmente integrados e (iii) um promotor, que regula a expressão dos genes cassetes que estarão localizados entre as duas CS. A extremidade 3' (3'-CS) é geralmente composta de um gene *qacEΔ1* conjugado a um gene *su1*, sendo que estes genes codificam resistência para compostos de amônio quaternário e sulfonamidas, respectivamente (55; 56). Portanto, os integrons de classe 1 são capazes de inserir e excluir genes cassetes, os quais em sua grande maioria conferem resistência bacteriana a diferentes classes de antimicrobianos, demonstrando assim como pode existir a resistência cruzada entre biocidas e antimicrobianos.

Bactérias podem usufruir de um único mecanismo para desenvolver resistência a antibióticos e aumentar a sua tolerância aos biocidas. Particularmente, bombas de efluxo podem ejetar da célula bacteriana uma ampla variedade de substratos e, notavelmente, são mais efetivas quando combinadas com outros mecanismos de resistência, pois previnem que agentes químicos atinjam concentrações letais dentro do alvo hospedeiro.

O amplo uso de produtos antissépticos e desinfetantes gerou especulação a respeito do desenvolvimento de resistência microbiana, particularmente, resistência cruzada a antibióticos (40). Diversos estudos explorando o uso dos biocidas e a resistência a esses compostos e aos antibióticos em ambientes naturais têm sido realizados. Esses estudos não relatam grande diferença no perfil de sensibilidade das amostras ambientais em relação às amostras hospitalares. Quando utilizados corretamente, os biocidas têm importante papel no controle de microrganismos patogênicos.

2.2 Desinfecção em instituições de assistência à saúde

Desinfecção e antissepsia são pontos críticos a serem considerados na prevenção e para o controle de infecções causadas por patógenos de importância clínica. São definidos como antissépticos, formulações contendo um agente germicida, microbiocida ou bactericida seguros para aplicação em organismos vivos, podendo ser utilizados na limpeza das mãos, por exemplo. Ao contrário dos antissépticos, os desinfetantes são formulações utilizadas em superfícies inertes ou artigos para destruir microrganismos patogênicos em tempos de contato específicos. Os desinfetantes não possuem atividade contra esporos bacterianos ou fúngicos (57). Baseado no dicionário de termos da ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) assepsia é o conjunto de medidas adotadas para impedir a introdução de agentes patogênicos no organismo enquanto antissepsia consiste na utilização de produtos (microbicidas ou microbiostáticos) sobre a pele ou mucosa com o objetivo de reduzir os microorganismos em sua superfície (www.anvisa.gov.br/).

Spaulding (1968) propôs um esquema para a desinfecção de objetos utilizados no ambiente hospitalar, classificando-os em: artigos críticos, semi críticos e não críticos.

- i) Artigos críticos: são os dispositivos que penetram na pele e na mucosa, atingindo tecidos subepiteliais e sistema vascular, bem como todos os que estejam diretamente conectados com esse sistema. Necessariamente, estes artigos devem ser esterilizados antes do uso. Nessa categoria estão incluídos instrumentos cirúrgicos, cateteres cardíacos e sondas urinárias, implantes, agulhas etc.

- ii) Artigos semi-críticos: são todos aqueles que entram em contato com pele não-íntegra ou mucosas íntegras. Estes artigos requerem desinfecção de alto nível. Nessa categoria estão incluídos os equipamentos de anestesia gasosa, terapia respiratória, endoscópios etc.
- iii) Artigos não-críticos: são aqueles que entram em contato com a pele íntegra do paciente. A pele, em condições fisiológicas, funciona como uma barreira de proteção efetiva a alguns microrganismos. Requerem desinfecção de baixo nível ou apenas limpeza mecânica com água e sabão para remoção de matéria orgânica. São exemplos os estetoscópios, termômetros, mesas etc. (58).

A falha na esterilização de um artigo crítico pode levar a graves infecções, por exemplo, lentes oculares ou válvulas cardíacas contaminadas são relacionadas ao surgimento de infecções nosocomiais (59). Paralelamente, a falha na desinfecção de alto nível de um item semi-crítico, como por exemplo, o endoscópio, também pode ser responsável por surtos de infecções. Um estudo relatou um grande surto causado por contaminação de endoscópios, onde a taxa de isolamento de *P. aeruginosa* em lavado bronco-alveolar saltou de 10,4% para 31%. Um total de 414 pacientes foram submetidos à broncoscopia durante o surto, e destes, 39 evoluíram com infecção, totalizando 48 infecções do trato respiratório e da corrente sanguínea (60; 61).

2.3 Infecções relacionadas à assistência à saúde em hospitais brasileiros

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) continuam sendo uma importante causa de morbi-mortalidade em todo o mundo. Além disso, casos de IRAS causadas por patógenos multiresistentes têm se tornando cada vez mais freqüente (62). Dentre os agentes etiológicos de IRAS, *Staphylococcus aureus* é o principal patógeno, ocupando o primeiro lugar como responsável por infecções de corrente sanguínea no ambiente hospitalar (63; 64). Na comunidade, frequentemente são responsáveis por infecções em pacientes previamente hígidos, causando infecções de pele e partes moles e pneumonia necrotizante. (65; 66). Logo após a introdução da metilina no arsenal clínico-terapêutico na década de 60, foram reportados isolados de *S. aureus* que desenvolveram resistência a este antimicrobiano e a outros β -lactâmicos relacionados. Mais tarde, foi esclarecido que a resistência à metilina era devido à aquisição de elemento genético móvel, chamado "staphylococcal chromosomal cassette *mec*" (SCC*mec*) (67). Desde então, diversos estudos relatam a disseminação de amostras de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) em hospitais do mundo inteiro (68-70), demonstrando que *S. aureus* resistentes à metilina representam um desafio mundial devido ao surgimento e à disseminação de clones que apresentam sensibilidade reduzida a diversas classes de antibióticos, principalmente à classe dos β -lactâmicos.

Embora hoje no Brasil observa-se uma diminuição de amostras de MRSA SCC*mec* tipo III, aproximadamente 37% dos isolados clínicos de *S. aureus* são resistentes à metilina e o clone endêmico brasileiro ainda encontra-se disseminado em vários hospitais do país, sendo o responsável por um grande número de infecções adquiridas no ambiente hospitalar (71). Além

disso, alguns trabalhos relatam que amostras de MRSA possuem uma CIM de duas a oito vezes maior para os biocidas catiônicos em relação às amostras sensíveis à metilina (72).

Bombas de efluxo mediando resistência aos compostos quaternários de amônio e biocidas catiônicos têm sido constantemente relatadas em isolados clínicos de *S. aureus* (73). Tais bombas podem ser codificadas pelos genes *qac*, os quais são constituintes de integrons e, na maioria das vezes, são carregados por plasmídeos (74). Esses genes codificam bombas transportadoras dependentes de próton. Os genes *qac* têm sido amplamente estudados e diversos tipos são conhecidos, dentre eles, *qacA*, *B*, *G*, *H* e *smr*, que conferem baixo nível de tolerância à biocidas e podem ser associados a resistência a antibióticos. Além disso, não foram detectados em amostras sensíveis a antissépticos (75).

Outro importante agente causador de IRAS, também conhecido como protótipo de patógeno de sucesso é *Pseudomonas aeruginosa*, um dos microrganismos oportunistas humanos de maior significância clínica. A alta capacidade em adaptar-se ao meio ambiente, seu requerimento nutricional mínimo e a tolerância à ampla variedade de condições físicas contribui para o sucesso ecológico deste patógeno (76-78).

Estudos recentes confirmam a grande versatilidade e capacidade deste microrganismo, e relatam que amostras de *P. aeruginosa* podem degradar gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante (79). Além disso, *Pseudomonas* spp. pode ser útil em processos biotecnológicos, como por exemplo, em reações enzimáticas na síntese de compostos envolvidos na produção de biodiesel (80; 81).

Ocasionalmente, *P. aeruginosa* causa infecção em indivíduos imunocompetentes; porém, no ambiente hospitalar atua como protótipo de patógeno oportunista sendo responsável por diversas infecções em pacientes imunocomprometidos e, por isso, esta espécie bacteriana assume importante papel como agente etiológico de infecções hospitalares (82). Na maioria dos casos, o processo infeccioso tem início com algum tipo de alteração ou destruição das barreiras físicas, como, por exemplo, a utilização de cateter urinário e/ou sonda oro-traqueal, realização de cirurgias, pacientes que sofreram queimaduras ou imunossuprimidos. Além disso, outros fatores de risco para a aquisição de infecções causadas por *P. aeruginosa* são a idade avançada, a presença de diabetes mellitus, a hospitalização prolongada e o uso prévio de antimicrobianos (83). No Brasil, é o principal agente etiológico de pneumonia relacionada à assistência à saúde em pacientes em uso de assistência ventilatória mecânica(63).

Todos os possíveis mecanismos de resistência a antimicrobianos já foram descritos em *P. aeruginosa*, como, por exemplo, (i) a alteração do sítio alvo da droga; (ii) a produção de enzimas que inativam o antimicrobiano; (iii) a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa, conhecidas como porinas e (iv) a hiperexpressão de bombas de efluxo (84; 85). Esses sistemas de efluxo são agrupados em cinco famílias, principalmente, de acordo com a homologia da seqüência de aminoácidos que as compõem. Dentre os sistemas de efluxo que ejetam antimicrobianos de importância clínica, a família RND é a que apresenta maior importância em amostras de *P. aeruginosa*, ejetando da célula bacteriana diversos substratos, como antissépticos, desinfetantes, detergentes, antimicrobianos, ácidos graxos, sais biliares,

hidrocarbonetos aromáticos, tais como solventes orgânicos, entre outros, desempenhando um importante papel na resistência intrínseca e adquirida de *P. aeruginosa* (86).

Dentre os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos presentes em *P. aeruginosa*, a presença de enzimas conhecidas como metalo- β -lactamases (M β L) é um dos de maior importância, pois confere fenótipo de resistência a todos β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam, aztreonam (87). As M β Ls são β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou a classe 3 de Bush-Jacoby e caracterizam-se por necessitarem de íons divalentes, usualmente o zinco como co-fator enzimático para atividade catalítica, e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com estes íons (88). Estas enzimas são inibidas por EDTA ou compostos derivados do ácido tiolático (ex.: ácido 2-mercaptopropiônico); porém, não são inibidas por inibidores das serinas- β -lactamases disponíveis comercialmente, como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam (89).

No Brasil, um clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (São Paulo Metalo- β -lactamase) foi encontrado em distintas regiões geográficas brasileiras. A amostra bacteriana original da qual está enzima foi isolada, era oriunda do trato urinário de uma criança hospitalizada no complexo Hospital São Paulo - HSP/UNIFESP. O gene que codifica esta enzima parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, desde que, até então, não foi encontrado em outras espécies bacterianas, apesar de pesquisado (90-92).

Isolados clínicos de *P. aeruginosa*, geralmente, são mais resistentes/tolerantes a antibióticos e biocidas que amostras presentes no meio ambiente ou em indústrias (93). Este fato pode ser consequente à pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos (antibióticos e biocidas) no ambiente hospitalar (94). Para o aparecimento de mecanismo de perda de sensibilidade a antibióticos e biocidas, como por exemplo, adaptação, a bactéria necessita de um mecanismo comum a ambos os tipos de compostos. Joynson e colaboradores relataram a resistência adaptativa de *P. aeruginosa* à amicacina e à tobramicina foi associada ao aumento discreto na tolerância ao cloreto de benzalcônio (93).

Acinetobacter baumannii têm se destacado desde o início da década de 70 como um patógeno oportunista emergente, freqüentemente causando infecções nosocomiais graves. Esporadicamente, causa infecções adquiridas na comunidade. Apesar de sua baixa virulência, a disseminação de amostras de *Acinetobacter* spp. multirresistentes representa um sério problema terapêutico, pois sua facilidade em se adaptar ao ambiente hospitalar dificulta a erradicação desses clones (95-100). Fatores de risco como a permanência prolongada em hospital, o uso de cateter venoso, o uso de nebulizador, de ventilador mecânico, a terapia antimicrobiana de amplo espectro e procedimentos cirúrgicos invasivos favorecem a aquisição deste patógeno (101). Doenças malignas, traumas, queimaduras e imunodepressão estão também entre os fatores predisponentes mais comuns (102).

Desde a introdução de novos antimicrobianos a partir da década de 80 estes microrganismos demonstraram grande capacidade de adaptação, podendo se tornar resistentes a uma grande variedade de antibióticos. Os

carbapenens têm sido considerados os agentes de escolha para o tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp.; porém, nos últimos anos o isolamento de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenens vêm se tornando comum (103). Em um estudo de vigilância realizado por Gales e colaboradores, observou-se a diminuição da sensibilidade aos carbapenens entre amostras de *Acinetobacter* spp. Na América Latina, a taxa de sensibilidade ao imipenem foi de 60,6% (n=188), enquanto que na Europa e América do Norte foi de 85,9% (n= 669) e 88,6% (n= 1805), respectivamente (104; 105). Algumas vezes as amostras de *Acinetobacter* são sensíveis somente às polimixinas. Contudo, a resistência à polimixina já foi descrita em *Acinetobacter* spp. (106; 107).

A resistência aos carbapenens entre amostras de *Acinetobacter* spp. pode ser mediada por diversos mecanismos, incluindo a produção de carbapenemases codificadas por genes inseridos em plasmídeos ou no cromossomo, principalmente, β -lactamases da classes D e B, a hiperexpressão dos sistemas de efluxo e a modificação e/ou perda das proteínas de membrana externa. Estes mecanismos podem estar concomitantemente presentes na mesma amostra, conferindo assim fenótipo de resistência a distintos antimicrobianos (108).

Atualmente, existem cerca de 150 β -lactamases da classe D descritas e, dentre essas, 45 exibem atividade hidrolítica sobre os carbapenens (109). A maioria dos genes codificadores das OXAs-carbapenemases, plasmidiais ou cromossômicos, foram divididos em oito subgrupos de acordo com a sua sequência genética e, quatro desses subgrupos já foram identificados em *A. baumannii*, OXA-23, OXA-24, OXA-51 e OXA-58 (110).

Acinetobacter spp. produz naturalmente β -lactamases do tipo AmpC e OXA-51-like. A expressão desses genes varia de acordo com a presença da sequência de inserção IS*Aba*, à jusante (upstream) de *bla*_{amp-C} e *bla*_{OXA-51}, pois trás consigo um promotor que aumenta a expressão dessas enzimas (111). Essas enzimas estão relacionadas com a resistência intrínseca de *Acinetobacter* spp. aos β -lactâmicos. Além disso, *Acinetobacter* spp. pode facilmente capturar DNA exógeno e adquirir resistência a distintas classes de drogas (112). No Brasil, dois mecanismos de resistência aos carbapenens têm sido descritos com maior frequência, a produção da M β L, IMP-1 e a produção de OXA-23 (113-115). Nos dois casos, foram observadas a disseminação de clones, o que poderia justificar a alta porcentagem de amostras resistentes.

Klebsiella pneumoniae é um importante patógeno no ambiente hospitalar. Os antimicrobianos da classe dos carbapenens têm sido amplamente utilizados para o tratamento das infecções causadas por amostras de *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ES β L). Contudo, relatos de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de M β L têm sido reportadas com uma frequência cada vez maior e, entre 2005 e 2006, nove amostras produtoras de IMP-1 foram isoladas em diferentes hospitais na cidade de São Paulo (116). O estudo do contexto genético destas amostras possibilitou identificar um integron, que foi nomeado *In86*, no qual estava inserido o gene *bla*_{IMP-1} (117). Adicionalmente, este gene foi identificado em outras amostras bacterianas, incluindo 14 amostras de *Acinetobacter* spp. geneticamente distintas (118). É importante ressaltar que as amostras de *Acinetobacter* spp. apresentavam o mesmo integron, *In86*, que foi encontrado

nas amostras de *K. pneumoniae*, sugerindo a transmissão deste elemento genético entre diferentes espécies bacterianas (119).

Embora a resistência aos carbapenens seja rara entre membros da família *Enterobacteriaceae*, esse fenótipo de resistência tem sido relatado com frequência em todo o mundo, especialmente devido à produção de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). As carbapenemases do tipo KPC pertencem à classe A de Ambler, são normalmente codificadas por genes localizados em plasmídeo e apresentam atividade hidrolítica sobre as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenens. O primeiro membro da família KPC foi descrito em 2001 em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada, em 1996, na Carolina do Norte, EUA (120). Em 2003, foi descrita KPC-2, também em *K. pneumoniae*, consequência de uma mutação pontual que gerou a variação em um único aminoácido na sequência codificada (Moland et al., 2003). Porém, mais tarde foi constatado um erro na sequência publicada de KPC-1, o aminoácido 175 deveria ser glicina e não serina como descrito, e que ambas apresentavam a mesma sequência genética (errata: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008; 52(2):809). Até o momento foram descritas 10 variantes de KPC (www.lahey.org/Studies/). Relatos de KPC-2 tornaram-se frequentes na Costa Leste dos Estados Unidos e já foram reportados em diversas partes do mundo como, por exemplo, em Israel (121), França (122), Grécia (123), Colômbia (124), China (125) e, recentemente, na Argentina (126), no Brasil (127) e no Reino Unido (128). A grande capacidade de disseminação do gene *bla*_{KPC}, consequência de sua localização plasmidial, é motivo de grande preocupação e representa uma ameaça, principalmente dentro das instituições de saúde (129).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

Neste estudo foram avaliadas nove amostras bacterianas multirresistentes representativas de clones endêmicos presentes em distintas regiões brasileiras e/ou amostras com mecanismos de resistência específicos, sendo: duas amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), o clone brasileiro carreador de SCCmec tipo III (nosocomial) e MRSA SCCmec tipo Ivc (comunitário); uma amostra de *E. faecalis* resistente à vancomicina (VRE-*vanA*); duas amostras de *P. aeruginosa*, uma produtora de SPM-1 e uma amostra que apresenta sensibilidade reduzida à biocidas; uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de IMP-1 e uma amostra de *A. baumannii* resistente à polimixina (Tabela 3). Como preconizado pelo documento “Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements phase I” (“European Standard” - EN 1040, 2005), foram utilizadas como controle de qualidade as cepas referência da “American Type Culture Collection” (ATCC) *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442. Essas amostras apresentam sensibilidade reduzida aos biocidas.

As amostras estudadas foram armazenadas no Banco de Microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), e foram subcultivadas por duas vezes antes da realização dos testes.

Tabela 3. Relação dos microrganismos estudados e suas características

Microrganismo	Característica
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	sensibilidade reduzida aos biocidas
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	sensibilidade reduzida aos biocidas
<i>S. aureus</i> MR108	MRSA SCCmec tipo IVc; produtora de PVL ^a
<i>S. aureus</i> A1721	MRSA SCCmec tipo III, clone brasileiro
<i>E. faecalis</i> A29964	resistência à vancomicina ^b
<i>P. aeruginosa</i> P1088	resistência aos carbapenens ^c
<i>P. aeruginosa</i> P10093	sensibilidade reduzida aos biocidas
<i>A. baumannii</i> A1069	resistência à polimixina
<i>K. pneumoniae</i> A13309	resistência aos carbapenens ^c

^a Leucocidina Panton-Valentine

^b Resistência pela presença do gene *vanA*

^c Resistência devido à produção de metalo- β -lactamase

3.2 Biocidas

3.2.1 Biocidas testados

Para o teste de sensibilidade aos biocidas foram testadas marcas normalmente utilizadas em hospitais brasileiros. Foram testadas três marcas diferentes de digluconato de clorexidina (Rioquímica[®], Sigma[®] e ViaFarma[®]) e duas marcas de PVP-I (Rioquímica[®] e Biosintética[®]). Somente uma marca foi testada para os biocidas triclosan (Segmenta[®]) e cloreto de benzalcônio (Sigma[®]). Todos os biocidas foram adquiridos em solução de uso, exceto cloreto de benzalcônio o qual era puro.

3.2.2 Concentração das soluções de teste dos Biocidas

Cada biocida foi testado em duas concentrações diferentes, conforme a Tabela 4. As concentrações testadas foram baseadas nas concentrações recomendadas pelos serviços de infecção hospitalar das instituições de assistência à saúde (concentração de uso). Todos os biocidas foram diluídos em água destilada estéril no momento do teste.

Tabela 4. Concentração dos biocidas que foram avaliados nesse estudo

Biocidas	Concentrações testadas
Digluconato de clorexidina	0,2 e 2%
PVP-I	0,5 e 1%
Triclosan	0,2 e 0,5%
Cloreto de Benzalcônio	5 e 10%

3.3. Neutralizador

O neutralizador utilizado consiste de lecitina 3 g/L (Viafarma[®]), polisorbato 80 (Tween 80[®]) 30 g/L (Sigma[®]), tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 5 g/L (Vetec[®]), L-histidina 1 g/L (Labsynth[®]) e saponina 30g/L (Inlab[®]) em uma solução de tampão fosfato a 0,0025mol/L com pH 7,2. Essa solução é utilizada para neutralizar a atividade biocida após o tempo de contato entre o biocida e bactéria, de acordo com as recomendações da “European Standard” - EN 1040.

3.4 Teste de Sensibilidade aos Biocidas pelo Método de Suspensão Direta

A atividade bactericida ou bacteriostática dos biocidas triclosan, gluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e PVP-I, contra as amostras bacterianas foi determinada pelo teste de suspensão direta de acordo com padronização da “European Standard” - EN1040. O objetivo de uso dessa padronização foi estabelecer se um desinfetante químico ou antisséptico apresentava ou não atividade bactericida básica.

3.4.1 Preparação das Culturas de Trabalho

Para cada organismo testado, duas suspensões foram preparadas: a suspensão teste ou de trabalho (N) e a suspensão de validação (Nv) para testar os controles e o método de validação.

3.4.2. Suspensão Teste

A suspensão foi preparada em caldo TSB (“tryptone soya broth”, Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) e com o auxílio de um turbidímetro o número de células foi ajustado para se obter uma concentração variando de $1,5$ a 5×10^8 unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

3.4.3 Suspensão de Validação

Para preparo da suspensão de validação, a suspensão teste foi diluída salina a fim de obter uma concentração de 3×10^2 a $1,6 \times 10^3$ UFC/mL. Essa suspensão foi utilizada para a realização dos controles A, B e C, que serão detalhados a seguir.

3.4.4 Contagem de Colônias

Para contagem de colônias, foram preparadas diluições de 10^{-6} e 10^{-7} a partir da suspensão teste e uma diluição 10^{-1} da suspensão de validação. Um mL de cada diluição foi inoculado, em duplicata, pela técnica de “pour plate” em placas de petri. Nessa técnica, para cada um mL de inóculo bacteriano são adicionados de 15 a 20 mL de “tryptone soya agar” (TSA - OXOID - Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas.

3.4.5 Critérios para contagem das colônias

As placas que não apresentavam colônias separadas ou placas incontáveis foram descartadas. A contagem foi realizada determinando o número exato de UFC por mL em cada placa.

Para a análise dos dados foram considerados: >330 UFC/mL aquelas placas que apresentaram um número maior que 330 colônias; <14 UFC/mL para as placas que possuíam até 14 colônias ou ausência de crescimento bacteriano; e o número exato de UFC/mL para as placas que apresentavam qualquer número de colônias entre 14 e 330.

Após a leitura de 24 horas as placas foram incubadas novamente para a leitura de 48 horas. Foi considerado o maior número de UFC/mL obtido entre as duas leituras.

3.4.6 Determinação da atividade do Biocida

Para determinar a atividade antimicrobiana dos diferentes biocidas um mL da suspensão teste foi adicionado em um tubo contendo um mL de água. O cronômetro foi acionado e após dois minutos, oito mL da solução do produto em teste foram adicionados ao tubo. O cronômetro foi reiniciado e após os tempos de contato estipulados, um minuto (tempo adicional) e cinco minutos (tempo obrigatório), um mL dessa mistura foi adicionado a um tubo contendo oito mL de solução neutralizante e um mL de água. Após cinco minutos, um mL da segunda solução (constituída de água, bactéria, biocida, neutralizante) foi inoculado em duplicata pela técnica de “pour plate”. Há um esquema representando a técnica no anexo 1. Após inoculação, as placas foram incubadas a 36° C e a leitura realizada em 24 e 48 horas. Todas as amostras

bacterianas que apresentaram crescimento em algumas das concentrações testadas dos biocidas foram armazenadas no banco de microrganismos do laboratório LEMC/ALERTA.

3.5 Controles da técnica

Três controles de validação da técnica foram realizados para duas amostras (*S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442). Para os testes de validação, listados abaixo, foram utilizadas as suspensões de validação. No anexo 2 encontra-se esquema dos testes de validação A, B e C. Todas as placas foram incubadas por 24 e 48 horas, a 36°C.

3.5.1 Controle experimental “A” - Validação das condições de teste selecionadas e verificação da ausência de algum efeito letal nas condições de teste.

Em um tubo foram pipetados um mL de água e um mL da suspensão de validação. Após dois minutos oito mL de água foram adicionados ao tubo. Decorrido cinco minutos de contato, um mL dessa mistura foi inoculado em duplicata pela técnica de “pour plate” em TSA.

3.5.2 Controle experimental “B” - Verificação de ausência de toxicidade do neutralizador.

Um mL da suspensão de validação foi adicionado ao tubo contendo oito mL de neutralizador e um mL de água. Após cinco minutos um mL dessa mistura foi inoculado em duplicata pela técnica de “pour plate” em TSA.

3.5.3 Controle experimental “C” - Verificação da eficiência do neutralizador em inativar o biocida.

Em um tubo contendo um mL de água e um mL de solução salina, foram adicionados oito mL de biocida em sua maior concentração de teste. Após cinco minutos um mL dessa mistura foi adicionado a outro tubo contendo oito mL de neutralizador, e este foi incubado por mais cinco minutos. Um mL da suspensão de validação foi adicionado a essa última mistura e o cronômetro ajustado para marcar 30 minutos. Ao final desse tempo, um mL dessa mistura foi inoculado em duplicata pela técnica de “pour plate” em TSA.

3.6 Cálculo dos Dados Experimentais

3.6.1 Cálculo do número de colônias bacterianas das soluções testes

O número de UFC/mL na suspensão teste (N) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$N = \frac{C}{(\eta_1 + 0,1\eta_2) \times 10^{-6}}$$

Onde:

N = é o número de células na suspensão teste (N);

C = é a soma do número de UFC/mL obtidas nas quatro placas da contagem de colônia da suspensão teste (10^{-6} e 10^{-7});

η_1 = é a soma do número de UFC/mL obtidas nas duas placas da contagem de colônias da suspensão teste com a menor diluição (10^{-6});

η^2 = é a soma do número de UFC/mL obtidas nas duas placas da contagem de colônias da suspensão teste com a maior diluição (10^{-7}).

Como este valor corresponde as UFC/mL da suspensão teste, também foi calculado o número de UFC/mL na mistura do teste, ou seja, o número de UFC/mL no momento em que o inóculo bacteriano foi colocado em contato com o biocida. Este valor é representado por N_0 e corresponde a um décimo do valor N devido à diluição 1:10 inerente à técnica.

3.6.2 Cálculo do número de colônias bacterianas dos testes Na (Determinação da atividade do Biocida)

Os valores “Na” correspondem ao número de UFC/mL capazes de crescer após o tempo de contato com o biocida e antes da neutralização feita pelo inativador. Estes valores são dez vezes maiores que o número de colônias obtidas nas placas do teste, devido à diluição inerente à técnica. Para calcular o valor “Na”, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$Na = 10c/n$$

Onde:

c = é a soma do número de UFC/mL obtida nas duas placas do teste;

n = é o número de placas onde a contagem de colônias foi realizada.

3.6.3 Cálculo do número de colônias bacterianas das soluções de validação

Os valores “Nv” correspondem ao número de células na suspensão de validação, enquanto que os valores “Nv₀” correspondem ao número de células

por mL nas misturas de validação “A”, “B” e “C” no início do tempo de contato. As fórmulas utilizadas para o cálculo do número de UFC/mL estão descritas abaixo:

$$N_v = 10 \cdot c/n$$

$$N_{v_0} = c/n$$

Onde:

c = é a soma do número de UFC/mL obtidas nas duas placas e contagem de colônias da suspensão de validação (10^{-1});

n = é o número de placas onde a contagem de colônias foi realizada.

3.6.4 Cálculo das UFC/mL dos testes de validação

Os controles *A*, *B* e *C* correspondem ao (i) número de células bacterianas nas condições experimentais do teste, (ii) controle de toxicidade do neutralizador e (iii) validação da eficácia do neutralizador, respectivamente.

Para o cálculo desses controles a seguinte fórmula foi utilizada:

$$A, B, C = c/n$$

Onde:

C = é a soma do número de UFC/mL obtidas nas quatro placas da contagem de colônias da suspensão teste (10^{-6} e 10^{-7});

N = é o número de células na suspensão teste.

3.6. Análise dos resultados

3.6.1. Limites Básicos

Para que a técnica possa ser considerada válida, os resultados obtidos no teste não devem ultrapassar os seguintes valores:

Figura 4. Limites básicos de cada inóculo utilizado no estudo

<i>N</i>	entre $1,5 \times 10^8$ e 5×10^8
<i>N</i> ₀	entre $1,5 \times 10^7$ e 5×10^7
<i>N</i> _v 0	entre 30 e 160 UFC/ml (<i>N</i> _v entre 3×10^2 e $1,6 \times 10^3$)
<i>A, B, C</i>	igual ou maior que $0,5 \times N$ _v 0

3.6.2. Redução Logarítmica

De acordo com a padronização EN1040 o produto apresenta atividade bactericida básica se demonstrar uma redução maior ou igual a 5 log entre os valores *N*₀ e *N*_a. Para calcular a redução logarítmica entre estes dois valores, a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\text{Log R} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_a$$

3.7. Análise do DNA cromossômico

Para assegurar que as amostras que apresentaram sensibilidade reduzida aos biocidas apresentavam o mesmo genótipo das amostras originais foi realizada a análise do DNA cromossômico dos isolados de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* pela técnica de eletroforese em campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis” - PFGE).

As amostras foram subcultivadas em ágar sangue para a obtenção de colônias puras e isoladas. Após o crescimento, foram transferidas

aproximadamente quatro colônias de cada amostra para um tubo contendo quatro mL de TSB, que foi incubado por um período de 18 a 24 horas em temperatura de 37°C. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 1.512 g por 15 minutos, e as células precipitadas foram suspensas em um mL de solução salina e transferidas para um tubo de microcentrifuga que havia sido previamente pesado. Os tubos foram centrifugados novamente a 25.200 g por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1 e um volume de cinco µL dessa solução foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 300 µL da solução tampão TEM (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada a 340 µL de agarose de baixo ponto de fusão (FMC, Rockland, EUA), para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico. Os blocos foram incubados por cinco horas em solução EC (Tris 6 mM, pH 7,5; NaCl 1 M; EDTA 0,01 M; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) a 37°C e a seguir foram incubados a 50°C, em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4 M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Sigma - P4914) por 12 horas. Após esse período, os blocos foram lavados por quatro vezes com solução CHEF-TE (Tris 0,1 M, pH 7,5; EDTA 0,1 M) e armazenados nessa solução até a digestão enzimática.

Para as amostras de *S. aureus*, *E. faecalis* e *A. baumannii* foi utilizada a enzima de restrição Smal (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, EUA), enquanto que para as amostras de *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* foi utilizada a enzima Spel (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, EUA). Para

cada amostra de cocos Gram positivos e *A. baumannii* foi utilizado 3 µl de Smal (Promega R6125, 10U/ µL) e para as amostras de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* 1 µl de SpeI. A digestão do DNA bacteriano foi realizada por 12 a 18 horas em temperatura de 25°C para Smal e 37°C no caso da enzima SpeI. Após a digestão, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA) e os padrões de variação da corrente elétrica mudaram de acordo com a enzima utilizada, para Smal o padrão de variação (“switch time”) inicial e final foi de 5 e 30 segundos. Para SpeI o padrão de variação (“switch time”) inicial e final foi de 5 e 60 segundos. A eletroforese foi realizada por um período de 23 horas, em solução 0,5x TBE (Tris 0,089 M; Ácido bórico 0,089 M; EDTA, 0,002 M) à temperatura de 13°C e utilizando uma corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta.

Os perfis migratórios obtidos foram analisados visualmente seguindo os critérios de Tenover e colaboradores (1995), onde amostras foram consideradas idênticas (mesmo clone) quando apresentaram todas as bandas iguais; amostras com até seis bandas foram consideradas subtipos de um mesmo clone, e amostras que apresentaram sete ou mais bandas discordantes foram consideradas amostras distintas, ou não relacionadas genotipicamente.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da atividade dos Biocidas

Neste estudo, foram avaliadas a atividade de quatro biocidas utilizados em ambiente hospitalar, sendo três marcas de digluconato de clorexidina (Rioquímica[®], Sigma[®] e ViaFarma[®]), duas marcas de PVP-I (Rioquímica[®] e Biosintética[®]), e somente uma marca de triclosan e cloreto de benzalcônio (Segmenta[®] e Sigma[®], respectivamente), contra as principais bactérias multiressistentes causadoras de infecções relacionadas à assistência à saúde. No total, foram obtidos 252 resultados de redução logarítma, sendo 36 para cada biocida testado.

4.2 Digluconato de Clorexidina

Na Tabela 5 estão dispostos os resultados das três diferentes marcas de clorexidina (CHX) contra as nove bactérias avaliadas. Foram testadas duas concentrações de clorexidina (0,2 e 2%) utilizando dois tempos diferentes de contato, um minuto e cinco minutos. As marcas Sigma[®] e ViaFarma[®] apresentavam-se em solução aquosa e a marca Rioquímica em solução degermante.

Clorexidina demonstrou atividade sobre todas as amostras estudadas na concentração de 2%, pois foi capaz de reduzir $> 5 \log$ o número de UFC/mL, tanto no tempo de contato de um minuto como no tempo de contato de cinco minutos. Na concentração de 0,2% houve diferença de atividade entre as diferentes marcas. A clorexidina da marca Rioquímica[®] demonstrou possuir maior atividade biocida contra as amostras testadas apresentando efeito

microbiocida inclusive na concentração de 0,2% já no tempo de exposição de um minuto, exceto contra as amostras de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 e *E. faecalis*. Para a amostra de *P. aeruginosa*, somente na concentração de 2%, a clorexidina marca Rioquímica foi capaz de reduzir > 5 log o número de UFC/mL, tanto em um como em cinco minutos de contato. A clorexidina da marca Sigma® demonstrou atividade semelhante à da marca ViaFarma® no tempo de cinco minutos, exceto contra as amostras de *P. aeruginosa* P10093 e P1088 (Tabela 5).

Clorexidina das marcas Sigma® e ViaFarma® não apresentaram redução >5 log quando foram testadas na concentração de 0,2% e no tempo de contato de um minuto contra as amostras de *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* SCCmec IVc, *Enterococcus faecalis* e *P. aeruginosa* P1088.

Dentre as amostras de *P. aeruginosa*, a amostra P1088 produtora de SPM-1 foi a mais tolerante a clorexidina. Por outro lado, as amostras de *A. baumannii* A1069 e *K. pneumoniae* apresentaram redução > 5 log UFC/mL na presença de clorexidina de diferentes marcas em um minuto de contato na concentração de 0,2%.

Tabela 5. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida digluconato de clorexidina das marcas comerciais Sigma, ViaFarma e Rioquímica contra as amostras estudadas

Biocidas Concentração Isolados/ Tempo de contato	CHX Sigma®				CHX ViaFarma®				CHX Rioquímica®			
	0,2%		2%		0,2%		2%		0,2%		2%	
	1'	5'	1'	5'	1'	5'	1'	5'	1'	5'	1'	5'
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	3,78	4,23	>5	>5	4,30	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> MR108 SCCmec IVc	4,60	>5	>5	>5	3,78	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>E. faecalis</i> A29964 vanA	3,78	>5	>5	>5	3,78	>5	>5	>5	3,78	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> P10093	>5	>5	>5	>5	3,78	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> P1088	4,35	>5	>5	>5	3,78	3,87	>5	>5	3,78	4,24	>5	>5
<i>A. baumannii</i> A1069	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>K. pneumoniae</i> A13309 IMP-1	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5

Nas Figuras 5, 6 e 7 estão representados os resultados de redução logarítma para clorexidina das marcas Sigma[®], ViaFarma[®] e Rioquímica[®], respectivamente, nas duas concentrações testadas e nos dois tempos de contato, contra as nove bactérias.

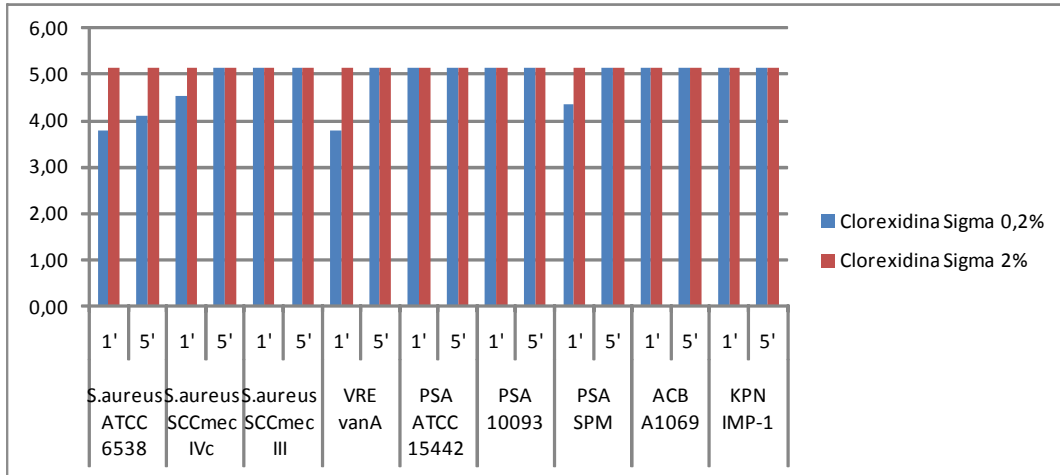


Figura 5. Representação gráfica da redução logarítma do biocida digluconato de clorexidina marca Sigma contra as amostras avaliadas.

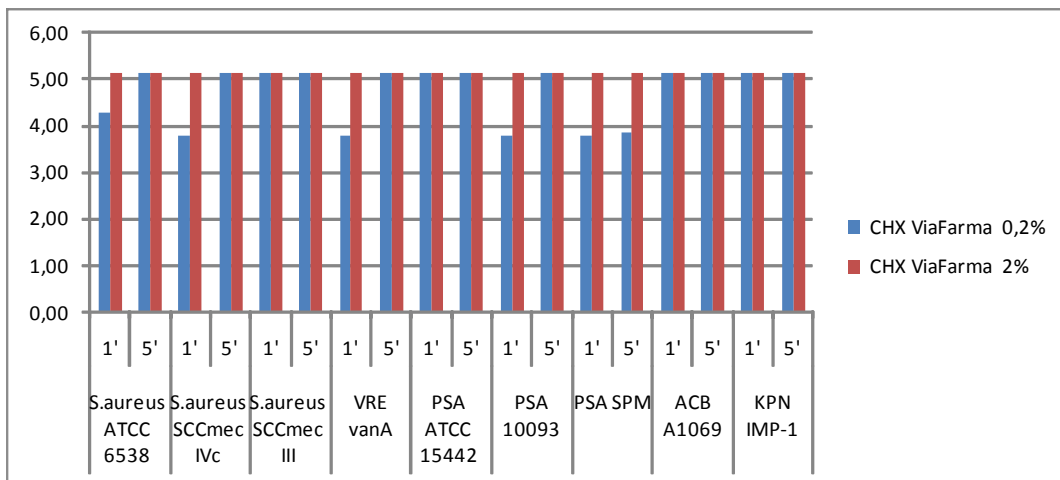


Figura 6. Representação gráfica da redução logarítma do biocida clorexidina marca Via Farma contra as amostras avaliadas.

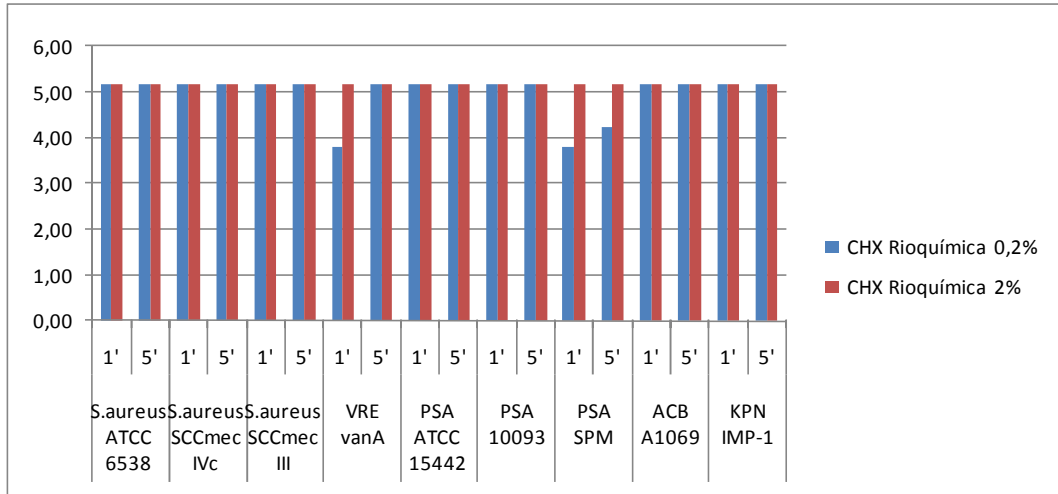


Figura 7. Representação gráfica da redução logarítmica do biocida clorexidina marca Rioquímica contra as amostras avaliadas.

4.3 PVP-I

Na Tabela 6 estão representados os resultados da atividade do biocida PVP-I, solução degermante de duas diferentes marcas, Rioquímica® e Biosintética® nas concentrações de 0,5 e 1% e em dois diferentes tempos de contato, um minuto e cinco minutos, contra as nove bactérias avaliadas. PVP-I demonstrou atividade sobre todas as amostras testadas, independente do tempo, da concentração e da marca testada.

Tabela 6. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítmica do biocida PVP-I das marcas comerciais Rioquímica e Biosintética contra as amostras estudadas

Biocidas Concentração Isolados/ Tempo de contato	PVP-I Rioquímica®				PVP-I Biosintética®			
	0,5%		1%		0,5%		1%	
	1'	5'	1'	5'	1'	5'	1'	5'
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> SCCmec IVc MR108	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>E. faecalis</i> A29964 vanA	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> P10093	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> P1088	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>A. baumannii</i> A1069	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
<i>K. pneumoniae</i> A13309 IMP-1	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5

4.4 Cloreto de Benzalcônio

Na tabela 7 estão representados os resultados da atividade do biocida cloreto de benzalcônio (BZK), marca Sigma[®], contra as nove bactérias avaliadas. Foram testadas duas concentrações (5% e 10%) e em dois diferentes tempos de contato, um minuto e cinco minutos.

A única concentração que inibiu o crescimento bacteriano de todos os microrganismos, com exceção da cepa *S. aureus* ATCC 6538, foi a concentração de 10%. Porém, em cinco minutos de contato essa amostra foi inibida. Na concentração de 5% apresentou efeito microbiocida somente contra as amostras de *S. aureus* A1721 SCCmec III, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* P1088. Em relação ao tempo de contato, observou-se influência em ambas as concentrações do teste (Tabela 7).

Tabela 7. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítma do biocida cloreto de benzalcônio da marca comercial Sigma contra as amostras estudadas

Biocida Concentração Isolados/ Tempo de contato	BZK Sigma [®]			
	5,0%		10%	
	1'	5'	1'	5'
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	4,08	>5	3,78	4,51
<i>S. aureus</i> MR108 SCCmec IVc	3,78	4,73	>5	>5
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	>5	>5	>5	>5
<i>E. faecalis</i> A29964 <i>vanA</i>	>5	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	3,88	>5	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> P10093	3,78	3,78	3,78	>5
<i>P. aeruginosa</i> P1088	>5	>5	>5	>5
<i>A. baumannii</i> A1069	3,78	3,78	>5	>5
<i>K. pneumoniae</i> A13309 IMP-1	3,78	>5	4,73	>5

Na Figura 8 estão representados os resultados de redução logarítma para BZK marca Sigma[®], nas duas concentrações testadas e nos dois tempos de contato, contra as nove bactérias estudadas.

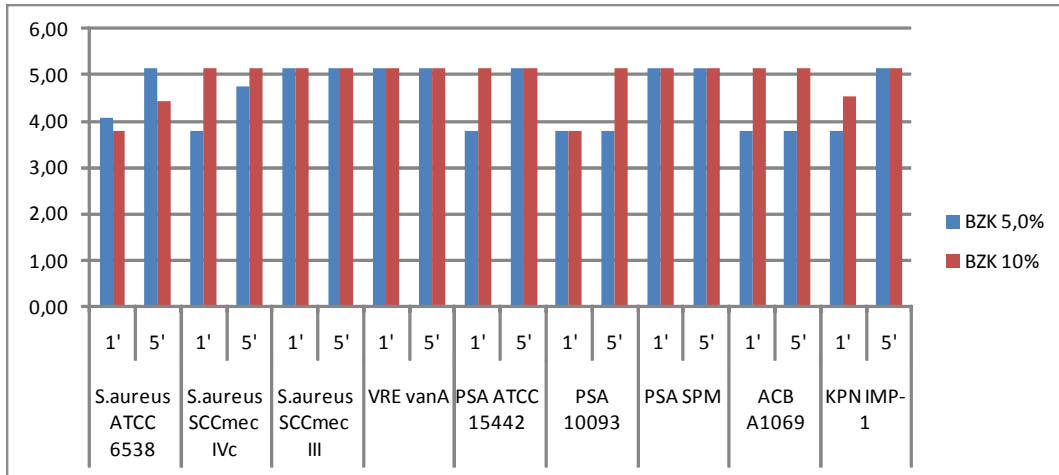


Figura 8. Representação gráfica da redução logarítmica do biocida cloreto de benzalcônio marca Sigma contra as amostras avaliadas.

4.5 Triclosan

Na tabela 8 estão representados os resultados do biocida triclosan, marca Segmenta[®], contra as nove bactérias avaliadas. Foram testadas duas concentrações (0,2% e 0,5%) e em dois diferentes tempos de contato, um minuto e cinco minutos. Triclosan não apresentou efeito microbiocida sobre bactérias Gram negativas. Contra amostras Gram positivas foi ativo, com exceção de *E. faecalis* A29964, que só apresentou redução de 5 log na concentração de 0,5%.

Tabela 8. Redução do crescimento bacteriano em escala logarítmica do biocida Triclosan da marca comercial Segmenta[®] contra as amostras estudadas

Biocida Concentração Isolados/ Tempo de contato	Triclosan Segmenta [®]			
	0,2%		0,5%	
	1'	5'	1'	5'
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> MR108 SCCmec IVc	>5	>5	>5	>5
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	>5	>5	>5	>5
<i>E. faecalis</i> A29964 vanA	4,12	4,78	>5	>5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	3,78	3,78	3,78	3,78
<i>P. aeruginosa</i> P10093	3,78	3,78	3,78	3,78
<i>P. aeruginosa</i> P1088	3,78	3,78	3,78	3,78
<i>A. baumannii</i> A1069	3,78	3,78	3,78	3,78
<i>K. pneumoniae</i> A13309 IMP-1	3,78	3,78	3,78	3,78

Na Figura 9 é possível visualizar os resultados de redução logarítmica das amostras estudadas para triclosan marca Segmenta[®], nas duas concentrações testadas e nos dois tempos de contato, contra as nove bactérias.

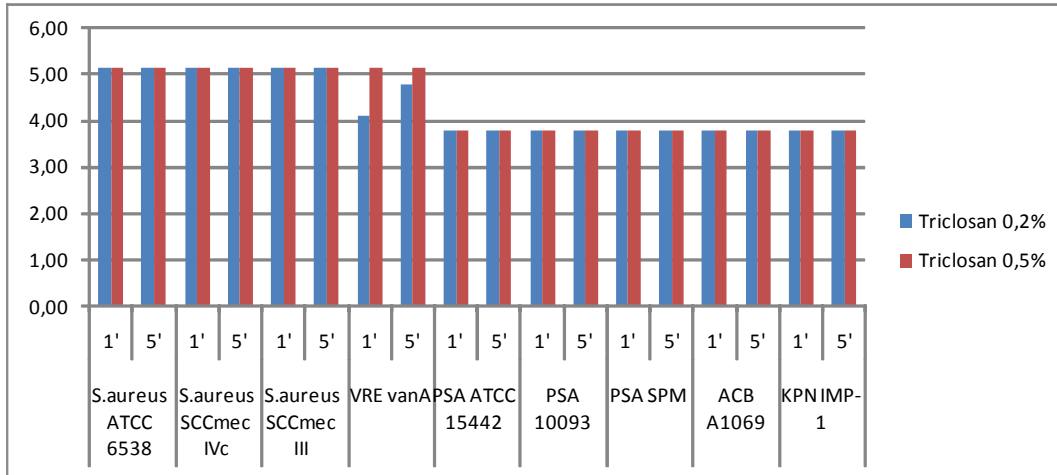


Figura 9. Representação gráfica da redução logarítmica do biocida triclosan marca Segmenta contra as amostras testadas.

4.6 Resultados da Atividade dos Biocidas Separados por Bactéria

Na Figura 10 estão dispostos os resultados de todos os biocidas testados contra a amostra de *S. aureus* ATCC 6538. Somente clorexidina da marca Sigma[®] não foi capaz de atingir redução ≥ 5 log no número de UFC/mL com tempo de contato de cinco minutos na concentração de 0,2%. As outras marcas de clorexidina demonstraram redução esperada na concentração de 0,2% e cinco minutos de contato. O cloreto de benzalcônio não apresentou efeito microbicida na concentração de 10%, tempo de contato de cinco minutos.

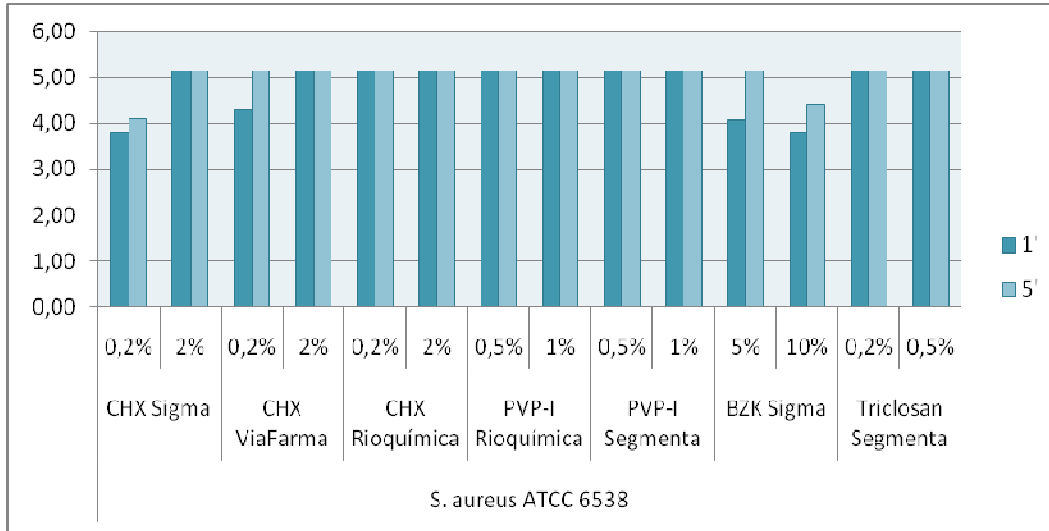


Figura 10. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *S. aureus* ATCC 6538 para todos os biocidas testados.

Na Figura 11 é possível visualizar os resultados de todos os biocidas testados contra a amostra de *S. aureus* SCCmec tipIV. A clorexidina das marcas Sigma® e ViaFarma®, apresentaram efeito microbiocida na concentração de 0,5% e no teste com cloreto de benzalcônio, o biocida foi efetivo na concentração de 5% em cinco minutos de contato.

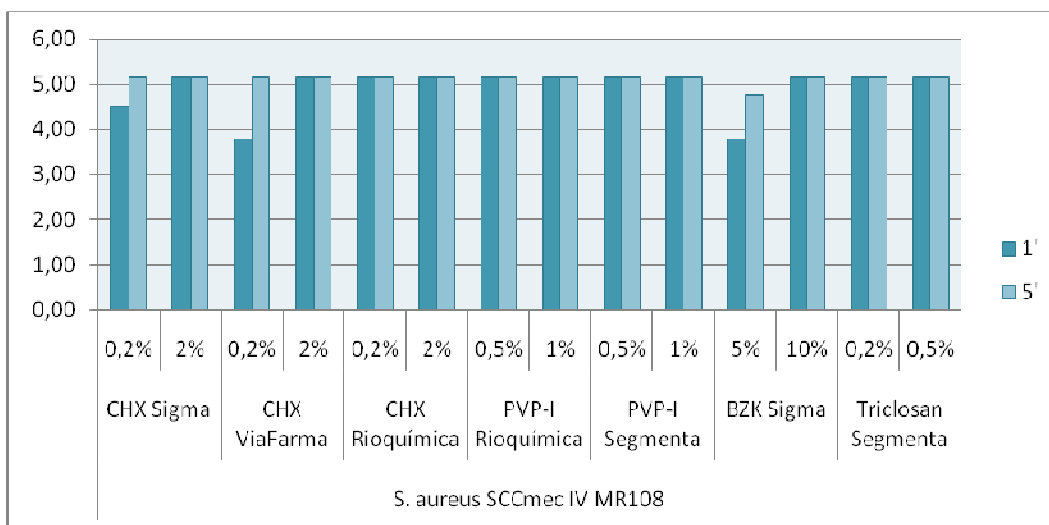


Figura 11. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *S. aureus* MR108 SCCmec IVc para todos os biocidas testados.

O crescimento da amostra de *S. aureus* A1721 SCCmec III (Figura 12) foi inibido por todos os biocidas em todas as concentrações e tempos de contato testados.

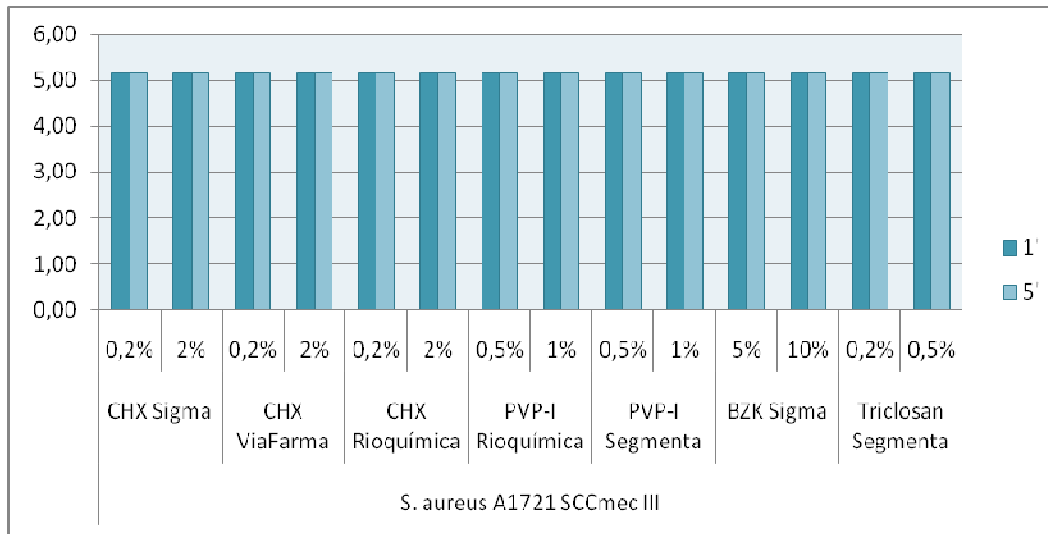


Figura 12. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *S. aureus* ATCC A1721 SCCmec III para todos os biocidas testados.

Na Figura 13 estão dispostos os resultados de todos os biocidas testados contra a amostra de *E. faecalis* A29964. Para clorexidina na concentração de 0,2% e um minuto de contato, somente o biocida da marca Rioquímica® foi eficaz em reduzir ≥ 5 log o número de UFC/mL. Nessa mesma concentração, porém com tempo de contato de cinco minutos, as três marcas de clorexidina apresentaram redução > 5 log UFC/mL. Triclosan não foi ativo na concentração de 0,2% e cinco minutos de contato. Cloreto de benzalcônio e PVP-I reduziram o número de UFC/mL em pelo menos 5 log nas menores concentrações testadas e com um minuto de contato.

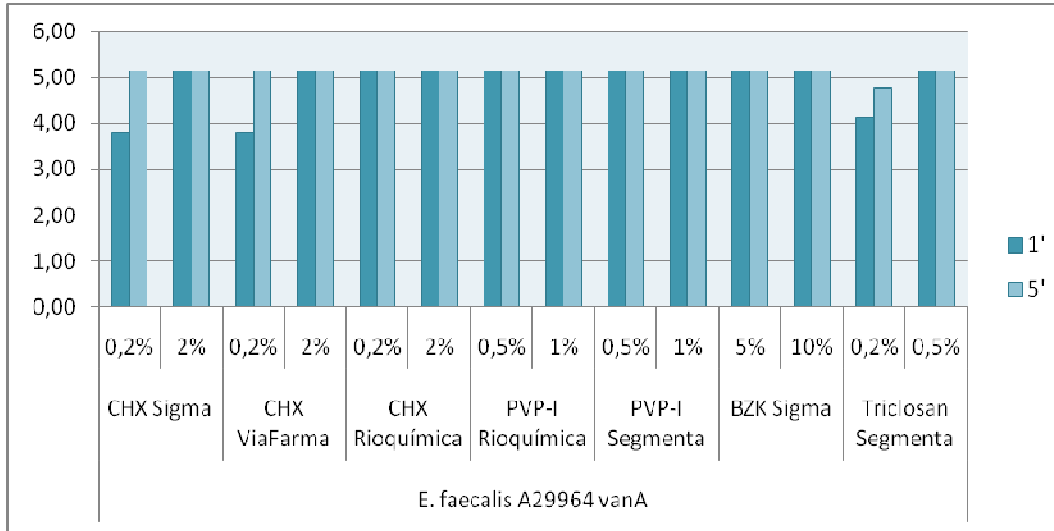


Figura 13. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *E. faecalis* A29964 vanA para todos os biocidas testados.

Na Figura 14 pode-se observar os resultados da amostra de *P. aeruginosa* ATCC 15442. Cloreto de benzalcônio não apresentou redução > 5 log no número de UFC/mL na concentração de 5% e um minuto de contato, porém no tempo de cinco minutos nessa mesma concentração foi eficaz em atingir redução > 5 log UFC/mL. Triclosan não foi eficaz em reduzir o número de UFC/mL em ambas as concentrações testadas. Os outros agentes biocidas, clorexidina e PVP-I, apresentaram redução > 5 log UFC/mL em minuto de contato e nas menores concentrações testadas.

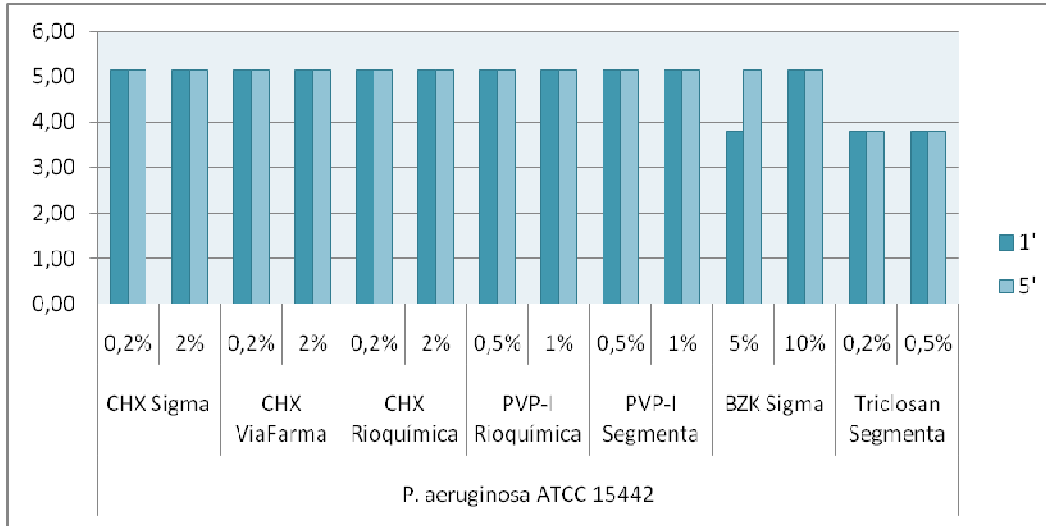


Figura 14. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *P. aeruginosa* ATCC 15442 para todos os biocidas testados.

A amostra de *P. aeruginosa* P10093 (Figura 15) não apresentou diminuição > 5 log no número de UFC/mL na presença de triclosan e no teste com cloreto de benzalcônio não foi inibida na concentração de 10% no tempo de um minuto. No teste com clorexidina só apresentou crescimento na concentração de 0,2% da marca ViaFarma®, tempo de contato de um minuto.

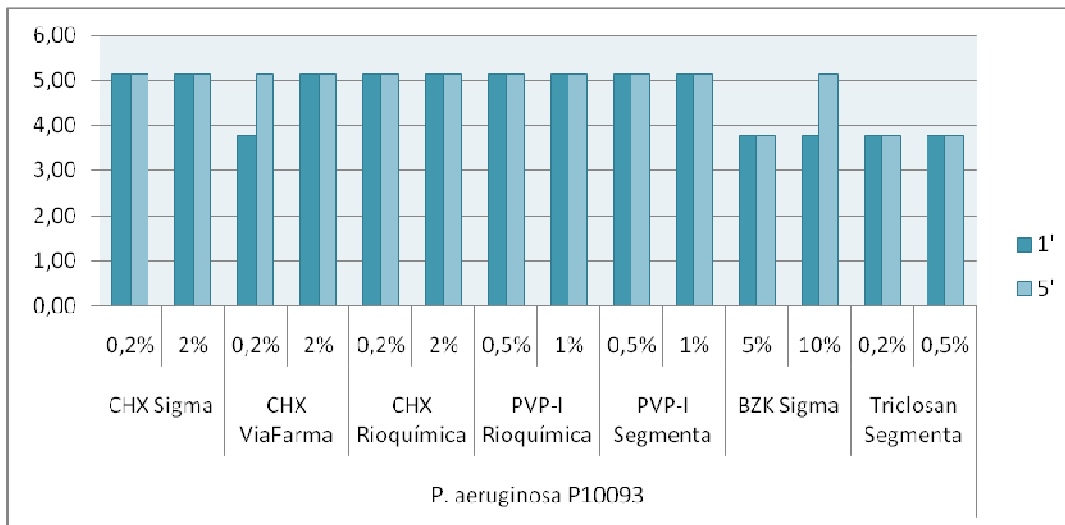


Figura 15. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *P. aeruginosa* P10093 para todos os biocidas testados.

Na figura 16 estão dispostos os resultados da amostra de *P. aeruginosa* P1088. Cloredixina na concentração de 2% foi ativa em todas as marcas testadas. Na concentração de 0,2% o crescimento não foi inibido no tempo de um minuto para a clorexidina da marca Sigma® e cinco minutos para a clorexidina das marcas ViaFarma® e Rioquímica®. Cloreto de benzalcônio apresentou redução > 5 log no número de UFC/mL na menor concentração testada. O triclosan não apresentou efeito esperado, assim como para todas as outras amostras de *P. aeruginosa*.

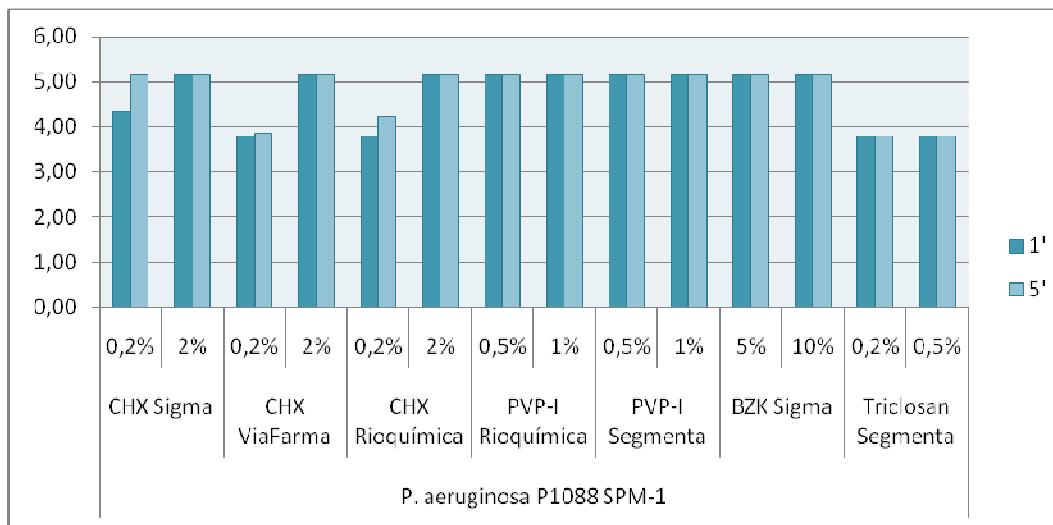


Figura 16. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *P. aeruginosa* P1088 SPM-1 para todos os biocidas testados.

A amostra de *A. baumannii* (Figura 17) foi sensível a todas as marcas de clorexidina testadas e ao PVP-I, independente da concentração e tempo de contato com o biocida. O cloreto de benzalcônio só demonstrou redução > 5 log no número de UFC/mL na concentração de 10% e o triclosan não apresentou redução no número de UFC/mL.

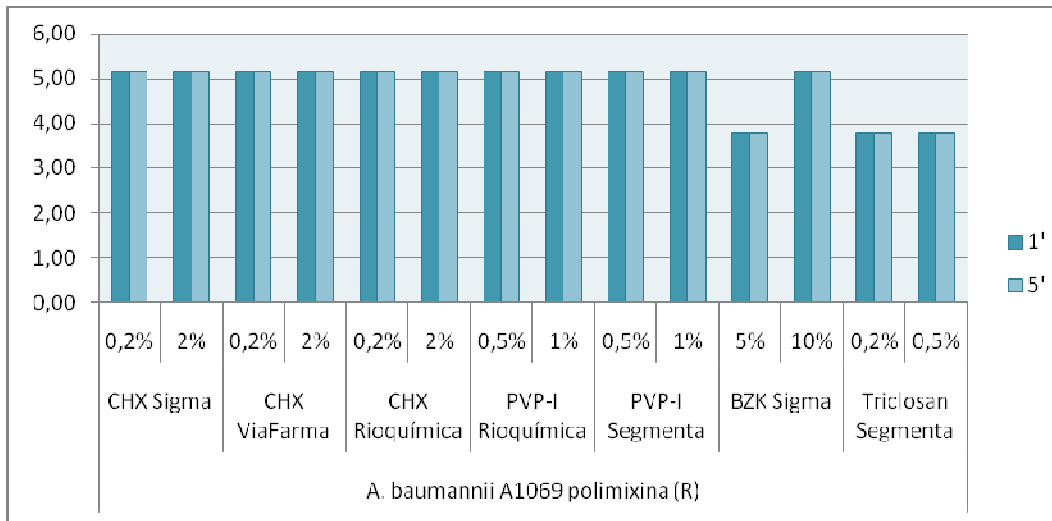


Figura 17. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *A. baumannii* A1069 polimixina (R) para todos os biocidas testados.

A amostra de *K. pneumoniae* A13309 apresentou perfil de sensibilidade aos biocidas semelhante ao isolado de *A. baumannii* A1069. Não apresentou redução > 5 log no número de UFC/mL na presença de triclosan e, no teste com cloreto de benzalcônio, seu crescimento foi inibido na concentração de 5% e tempo de contato de cinco minutos (Figura 18).

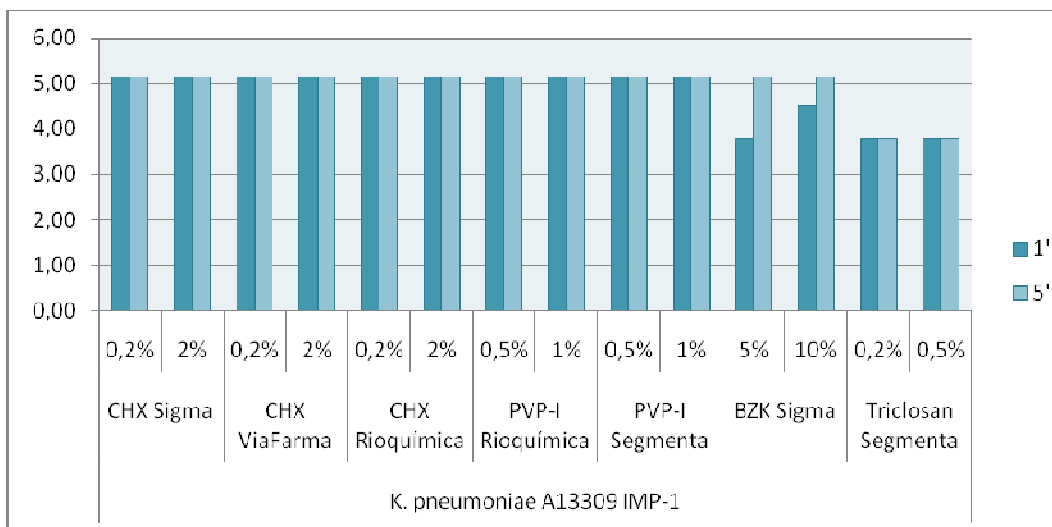


Figura 18. Representação gráfica da redução logarítmica da amostra de *K. pneumoniae* A13309 IMP-1, para todos os biocidas testados.

Na Figura 19 é estão apresentados os resultados da atividade de todos os biocidas avaliados no estudo contra todas as amostras testadas. Clorexidina e PVP-I foram os agentes mais ativos. Triclosan por não apresentar efeito microbiocida sobre as amostras Gram negativas testadas foi o agente que apresentou menor atividade antimicrobiana na comparação com os outros biocidas. O cloreto de benzalcônio demonstrou boa atividade na concentração de 10% e cinco minutos de contato.

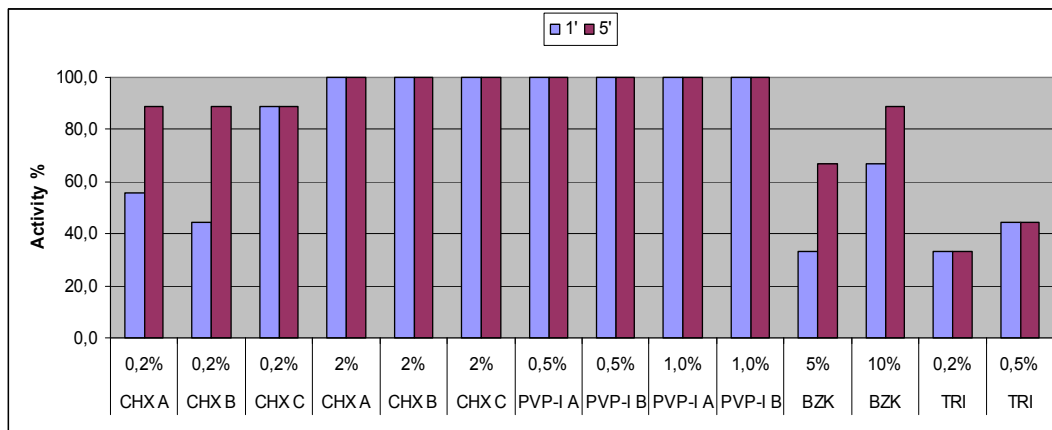


Figura 19. Análise comparativa da atividade antimicrobiana dos diferentes biocidas testados nas concentrações e tempos de contatos definidos contra todas amostras avaliadas.

Legenda:

CHX "A" - Sigma®

CHX "B" - ViaFarma®

CHX "C" - Rioquímica®

PVP-I "A" - Rioquímica® PVP-I "B" - Biosintética®

4.7 Controles da Técnica

Controle experimental "A" - Validação das condições de teste selecionadas e verificação da ausência de algum efeito letal nas condições de teste.

O controle "A" demonstrou não haver problema algum nas condições do teste, tais como temperatura da estufa, meio de cultura, inóculo etc. Os

organismos viáveis representaram 140 (± 20) UFC/mL o que é equivalente a $1,4 (\pm 0,2) \times 10^3$ UFC/mL.

Controle experimental “B” - Verificação de ausência de toxicidade do neutralizador.

O número de organismos viáveis foi de 140 (± 20) UFC/mL o que é equivalente a $1,4 (\pm 0,2) \times 10^3$ UFC/mL e estava dentro dos limites básicos, confirmando que o neutralizador utilizado não atrapalhou a viabilidade dos organismos testados no tempo de contato de cinco minutos.

Controle experimental “C” - Verificação da eficiência do neutralizador em inativar o biocida.

Tabela 9. Controles da técnica para o biocida clorexidina

CHX Sigma®			CHX ViaFarma®			CHX Rioquímica®		
Controles	ATCC 6538	ATCC 15442	Controles	ATCC 6538	ATCC 15442	Controles	ATCC 6538	ATCC 15442
A	177 UFC/mL	144 UFC/mL	A	135 UFC/mL	154 UFC/mL	A	143 UFC/mL	144 UFC/mL
B	180 UFC/mL	146 UFC/mL	B	170 UFC/mL	146 UFC/mL	B	128 UFC/mL	146 UFC/mL
C	130 UFC/mL	178 UFC/mL	C	129 UFC/mL	176 UFC/mL	C	130 UFC/mL	138 UFC/mL

Tabela 10. Controles da técnica para os biocidas cloreto de benzalcônio e triclosan

Cloreto de benzalcônio			Triclosan		
Controles	ATCC 6538	ATCC 15442	Controles	ATCC 6538	ATCC 15442
A	177 UFC/ml	144 UFC/ml	A	135 UFC/ml	154 UFC/ml
B	180 UFC/ml	146 UFC/ml	B	170 UFC/ml	146 UFC/ml
C	130 UFC/ml	178 UFC/ml	C	129 UFC/ml	176 UFC/ml

A contagem do número de UFC/mL do inóculo inicialmente utilizado não mostrou redução significativa após adição do mesmo inóculo ao biocida neutralizado, portanto a combinação de lecitina 3 g/L, polisorbato 80 (Tween 80[®]) 30 g/L, tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5 g/L, L-histidina 1 g/L e saponina 30g/L mostrou-se ativa em neutralizar os diferentes biocidas testados, como exemplificado na Figura 20.

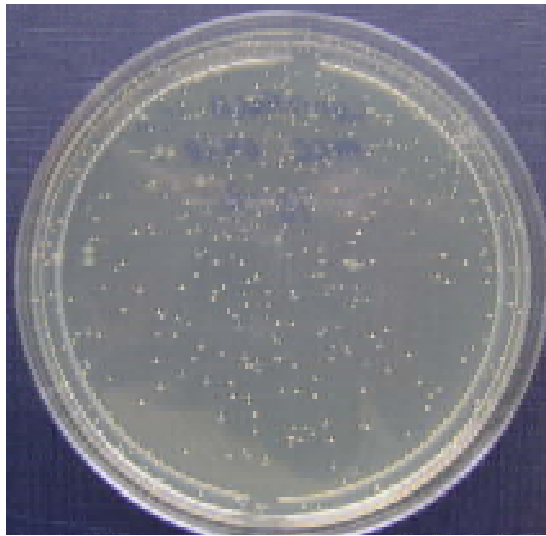


Figura 20. Controle "C". Verificação da eficiência do neutralizador em inativar o biocida.

4.8 Amostras com sensibilidade reduzida aos biocidas.

Todas as amostras que apresentaram crescimento em alguma das concentrações testadas foram armazenadas no banco de microrganismos do Laboratório ALERTA. A relação das amostras está disposta na Tabela 11.

Tabela 11. Amostras bacterianas com sensibilidade reduzida aos biocidas

Amostra Bacteriana	[Biocida]	TC	Marca¹
<i>S. aureus</i> SCCmec IVc MR108	QAC 5%	1'	X
<i>K. pneumoniae</i> A13309	QAC 5%	1'	X
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	QAC 5%	5'	X
<i>A. baumannii</i> A1069	QAC 5%	5'	X
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	QAC 10%	5'	X
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	QAC 10%	1'	X
<i>P. aeruginosa</i> P10093	QAC 10%	1'	X
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CHX 0.2%	1'	ViaFarma [®]
<i>S. aureus</i> MR108 SCCmec IVc	CHX 0.2%	1'	ViaFarma [®]
<i>E. faecalis</i> A29964	CHX 0.2%	1'	ViaFarma [®]
<i>P. aeruginosa</i> P10093	CHX 0.2%	1'	ViaFarma [®]
<i>E. faecalis</i> A29964	CHX 0.2%	1'	Rioquímica [®]
<i>S. aureus</i> A1721 SCCmec III	CHX 2%	1'	Rioquímica [®]
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CHX 0.2%	5'	Sigma [®]
<i>E. faecalis</i> A29964	CHX 0.2%	1'	Sigma [®]
<i>S. aureus</i> MR108 SCCmec IVc	CHX 0.2%	1'	Sigma [®]
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	TRI 0.5% ²	5'	X
<i>P. aeruginosa</i> P10093	TRI 0.5% ²	5'	X
<i>K. pneumoniae</i> 13309	TRI 0.5%	5'	X
<i>A. baumannii</i> A1069	TRI 0.5%	5'	X
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CHX 0.2%	1'	Sigma [®]
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CHX 0.2%	1'	ViaFarma [®]
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	CHX 0.2%	5'	ViaFarma [®]
<i>P. aeruginosa</i> P1088	CHX 0.2%	1'	Sigma [®]
<i>P. aeruginosa</i> P1088	CHX 0.2%	5'	ViaFarma [®]
<i>P. aeruginosa</i> P1088	CHX 0.2%	1'	Rioquímica [®]
<i>P. aeruginosa</i> P1088	TRI 0.5%	5'	X

¹. Somente um marca dos biocidas triclosan e cloreto de benzalcônio foi testada.

²*P. aeruginosa* é naturalmente resistente ao triclosan; porém, as amostras foram bancadas caso haja necessidade de realizarmos algum estudo sobre triclosan como um agente indutor de resistência.

4.9 Análise do DNA Cromossômico

O resultado da análise do DNA cromossômico demonstrou existir relação genética entre as amostras clínicas e as que apresentaram sensibilidade reduzida aos biocidas. Na Tabela 12 e Figura 21 é possível visualizar as amostras testadas.

Tabela 12. Padrão genotípico das amostras com sensibilidade reduzida a biocidas submetidas ao PFGE

Ordem no Gel	Amostra	Perfil PFGE
1	<i>S. aureus</i> MR108	A
2	<i>S. aureus</i> MR108	A
3	<i>S. aureus</i> MR108	A
4	<i>S. aureus</i> A1721	B
5	<i>S. aureus</i> A1721	B
6	<i>S. aureus</i> A1721	B
7	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C
8	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C
9	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C
10	<i>K. pneumoniae</i> A13309	C
11	<i>K. pneumoniae</i> A13309	C
12	<i>E. faecalis</i> A29964	D
13	<i>E. faecalis</i> A29964	D
14	<i>E. faecalis</i> A29964	D
15	<i>A. baumannii</i> A 1069	E
16	<i>A. baumannii</i> A 1069	E
17	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	F
18	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	F
19	<i>P. aeruginosa</i> P10093	G
20	<i>P. aeruginosa</i> P10093	G
21	<i>P. aeruginosa</i> P10093	G
22	<i>P. aeruginosa</i> P1088	H
23	<i>P. aeruginosa</i> P1088	H
24	<i>P. aeruginosa</i> P1088	H
25	<i>P. aeruginosa</i> P1088	H

Na Figura 21 estão representadas as onze primeiras amostras submetidas à corrida eletroforética após a técnica de PFGE.

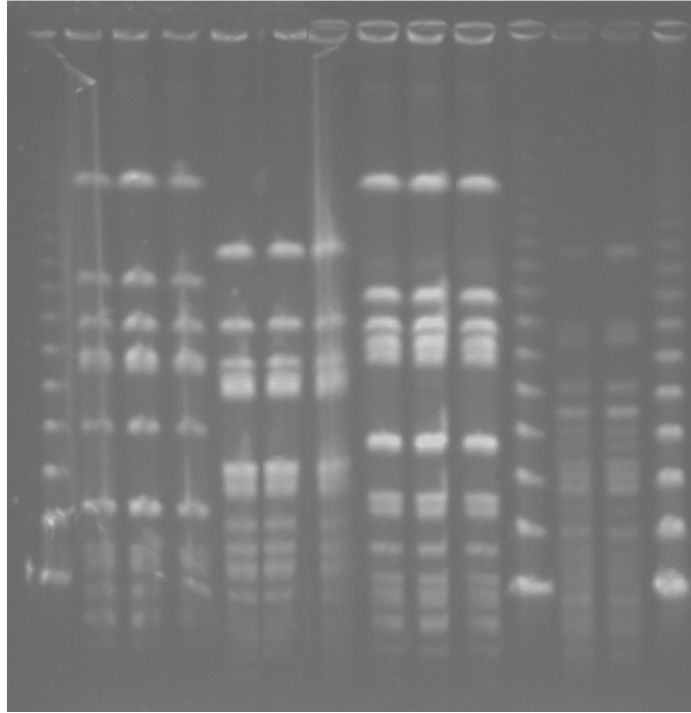


Figura 21. Padrão genotípico das amostras um a 11, as quais apresentaram sensibilidade reduzida aos biocidas.

Na Figura 22, estão apresentadas as amostras de *E. faecalis* e *A. baumannii*.

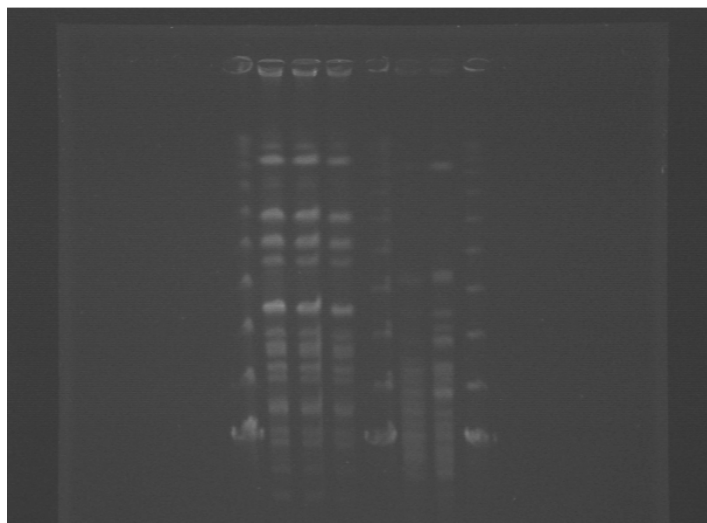


Figura 22. Padrão genotípico das amostras 12 à 16.

Na Figura 23, estão representadas as amostras de *P. aeruginosa*, ATCC 15442 e P10093.

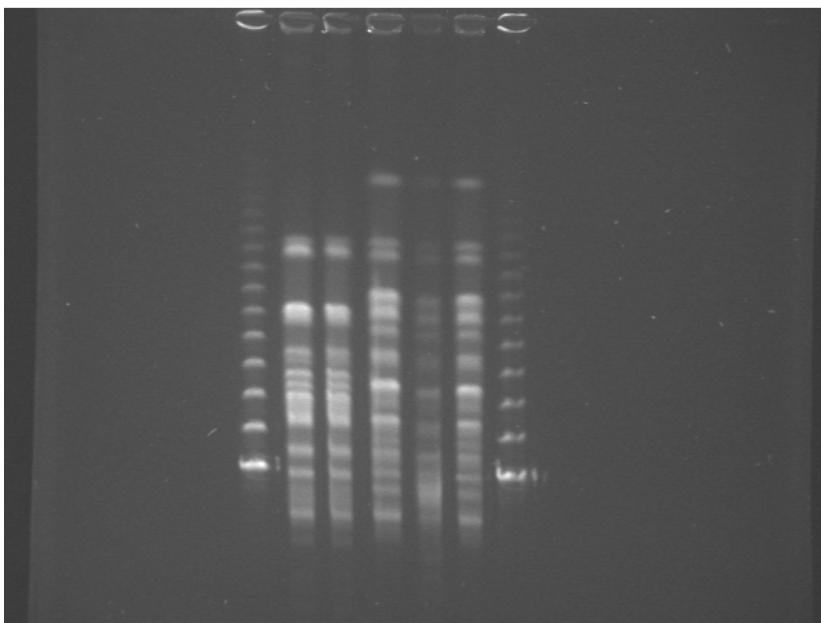


Figura 23. Padrão genotípico das amostras 17 a 21

5 DISCUSSÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos eleva a morbi-mortalidade dos pacientes com infecções adquiridas na comunidade e, principalmente, daqueles que adquirem IRAS (130). Alguns patógenos responsáveis por infecções comunitárias, como *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria* spp. e *Salmonella* spp. são de grande importância, principalmente, quando são resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento destas infecções. (131; 132). Já no ambiente hospitalar, destacam-se as amostras de MRSA, *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, *K. pneumoniae* produtora de β -lactamases de amplo espectro (ES β L), *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenems (133).

O controle da resistência bacteriana é complexo e exige atuação em vários setores, sendo que as atividades mais eficazes envolvem a racionalização do uso de antimicrobianos e as medidas efetivas no controle da disseminação das IRAS. Porém, para que essas medidas sejam implementadas é necessário que se conheçam os fatores envolvidos na disseminação das amostras isoladas localmente.

Os biocidas são amplamente utilizados no combate às bactérias no ambiente hospitalar. O principal objetivo da utilização desses compostos é eliminar as bactérias da pele e do ambiente e, conseqüentemente, auxiliar na diminuição da frequência das IRAS. Entretanto, o amplo uso dos biocidas têm sido associado à seleção de bactérias resistentes a distintos antibióticos (134). No Brasil, clones bacterianos apresentando resistência a múltiplas drogas já foram encontrados em distintas e distantes regiões, sendo que atualmente,

estes microrganismos são endêmicos em muitas delas (68; 135-137). Por essa razão, o principal objetivo deste estudo foi avaliar se a disseminação de tais clones bacterianos multirresistentes poderia ter sido facilitada pela tolerância ou redução da sensibilidade aos biocidas comumente utilizados no ambiente hospitalar.

Poucos estudos brasileiros avaliaram a atividade antibacteriana de biocidas contra amostras bacterianas responsáveis por IRAS (138) e, até onde é do nosso conhecimento, nenhum estudo avaliou a sensibilidade aos biocidas do clone endêmico brasileiro de *S. aureus* resistente à metilina ou do clone de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1.

Este foi o primeiro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa que avaliou a atividade antibacteriana de distintos biocidas, incluindo o digluconato de clorexidina, o cloreto de benzalcônio, o triclosan e o PVP-I (polivinil-pirrolidona-iodo) de diferentes marcas comerciais, em distintas concentrações e tempos de contato. Quando decidimos realizar este estudo nos deparamos com a falta de padronização para o teste de sensibilidade aos biocidas pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI). Apesar de não haver padronização para realizar testes com biocidas pelo CLSI, alguns autores utilizam as mesmas técnicas recomendadas por este comitê para a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos para avaliar a sensibilidade *in vitro* de amostras bacterianas aos biocidas. Ao contrário, neste estudo, foi optado pela utilização da Norma Européia EN1040, já que é específica para a avaliação da atividade antibacteriana dos biocidas, em meio líquido (teste de suspensão), levando em consideração a utilização de neutralizadores. Desta maneira, evita-se que a atividade antibacteriana do biocida seja superestimada. Além disso,

essa norma recomenda que sejam testadas as cepas *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442, as quais podem ser adquiridas comercialmente. Essas cepas apresentam sensibilidade reduzida a biocidas, podendo servir como controle de qualidade para a realização do teste.

Nesse estudo, as amostras foram subcultivadas em meio sólidos. Brill e colaboradores (2006) reportaram a influência do meio de cultivo nos resultados dos testes de suspensão quantitativo para a avaliação da sensibilidade aos biocidas. Estes autores reportaram que os organismos cultivados em ágar sólido eram significativamente mais sensíveis aos biocidas que aqueles crescidos em meios líquidos (139). Estas diferenças foram mais pronunciadas com amostras de *S. aureus* (diferenças > 5 log entre o meio líquido e sólido) quando comparadas àquelas de *P. aeruginosa* (diferenças de 2,5 log). Além disso, realizamos o teste de suspensão, de acordo com a norma europeia EN1040, sendo que células em suspensão são inativadas mais rapidamente quando entram em contato com o biocida que as células testadas em meio sólido ou superfície secas (teste de superfície). Concentrações que promoveram redução >5 log no teste de suspensão apresentaram menor atividade (redução de 2 a 4 log) no teste de superfície (140; 141).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, as três marcas testadas de clorexidina demonstraram excelente atividade na concentração de 2%, apresentando redução > 5 log na contagem das UFC/mL para todos os microrganismos avaliados. Diversos autores têm analisado o perfil de sensibilidade à clorexidina de patógenos resistentes a antibióticos (142-145). Al-Masudi e colaboradores relataram que tanto as cepas de MRSA como as de MSSA, foram sensíveis à clorexidina (146). Em contraste, outro estudo

reportou que amostras de MRSA exibiam aumento de 5 a 10 vezes na CIM de clorexidina, quando comparadas às amostras de MSSA (147). As amostras de *S. aureus* avaliadas nesse estudo apresentaram diferença no perfil de sensibilidade à clorexidina, sendo que a amostra A1721 foi inibida nas menores concentrações testadas. Por outro lado, as amostras MR108 e ATCC 6538 apresentaram sensibilidade reduzida à clorexidina. A redução da sensibilidade à clorexidina da cepa de *S. aureus* ATCC 6538 era esperada, já que esta amostra apresenta sensibilidade reduzida à biocidas (www.atcc.org/) e é preconizada pela EN1040 para testar a eficiência desses agentes. Porém, este achado é interessante para a amostra MR108 e, talvez, possa ser uma das razões que justifique o aumento na frequência do isolamento de MRSA SCCmec tipo IVc em hospitais brasileiros (Inoue, 2008 Dissertação de Mestrado).

Aspectos genéticos bacterianos relacionados à resistência a antibióticos e tolerância a biocidas são bem conhecidos entre amostras de *S. aureus* (148). A diminuição da sensibilidade à clorexidina e a compostos quaternários de amônio têm sido relatadas como frequentes entre amostras de MRSA. A tolerância dessas amostras pode ser mediada pelos genes da família *qac*, os quais codificam canais protéicos transportadores próton-dependentes, envolvidos em sistemas de efluxo, que reduzem ativamente o acúmulo intracelular de substâncias tóxicas, como, por exemplo, a clorexidina e o cloreto de benzalcônio. De acordo com estudos recentes, a sensibilidade reduzida de *S. aureus* à clorexidina é associada aos genes *qacA* e *qacB*. Isolados MRSA carreadores desses genes apresentam CIM ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ para clorexidina (149; 150). Em nosso estudo, a pesquisa dos genes *qac* não foi realizada.

Entretanto, Noguchi e colaboradores demonstraram que um terço dos isolados MRSA com sensibilidade reduzida à clorexidina não possuíam estes genes, sugerindo que outros mecanismos podem contribuir para a redução da sensibilidade à clorexidina (151).

As amostras de *S. aureus* MR108 e ATCC 6538 também não apresentaram redução > 5 log na contagem das UFC/mL na concentração de 5,0% de cloreto de benzalcônio. Outros estudos também reportaram a redução da sensibilidade aos quaternários de amônio entre amostras de MRSA relacionadas também à presença do gene *qacA* (152) (153).

Os resultados obtidos para a amostra de *E. faecalis* resistente à vancomicina apresentaram algumas diferenças em relação às amostras de *S. aureus* testadas. A amostra de *E. faecalis* não apresentou redução > 5 log UFC/mL nas três marcas testadas de clorexidina na concentração de 0,2% e tempo de contato de um minuto. De acordo com Fraise, espécies de *Enterococcus* são menos sensíveis à ação dos biocidas que amostras de *Staphylococcus*. (154).

Quando realizamos o teste com o cloreto de benzalcônio na concentração de 5% contra a amostra de VRE, esse biocida apresentou melhor atividade que a clorexidina na concentração de 0,2%. Em um estudo conduzido por Anderson e colaboradores foi relatado que amostras de VRE são mais sensíveis aos quaternários de amônio que amostras de *Enterococcus* sensíveis à vancomicina - (155).

Como mencionado anteriormente, diferentes antissépticos e desinfetantes apresentam atividade variada contra distintos tipos de microrganismos devido à diversidade das estruturas celulares, da composição

e da fisiologia bacteriana. Bactérias Gram negativas são mais resistentes a ação dos biocidas que organismos Gram positivos. Nesse estudo, foi possível constatar que o biocida triclosan não apresentou efeito microbiocida contra as amostras Gram negativas testadas. Por outro lado, na concentração de 0,5% (5 mg/mL), o triclosan apresentou redução > 5 log na contagem das UFC/mL contra todas as amostras Gram positivas testadas, inclusive as cepas MRSA. A sensibilidade reduzida ao triclosan já foi reportada entre isolados clínicos de *S. aureus*. Entretanto, nesses estudos, a redução da sensibilidade ao triclosan não foi associada à resistência à metilina ou a outros antibióticos (156; 157).

O triclosan possui um mecanismo de ação específico, que bloqueia a síntese de ácidos graxos bacterianos. O gene *fabI* codifica uma proteína carreadora necessária para a síntese destes ácidos. Alterações neste gene podem levar à codificação de uma proteína alterada ou, até mesmo, a não produção desta. Heath e colaboradores (158; 159) demonstraram que mutações no gene *fabI* resultaram em sensibilidade reduzida ao triclosan. Este poderia ser o motivo pela falta de atividade do triclosan contra as bactérias Gram negativas. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência ao triclosan como, por exemplo, o conteúdo lipídico da parede celular bacteriana e/ou a hiperexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexJK e triABC (160), como descrito em amostras de *P. aeruginosa*. Portanto, a falta de atividade do triclosan contra o clone produtor de SPM-1, a amostra P10093 e a cepa ATCC 15442 não foi inesperada.

P. aeruginosa é um importante patógeno, caracterizado por apresentar resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos (161). Essa resistência é fortemente associada à hiperexpressão dos sistemas de efluxo da família RND,

os quais podem ejetar uma ampla variedade de substratos, incluindo antibióticos, detergentes e solventes orgânicos. De acordo com nossos resultados, as diferentes amostras de *P. aeruginosa* testadas apresentaram redução > 5 log na contagem das UFC/mL na concentração de 2% de clorexidina e 1% de PVP-I. Recentemente, Riou e colaboradores (162) avaliaram 137 amostras de *P. aeruginosa* e concluíram que o PVP-I e a clorexidina estavam entre os agentes mais ativos, apresentando efeito microbicida contra as amostras testadas nas concentrações de 1% e 0,04%, respectivamente. Além disso, os autores relataram que amostras com sensibilidade reduzida à clorexidina apresentavam maiores CIMs para antimicrobianos antipseudomonas, como a amicacina e a cefepima. É importante ressaltar que nesse trabalho os autores realizaram os testes de sensibilidade aos biocidas pelo método de microdiluição em caldo conforme preconizado pelo CLSI. Isso significa que a atividade dos biocidas não foi neutralizada após o tempo de contato, o que poderia justificar os valores mais baixos da CIM para clorexidina.

Similarmente, o PVP-I foi um dos agentes testados que apresentaram maior atividade. Este agente foi capaz de inibir o crescimento de todas as amostras testadas independente do tempo de contato, da concentração testada e da marca utilizada.

Os sistemas de efluxo não ejetam somente pequenas moléculas hidrofílicas, como antibióticos, mas também xenobióticos, tais como os compostos quaternários de amônio. Mutantes que hiperexpressam esses sistemas podem ser selecionados não somente pelos antimicrobianos utilizados no tratamento das doenças infecciosas, mas também por numerosos

agentes usados rotineiramente, dentro e fora do ambiente hospitalar, como por exemplo, o triclosan, presente na formulação de sabonetes e soluções desinfetantes (163). A associação entre a exposição crônica a concentrações subletais de biocidas *in vitro* e mudanças no perfil de sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos têm sido demonstrados (164). Estudos recentes demonstram que as bombas de efluxo são responsáveis por ejetar distintos substratos e contribuem para a resistência intrínseca de bactérias Gram negativas. Essas bombas são codificadas pelo cromossomo bacteriano e podem ter sua expressão induzida por concentrações subletais de agentes antimicrobianos (165; 166).

Tanto em instituições de assistência à saúde como no ambiente domiciliar, bactérias podem ser submetidas à maior pressão seletiva pelo uso de biocidas, criando condições favoráveis de crescimento para as amostras que apresentam algum grau de tolerância a esses compostos. Há diversos estudos *in vitro* demonstrando que o uso de antimicrobianos pode selecionar microrganismos com mecanismos de resistência mediados por bombas de efluxo (167; 168). Um exemplo é o caso da espécie *P. aeruginosa*, que é normalmente resistente ao triclosan. Essa resistência é conferida pela hiperexpressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexJK e triABC, responsáveis também pela diminuição da sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento de IRAS (169). Em outro estudo que avaliou o patógeno entérico *E. coli* O157, os autores relataram que a exposição aos compostos quaternários de amônio e bisfenóis foi capaz de produzir resistência cruzada, provavelmente adaptativa, a vários antimicrobianos, incluindo a tetraciclina, o cloranfenicol e a clorexidina (170).

Estes trabalhos corroboram com a hipótese de que amostras bacterianas com sensibilidade reduzida aos biocidas podem surgir na prática como consequência do uso desses agentes e, conseqüentemente, pode resultar no aparecimento de resistência cruzada aos antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções humanas.

No laboratório, é possível desenvolver mutantes com sensibilidade reduzida aos biocidas; porém, a tolerância dos microrganismos a esses compostos é algo a ser questionado. A perda de sensibilidade *in vitro* aos biocidas não se correlaciona com a falha do agente em questão, pois a concentração utilizada rotineiramente é muito maior que a CIM observada no teste *in vitro*. A perda de sensibilidade aos biocidas e os alvos que os antibióticos têm em comum com os biocidas são de grande importância e interesse clínico. Embora mecanismos de perda de sensibilidade aos biocidas têm sido observados em estudos laboratoriais, falta evidência de que esses mecanismos, intrínsecos ou adquiridos, resultem em falha do agente biocida. Como podemos observar nesse estudo, os principais biocidas utilizados nas instituições de assistência a saúde são ativos nas concentrações de uso. Porém, podemos observar também, que as amostras estudadas apresentam sensibilidade reduzida aos biocidas, pois houve crescimento bacteriano nas concentrações testadas.

Nesse estudo, o PVP-I foi o único biocida a demonstrar efeito bactericida independentemente da marca comercial, da concentração e do tempo de exposição. Por outro lado, o crescimento bacteriano foi evidenciado quando as concentrações de 0,2% de clorexidina e 5% cloreto de benzalcônio foram testadas contra a maioria das amostras, sugerindo a redução da sensibilidade

destas amostras a estes biocidas. Porém, quando a concentração de uso (2%) de clorexidina foi testada, este composto apresentou redução > 5 Log na contagem das UFC/mL, indicando atividade bactericida contra todas amostras avaliadas. Em contraste, quando o cloreto de benzalcônio foi testado contra as amostras *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* não houve redução significativa da contagem de colônias mesmo na concentração de uso (10%).

O tempo de contato influenciou os resultados para o biocida clorexidina, pois a maioria das amostras que cresceram na concentração de 0,2% em um minuto de contato, foram inibidas nessa concentração após cinco minutos de contato (Tabela 5). Avaliando o desinfetante cloreto de benzalcônio, o tempo de contato influenciou o resultado das amostras de *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *K. pneumoniae* (Tabela 7). Não foram observadas influências nos diferentes tempos de contato para PVP-I e triclosan. As diferentes marcas de clorexidina demonstraram ligeira diferença em relação à atividade. A marca Rioquímica foi ativa na concentração de 0,2% em cinco minutos de contato para as amostras de *S. aureus*, ATCC 6538 e SCCmec tipo IV.

Apesar deste estudo ter seguido as recomendações da EN1040 para um estudo de fase 1, ele poderia representar um estudo de fase 2, já que um número maior de amostras bacterianas foram avaliadas que aquele recomendado para um estudo de fase 1. Mesmo assim, seria interessante a realização de estudos de fase 3 para avaliar se a atividade antimicrobiana dos biocidas seria mantida após a diluição dos mesmos na concentração de uso e a sua utilização em superfície e outros materiais. Desta maneira poderíamos

avaliar se a redução da sensibilidade aos biocidas encontrada entre as amostras bacterianas avaliadas neste estudo seria significativa do ponto de vista epidemiológico.

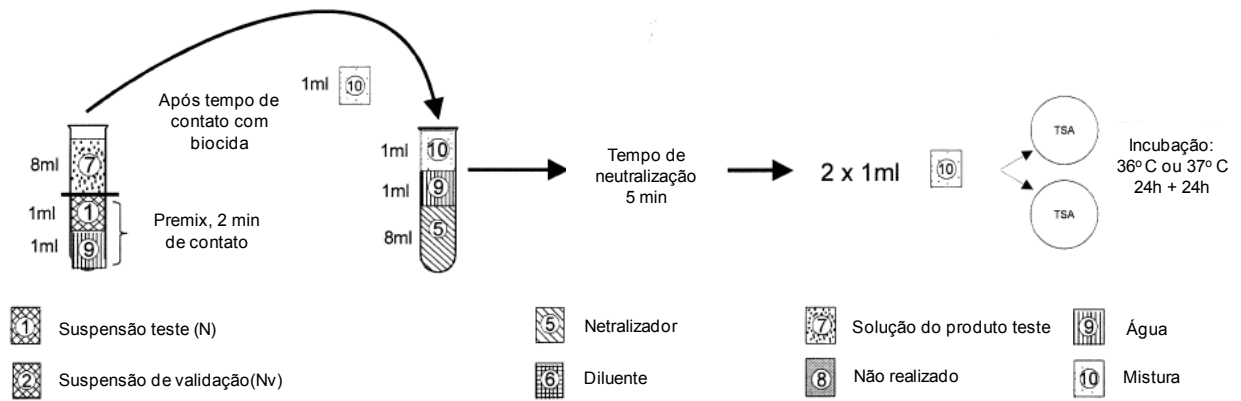
6 CONCLUSÕES

1. A avaliação da atividade antibacteriana dos biocidas foi realizada com sucesso pelo teste de diluição-neutralização, de acordo com as recomendações da EN1040.
2. O PVP-I foi o único agente antisséptico a exibir efeito microbiocida contra todas as amostras avaliadas independente da marca, do tempo de contato e concentrações testadas.
3. A clorexidina e o PVP-I nas concentrações de uso, 2% e 1% respectivamente, foram os agentes biocidas mais ativos, apresentando efeito microbiocida contra todos os isolados bacterianos, independente do tempo de contato e marca avaliada.
4. As amostras de *P. aeruginosa* P1088, de *E. faecalis* e de *S. aureus*, MR108 SCCmec tipo IVc e da ATCC 6538, apresentaram sensibilidade reduzida à clorexidina na concentração de 0,2% de todas as marcas testadas. Porém, a marca Rioquímica® apresentou efeito microbiocida contra as amostras de *S. aureus*.
5. O Cloreto de benzalcônio não apresentou efeito microbiocida na concentração de 5% contra as amostras de *P. aeruginosa*, ATCC 15442 e P10093, de *A. baumannii*, de *K. pneumoniae* e as amostras de *S. aureus*, ATCC 6538 e MR108.
6. O triclosan não apresentou efeito microbiocida contra as amostras de *A. baumannii* e *K. pneumoniae*, embora na concentração de 0,2% tenha sido ativo contra a maioria das amostras Gram positivas, exceto contra a amostra de *E. faecalis* avaliada.

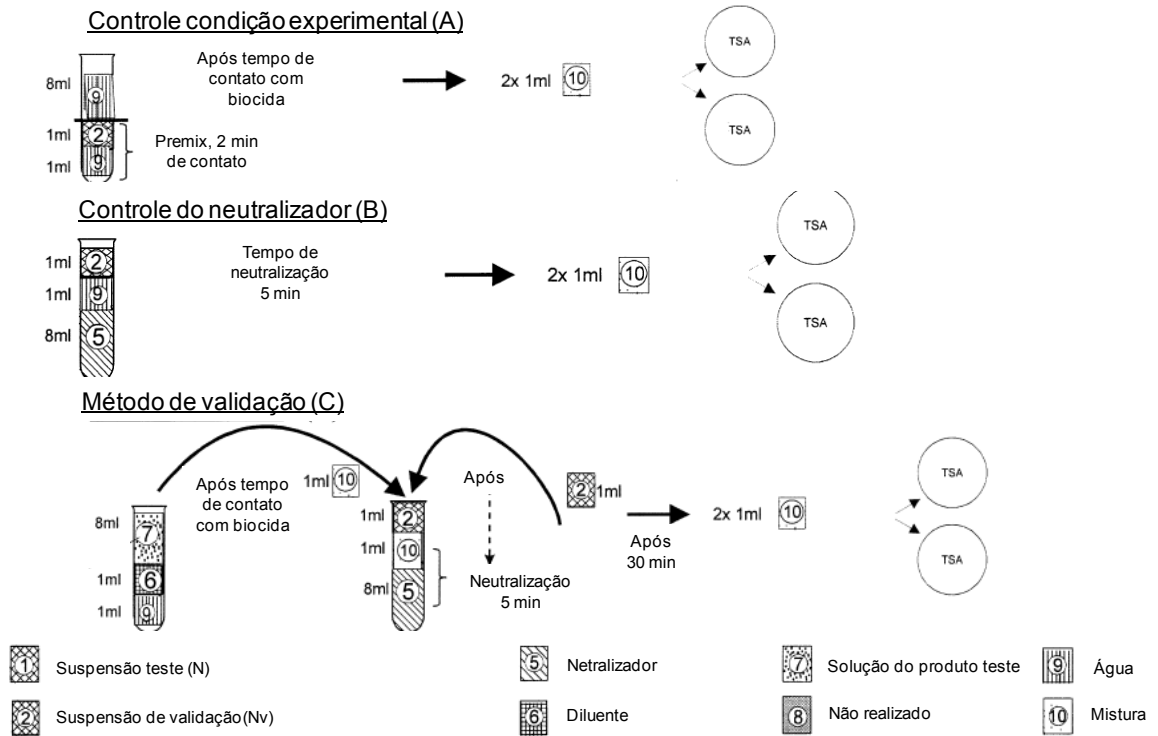
7. As cepas de referência utilizadas, *S. aureus* ATCC 6538 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 não foram mais tolerantes aos biocidas que as amostras clínicas avaliadas.
8. A amostra *P. aeruginosa* P1088 produtora de SPM apresentou sensibilidade reduzida a todas as marcas de clorexidina na concentração de 0,2%, inclusive após ter sido exposta a este biocida por cinco minutos.
9. A correlação entre resistência a antibióticos e a sensibilidade reduzida aos biocidas ainda gera muitas dúvidas e pode ser mediada por diversos mecanismos. Outros estudos são necessários para determinar a relação entre tolerância à biocidas, resistência a antibióticos e a importância epidemiológica dos nossos achados.

7 ANEXOS

Anexo 1. Método de diluição-neutralização.



Anexo 2. Validação do teste.



8 GLOSSÁRIO

Agente antibacteriano. Moléculas, geralmente de origem sintética ou semi-sintética, as quais acima de determinadas concentrações apresentam efeitos adversos sobre o crescimento de bactérias.

Agente antimicrobiano. Moléculas, geralmente de origem sintética ou semi-sintética, as quais acima de determinadas concentrações apresentam efeitos sobre o crescimento de microrganismos, que pode incluir bactérias, leveduras, bolores, vírus e protozoários.

Antibióticos. Moléculas de origem biológica utilizadas no tratamento *in vivo* de infecções.

Antissépticos. Formulações contendo agente germicida, microbiocida ou bactericida e é seguro para aplicação em organismos vivos.

Bactericida. Agente antibacteriano que em determinada concentração é capaz de matar bactérias vegetativas em um tempo de exposição específico.

Bacteriostático. Agente antibacteriano que em determinada concentração previne o crescimento de certos grupos de bactérias.

Biocidas. Moléculas, geralmente de origem sintética ou semi-sintética, as quais acima de determinadas concentrações, sob condições definidas, destroem células em um tempo de exposição específico.

Desinfetantes/sanitizantes. Formulações contendo agente germicida, microbiocida ou bactericida sendo seguro para aplicação em superfícies inertes e destruir microrganismos patogênicos (não inclui esporos bacterianos ou de fungos) em tempos de contato específicos.

Esporicida. Certos agentes antimicrobianos que em determinadas concentrações são capazes de matar endosporos bacterianos e exosporos fúngicos em um tempo de contato específico.

Esterilizantes. Certos biocidas que em determinadas concentrações são capazes de esterilizar um objeto ou uma superfície em tempo de contato específico.

Fenótipo de resistência. Expressão de uma característica que pode ser visualizada por meio do crescimento no ambiente, reflete a expressão de um gene de resistência.

Germicidas. Agentes antimicrobianos que em determinadas concentrações são capazes de matar microrganismos patogênicos em tempos de contato específicos. Podem ser aplicados em superfícies inanimadas ou vivas.

Microbiocidas. Agentes antimicrobianos que em determinadas concentrações são capazes de matar microrganismos patogênicos (incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários) em tempos de contato específicos.

Microbiostáticos. Agentes antimicrobianos que em determinadas concentrações são capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos.

Preservativo. Um produto bacteriostático ou bactericida formulado com objetivo de matar e prevenir o crescimento de microrganismos. O preservativo mantém a superfície limpa e segura para uso por um determinado tempo.

Resistência genotípica. Uma mudança no genoma, cromossomo ou um plasmídeo, que causa fenótipo de resistência.

9 REFERÊNCIAS

1. Longo, L. D., "[The etiology, concept and prevention of childbed fever. 1861]," *Am.J.Obstet.Gynecol.*, Vol. 172, No. 1 Pt 1, 1995, pp. 236-237.
2. Russell, A. D., "Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations," *Lancet Infect.Dis.*, Vol. 3, No. 12, 2003, pp. 794-803.
3. Rutala, W. A. and Weber, D. J., "Infection control: the role of disinfection and sterilization," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 43 Suppl, 1999, pp. S43-S55.
4. Perencevich, E. N., Wong, M. T., and Harris, A. D., "National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps," *Am.J.Infect.Control*, Vol. 29, No. 5, 2001, pp. 281-283.
5. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V., "Food-related illness and death in the United States," *Emerg.Infect.Dis.*, Vol. 5, No. 5, 1999, pp. 607-625.
6. Fraise, A. P., "Biocide abuse and antimicrobial resistance--a cause for concern?," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 49, No. 1, 2002, pp. 11-12.
7. Wang, J. T., Sheng, W. H., Wang, J. L., Chen, D., Chen, M. L., Chen, Y. C., and Chang, S. C., "Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 62, No. 3, 2008, pp. 514-517.
8. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
9. Russell, A. D. and McDonnell, G., "Concentration: a major factor in studying biocidal action," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 44, No. 1, 2000, pp. 1-3.
10. Russell, A. D. and McDonnell, G., "Concentration: a major factor in studying biocidal action," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 44, No. 1, 2000, pp. 1-3.
11. Russell, A. D. and McDonnell, G., "Concentration: a major factor in studying biocidal action," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 44, No. 1, 2000, pp. 1-3.
12. Russell, A. D. and McDonnell, G., "Concentration: a major factor in studying biocidal action," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 44, No. 1, 2000, pp. 1-3.

13. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
14. Russell, A. D., "Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations," *Lancet Infect.Dis.*, Vol. 3, No. 12, 2003, pp. 794-803.
15. Maillard, J. Y., "Bacterial target sites for biocide action," *Symp.Ser.Soc.Appl.Microbiol.*, No. 31, 2002, pp. 16S-27S.
16. Denyer, S. P. and Maillard, J. Y., "Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria," *J.Appl.Microbiol.*, Vol. 92 Suppl, 2002, pp. 35S-45S.
17. Russell, A. D., "Chlorhexidine: antibacterial action and bacterial resistance," *Infection*, Vol. 14, No. 5, 1986, pp. 212-215.
18. Russell, A. D. and Day, M. J., "Antibacterial activity of chlorhexidine," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 25, No. 4, 1993, pp. 229-238.
19. Milstone, A. M., Passaretti, C. L., and Perl, T. M., "Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention," *Clin.Infect.Dis.*, Vol. 46, No. 2, 2008, pp. 274-281.
20. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
21. Bhargava, H. N. and Leonard, P. A., "Triclosan: applications and safety," *Am.J.Infect.Control*, Vol. 24, No. 3, 1996, pp. 209-218.
22. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., and Schweizer, H. P., "Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 45, No. 2, 2001, pp. 428-432.
23. Kampf, G. and Kramer, A., "Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 17, No. 4, 2004, pp. 863-93, table.
24. Bhargava, H. N. and Leonard, P. A., "Triclosan: applications and safety," *Am.J.Infect.Control*, Vol. 24, No. 3, 1996, pp. 209-218.
25. Aiello, A. E., Larson, E. L., and Levy, S. B., "Consumer antibacterial soaps: effective or just risky?," *Clin.Infect.Dis.*, Vol. 45 Suppl 2, 2007, pp. S137-S147.
26. Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D., "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of

-
- chromosomally encoded resistance mechanisms," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 22, No. 4, 2009, pp. 582-610.
27. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., and Schweizer, H. P., "Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 45, No. 2, 2001, pp. 428-432.
 28. Meincke, B. E., Kranz, R. G., and Lynch, D. L., "Effect of irgasan on bacterial growth and its adsorption into the cell wall," *Microbios*, Vol. 28, No. 113-114, 1980, pp. 133-147.
 29. Aiello, A. E., Larson, E. L., and Levy, S. B., "Consumer antibacterial soaps: effective or just risky?," *Clin.Infect.Dis.*, Vol. 45 Suppl 2, 2007, pp. S137-S147.
 30. Schweizer, H. P., "Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 202, No. 1, 2001, pp. 1-7.
 31. Xia, W. J. and Onyuksel, H., "Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement," *Pharm.Res.*, Vol. 17, No. 5, 2000, pp. 612-618.
 32. Salton, M. R., "Lytic agents, cell permeability, and monolayer penetrability," *J.Gen.Physiol*, Vol. 52, No. 1, 1968, pp. 227Suppl-52s.
 33. Hugo, W. B. and Frier, M., "Mode of action of the antibacterial compound dequalinium acetate," *Appl.Microbiol.*, Vol. 17, No. 1, 1969, pp. 118-127.
 34. Ferk, F., Misik, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A., Micieta, K., Grummt, T., Ehrlich, V., and Knasmuller, S., "Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations," *Mutagenesis*, Vol. 22, No. 6, 2007, pp. 363-370.
 35. Gottardi, W., "Iodine and disinfection: theoretical study on mode of action, efficiency, stability, and analytical aspects in the aqueous system," *Arch.Pharm.(Weinheim)*, Vol. 332, No. 5, 1999, pp. 151-157.
 36. Gottardi, W., "Iodine and disinfection: theoretical study on mode of action, efficiency, stability, and analytical aspects in the aqueous system," *Arch.Pharm.(Weinheim)*, Vol. 332, No. 5, 1999, pp. 151-157.
 37. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
-

-
38. Gales, A. C., Reis, A. O., and Jones, R. N., "Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines," *J.Clin.Microbiol.*, Vol. 39, No. 1, 2001, pp. 183-190.
 39. Turnidge, J. D. and Jorgensen, J. H., "Antimicrobial susceptibility testing: general considerations," *Manual of Clinical Microbiology*, edited by Murray PR ASM Press, Washington, DC, 1999, pp. 1469-1473.
 40. Russell, A. D., "Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria," *J.Appl.Microbiol.*, Vol. 92 Suppl, 2002, pp. 121S-135S.
 41. Gilbert, P. and McBain, A. J., "Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 16, No. 2, 2003, pp. 189-208.
 42. Russell, A. D., "Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 43 Suppl, 1999, pp. S57-S68.
 43. Heinzl, M., "Phenomena of biocide resistance in microorganisms," *Int.Biodeterior.Biodegrad.*, Vol. 41, 1998, pp. 225-234.
 44. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements phase I" ("European Standard" - EN1040). 2005.
- Ref Type: Catalog
45. Fraise, A. P., "European norms for disinfection testing," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 70 Suppl 1, 2008, pp. 8-10.
 46. Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., and Bartolo, R. G., "Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 55, No. 2, 2003, pp. 98-107.
 47. Correa, J. E., De Paulis, A., Predari, S., Sordelli, D. O., and Jeric, P. E., "First report of qacG, qacH and qacJ genes in *Staphylococcus haemolyticus* human clinical isolates," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 62, No. 5, 2008, pp. 956-960.
 48. Ioannou, C. J., Hanlon, G. W., and Denyer, S. P., "Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 51, No. 1, 2007, pp. 296-306.
 49. Hancock, R. E., "Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens," *Lancet Infect.Dis.*, Vol. 5, No. 4, 2005, pp. 209-218.
 50. Russell, A. D., "Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction," *J.Appl.Microbiol.*, Vol. 92 Suppl, 2002, pp. 1S-3S.
-

-
51. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
 52. Ioannou, C. J., Hanlon, G. W., and Denyer, S. P., "Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 51, No. 1, 2007, pp. 296-306.
 53. Poole, K., "Efflux-mediated antimicrobial resistance," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 56, No. 1, 2005, pp. 20-51.
 54. Bloomfield, S. F., "Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments," *J.Appl.Microbiol.*, Vol. 92 Suppl, 2002, pp. 144S-157S.
 55. Hall, R. M., Brown, H. J., Brookes, D. E., and Stokes, H. W., "Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends," *J.Bacteriol.*, Vol. 176, No. 20, 1994, pp. 6286-6294.
 56. Paulsen, I. T., Littlejohn, T. G., Radstrom, P., Sundstrom, L., Skold, O., Swedberg, G., and Skurray, R. A., "The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 37, No. 4, 1993, pp. 761-768.
 57. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
 58. Spaulding, E. H., "Chemical disinfection of medical and surgical materials," *Disinfection, sterilization, and preservation*, edited by C. Lawrence and S. S. Block Lea & Febiger, Philadelphia, 1968, pp. 517-531.
 59. Levy, B., "Infectious keratitis: what have we learned?," *Eye Contact Lens*, Vol. 33, No. 6 Pt 2, 2007, pp. 418-420.
 60. Srinivasan, A., Wolfenden, L. L., Song, X., Mackie, K., Hartsell, T. L., Jones, H. D., Diette, G. B., Orens, J. B., Yung, R. C., Ross, T. L., Merz, W., Scheel, P. J., Haponik, E. F., and Perl, T. M., "An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections associated with flexible bronchoscopes," *N.Engl.J.Med.*, Vol. 348, No. 3, 2003, pp. 221-227.
 61. Verbraeken, H., Mendoza, A., and Van Oye, R., "Pseudophakic endophthalmitis," *Bull.Soc.Belge Ophthalmol.*, Vol. 206, 1983, pp. 55-59.
 62. Owens, R. C., Jr. and Rice, L., "Hospital-based strategies for combating resistance," *Clin.Infect.Dis.*, Vol. 42 Suppl 4, 2006, pp. S173-S181.
 63. Andrade, S. S., Sader, H. S., Barth, A., Ribeiro, J., Zoccoli, C., Pignatari, A. C., and Gales, A. C., "Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative

-
- Bacilli Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2003-2008)," *The Brazilian Society of Infectious Diseases*, Vol. 12, No. Suppl 2, 2008, pp. 3-9.
64. Abrahamian, F. M. and Moran, G. J., "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections," *N.Engl.J.Med.*, Vol. 357, No. 20, 2007, pp. 2090.
 65. Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., and Tiemersma, E., "Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat," *Lancet*, Vol. 368, No. 9538, 2006, pp. 874-885.
 66. Garnier, F., Tristan, A., Francois, B., Etienne, J., Delage-Corre, M., Martin, C., Liassine, N., Wannet, W., Denis, F., and Ploy, M. C., "Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone," *Emerg.Infect.Dis.*, Vol. 12, No. 3, 2006, pp. 498-500.
 67. Katayama, Y., Ito, T., and Hiramatsu, K., "A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 44, No. 6, 2000, pp. 1549-1555.
 68. Oliveira, D. C., Tomasz, A., and de Lencastre, H., "The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated mec elements," *Microb.Drug Resist.*, Vol. 7, No. 4, 2001, pp. 349-361.
 69. Robinson, D. A., Kearns, A. M., Holmes, A., Morrison, D., Grundmann, H., Edwards, G., O'Brien, F. G., Tenover, F. C., McDougal, L. K., Monk, A. B., and Enright, M. C., "Re-emergence of early pandemic *Staphylococcus aureus* as a community-acquired methicillin-resistant clone," *Lancet*, Vol. 365, No. 9466, 2005, pp. 1256-1258.
 70. Sader, H. S., Pignatari, A. C., Hollis, R. J., and Jones, R. N., "Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Sao Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA," *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, Vol. 15, No. 5, 1994, pp. 320-323.
 71. Gales, A. C., Andrade, S. S., Sader, H. S., and Jones, R. N., "Activity of mupirocin and 14 additional antibiotics against staphylococci isolated from Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program," *J.Chemother.*, Vol. 16, No. 4, 2004, pp. 323-328.
 72. Anthonisen, I. L., Sunde, M., Steinum, T. M., Sidhu, M. S., and Sorum, H., "Organization of the antiseptic resistance gene qacA and Tn552-related beta-lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 46, No. 11, 2002, pp. 3606-3612.
-

-
73. Li, X. Z. and Nikaido, H., "Efflux-mediated drug resistance in bacteria," *Drugs*, Vol. 64, No. 2, 2004, pp. 159-204.
 74. Anthonisen, I. L., Sunde, M., Steinum, T. M., Sidhu, M. S., and Sorum, H., "Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and Tn552-related beta-lactamase genes in multidrug-resistant *Staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 46, No. 11, 2002, pp. 3606-3612.
 75. Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A. C., and Schmitz, F. J., "Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 47, No. 6, 2001, pp. 896-897.
 76. Gales, A. C., Reis, A. O., and Jones, R. N., "Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines," *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 39, No. 1, 2001, pp. 183-190.
 77. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V., "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen," *Nature*, Vol. 406, No. 6799, 2000, pp. 959-964.
 78. Poole, K. and Srikumar, R., "Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance," *Curr. Top. Med. Chem.*, Vol. 1, No. 1, 2001, pp. 59-71.
 79. Wongsaporn, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., and Okuyama, H., "Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil," *Curr. Microbiol.*, Vol. 49, No. 6, 2004, pp. 415-422.
 80. Salis, A., Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V., "Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis," *J. Biotechnol.*, Vol. 119, No. 3, 2005, pp. 291-299.
 81. Lu, S. J., Wang, H. Q., and Yao, Z. H., "Isolation and characterization of gasoline-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated soils," *J. Environ. Sci. (China)*, Vol. 18, No. 5, 2006, pp. 969-972.
 82. Kiska, D. L. and Gilligan, P. H., "*Pseudomonas*," *Manual of Clinical Microbiology*, edited by P. R. Murray, E. J. Baron, and M. A. Pfaller ASM Press, Washington, DC, 1999, pp. 517-538.
-

-
83. Lee, S. C., Fung, C. P., Liu, P. Y., Wang, T. C., See, L. C., Lee, N., Chen, S. C., and Shieh, W. B., "Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and outcome," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Vol. 20, No. 3, 1999, pp. 205-207.
 84. Aeschlimann, J. R., "The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists," *Pharmacotherapy*, Vol. 23, No. 7, 2003, pp. 916-924.
 85. Livermore, D. M., "Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?," *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 34, No. 5, 2002, pp. 634-640.
 86. Poole, K., "Efflux-mediated antimicrobial resistance," *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 56, No. 1, 2005, pp. 20-51.
 87. Livermore, D. M. and Woodford, N., "Carbapenemases: a problem in waiting?," *Curr. Opin. Microbiol.*, Vol. 3, No. 5, 2000, pp. 489-495.
 88. Murphy, T. A., Simm, A. M., Toleman, M. A., Jones, R. N., and Walsh, T. R., "Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 47, No. 2, 2003, pp. 582-587.
 89. Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A., "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 39, No. 6, 1995, pp. 1211-1233.
 90. Poirel, L., Magalhaes, M., Lopes, M., and Nordmann, P., "Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 48, No. 4, 2004, pp. 1406-1409.
 91. Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., and Sader, H. S., "Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase," *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 52, No. 4, 2003, pp. 699-702.
 92. Picao, R. C., Poirel, L., Gales, A. C., and Nordmann, P., "Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 53, No. 9, 2009, pp. 3908-3913.
 93. Joynson, J. A., Forbes, B., and Lambert, R. J., "Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials," *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 93, No. 1, 2002, pp. 96-107.

-
94. Rutala, W. A., Stiegel, M. M., Sarubbi, F. A., and Weber, D. J., "Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectants," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Vol. 18, No. 6, 1997, pp. 417-421.
 95. Andrews, H. J., "Acinetobacter bacteriocin typing," *J. Hosp. Infect.*, Vol. 7, No. 2, 1986, pp. 169-175.
 96. Gales, A. C., Jones, R. N., Forward, K. R., Linares, J., Sader, H. S., and Verhoef, J., "Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and Stenotrophomonas maltophilia as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999)," *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 32 Suppl 2, 2001, pp. S104-S113.
 97. Tognim, M. C., Gales, A. C., Penteadó, A. P., Silbert, S., and Sader, H. S., "Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing Acinetobacter species in a Brazilian teaching hospital," *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Vol. 27, No. 7, 2006, pp. 742-747.
 98. Gales, A. C., Tognim, M. C., Reis, A. O., Jones, R. N., and Sader, H. S., "Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an Acinetobacter baumannii clinical strain from a Brazilian teaching hospital," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, Vol. 45, No. 1, 2003, pp. 77-79.
 99. Reis, A. O., Luz, D. A., Tognim, M. C., Sader, H. S., and Gales, A. C., "Polymyxin-resistant Acinetobacter spp. isolates: what is next?," *Emerg. Infect. Dis.*, Vol. 9, No. 8, 2003, pp. 1025-1027.
 100. Mendes, R. E., Spanu, T., Deshpande, L., Castanheira, M., Jones, R. N., and Fadda, G., "Clonal dissemination of two clusters of Acinetobacter baumannii producing OXA-23 or OXA-58 in Rome, Italy," *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009.
 101. Bergogne-Berezin, E. and Towner, K. J., "Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features," *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 9, No. 2, 1996, pp. 148-165.
 102. Seifert, H., Strate, A., and Pulverer, G., "Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality," *Medicine (Baltimore)*, Vol. 74, No. 6, 1995, pp. 340-349.
 103. Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., and Bonomo, R. A., "Global challenge of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 51, No. 10, 2007, pp. 3471-3484.
 104. Gales, A. C., Jones, R. N., Forward, K. R., Linares, J., Sader, H. S., and Verhoef, J., "Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and Stenotrophomonas maltophilia as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the

-
- SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999)," *Clin.Infect.Dis.*, Vol. 32 Suppl 2, 2001, pp. S104-S113.
105. Gales, A. C., Jones, R. N., and Sader, H. S., "Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004)," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 12, No. 4, 2006, pp. 315-321.
 106. Reis, A. O., Luz, D. A., Tognim, M. C., Sader, H. S., and Gales, A. C., "Polymyxin-resistant *Acinetobacter* spp. isolates: what is next?," *Emerg.Infect.Dis.*, Vol. 9, No. 8, 2003, pp. 1025-1027.
 107. Podnos, Y. D., Cinat, M. E., Wilson, S. E., Cooke, J., Gornick, W., and Thrupp, L. D., "Eradication of multi-drug resistant *Acinetobacter* from an intensive care unit," *Surg.Infect.(Larchmt.)*, Vol. 2, No. 4, 2001, pp. 297-301.
 108. Poirel, L. and Nordmann, P., "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 12, No. 9, 2006, pp. 826-836.
 109. Walther-Rasmussen, J. and Hoiby, N., "OXA-type carbapenemases," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 57, No. 3, 2006, pp. 373-383.
 110. Walther-Rasmussen, J. and Hoiby, N., "OXA-type carbapenemases," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 57, No. 3, 2006, pp. 373-383.
 111. Heritier, C., Poirel, L., and Nordmann, P., "Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 12, No. 2, 2006, pp. 123-130.
 112. Poirel, L. and Nordmann, P., "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 12, No. 9, 2006, pp. 826-836.
 113. Tognim, M. C., Gales, A. C., Penteadó, A. P., Silbert, S., and Sader, H. S., "Dissemination of IMP-1 metallo- beta -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital," *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, Vol. 27, No. 7, 2006, pp. 742-747.
 114. Martins, A. F., Kuchenbecker, R., Sukiennik, T., Boff, R., Reiter, K. C., Lutz, L., Machado, A. B., and Barth, A. L., "Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 Enzyme: Dissemination in Southern Brazil," *Infection*, 2009.
 115. Carvalho, K. R., Carvalho-Assef, A. P., Peirano, G., Santos, L. C., Pereira, M. J., and Asensi, M. D., "Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying bla(OXA-23) collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil," *Int.J.Antimicrob.Agents*, Vol. 34, No. 1, 2009, pp. 25-28.

-
116. Lincopan, N., Leis, R., Vianello, M. A., de Araujo, M. R., Ruiz, A. S., and Mamizuka, E. M., "Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals," *J.Med.Microbiol.*, Vol. 55, No. Pt 11, 2006, pp. 1611-1613.
 117. Penteado, A. P., Castanheira, M., Pignatari, A. C., Guimaraes, T., Mamizuka, E. M., and Gales, A. C., "Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among Klebsiella pneumoniae isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23," *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, Vol. 63, No. 1, 2009, pp. 87-91.
 118. Mendes, R. E., Castanheira, M., Toleman, M. A., Sader, H. S., Jones, R. N., and Walsh, T. R., "Characterization of an integron carrying blaIMP-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 51, No. 7, 2007, pp. 2611-2614.
 119. Penteado, A. P., Castanheira, M., Pignatari, A. C., Guimaraes, T., Mamizuka, E. M., and Gales, A. C., "Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among Klebsiella pneumoniae isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23," *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, Vol. 63, No. 1, 2009, pp. 87-91.
 120. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., and Tenover, F. C., "Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 45, No. 4, 2001, pp. 1151-1161.
 121. Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Schwaber, M. J., Rasheed, J. K., Srinivasan, A., Patel, J. B., and Carmeli, Y., "First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 53, No. 2, 2009, pp. 818-820.
 122. Naas, T., Nordmann, P., Vedel, G., and Poyart, C., "Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a Klebsiella pneumoniae isolate from France," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 49, No. 10, 2005, pp. 4423-4424.
 123. Cuzon, G., Naas, T., Demachy, M. C., and Nordmann, P., "Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in Klebsiella pneumoniae isolate from Greece," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 52, No. 2, 2008, pp. 796-797.
 124. Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C. J., Lopez, J. A., Vallejo, M., and Quinn, J. P., "First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from South America," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 50, No. 8, 2006, pp. 2880-2882.
-

-
125. Wei, Z. Q., Du, X. X., Yu, Y. S., Shen, P., Chen, Y. G., and Li, L. J., "Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 51, No. 2, 2007, pp. 763-765.
 126. Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., and Corso, A., "Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae," *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 47, No. 6, 2009, pp. 1631-1639.
 127. Monteiro, J., Santos, A. F., Asensi, M. D., Peirano, G., and Gales, A. C., "First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 53, No. 1, 2009, pp. 333-334.
 128. Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M. E., Matos, J., Macdonald, A., Brudney, D., Sompolinsky, D., Navon-Venezia, S., and Livermore, D. M., "Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom," *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 62, No. 6, 2008, pp. 1261-1264.
 129. Queenan, A. M. and Bush, K., "Carbapenemases: the versatile beta-lactamases," *Clin. Microbiol. Rev.*, Vol. 20, No. 3, 2007, pp. 440-58, table.
 130. Marra, A. R., Pereira, C. A., Gales, A. C., Menezes, L. C., Cal, R. G., de Souza, J. M., Edmond, M. B., Faro, C., and Wey, S. B., "Bloodstream infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes," *Antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 50, No. 1, 2006, pp. 388-390.
 131. Hidron, A. I., Low, C. E., Honig, E. G., and Blumberg, H. M., "Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia," *Lancet Infect. Dis.*, Vol. 9, No. 6, 2009, pp. 384-392.
 132. Pitout, J. D. and Laupland, K. B., "Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern," *Lancet Infect. Dis.*, Vol. 8, No. 3, 2008, pp. 159-166.
 133. Livermore, D. M., "Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact," *Clin. Infect. Dis.*, Vol. 36, No. Suppl 1, 2003, pp. S11-S23.
 134. Lambert, R. J., Joynson, J., and Forbes, B., "The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides," *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 91, No. 6, 2001, pp. 972-984.
 135. Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., and Sader, H. S., "Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase," *J. Antimicrob. Chemother.*, Vol. 52, No. 4, 2003, pp. 699-702.

136. Gales, A. C., Tognim, M. C., Reis, A. O., Jones, R. N., and Sader, H. S., "Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital," *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, Vol. 45, No. 1, 2003, pp. 77-79.
137. Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., and Tiemersma, E., "Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat," *Lancet*, Vol. 368, No. 9538, 2006, pp. 874-885.
138. Zarpellon, M. N., Soares, V. S., Albrecht, N. R., Bergamasco, D. R., Garcia, L. B., and Cardoso, C. L., "Comparison of 3 alcohol gels and 70% ethyl alcohol for hand hygiene," *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, Vol. 29, No. 10, 2008, pp. 960-962.
139. Brill, F., Goroncy-Bermes, P., and Sand, W., "Influence of growth media on the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to cationic biocides," *Int.J.Hyg.EnvIRON.Health*, Vol. 209, No. 1, 2006, pp. 89-95.
140. Thomas, L., Maillard, J. Y., Lambert, R. J., and Russell, A. D., "Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 46, No. 4, 2000, pp. 297-303.
141. Thomas, L., Russell, A. D., and Maillard, J. Y., "Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues," *J.Appl.Microbiol.*, Vol. 98, No. 3, 2005, pp. 533-543.
142. Kucken, D., Feucht, H., and Kaulfers, P., "Association of *qacE* and *qacEDelta1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria," *FEMS Microbiol.Lett.*, Vol. 183, No. 1, 2000, pp. 95-98.
143. al Masaudi, S. B., Russell, A. D., and Day, M. J., "Comparative sensitivity to antibiotics and biocides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Saudi Arabia and Great Britain," *J.Appl.Bacteriol.*, Vol. 71, No. 4, 1991, pp. 331-338.
144. al Masaudi, S. B., Day, M. J., and Russell, A. D., "Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants," *J.Appl.Bacteriol.*, Vol. 65, No. 4, 1988, pp. 329-337.
145. Alqurashi, A. M., Day, M. J., and Russell, A. D., "Susceptibility of some strains of enterococci and streptococci to antibiotics and biocides," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 38, No. 4, 1996, pp. 745.
146. al Masaudi, S. B., Day, M. J., and Russell, A. D., "Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics,

-
- antiseptics and disinfectants," *J.Appl.Bacteriol.*, Vol. 65, No. 4, 1988, pp. 329-337.
147. Irizarry, L., Merlin, T., Rupp, J., and Griffith, J., "Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine," *Chemotherapy*, Vol. 42, No. 4, 1996, pp. 248-252.
148. McDonnell, G. and Russell, A. D., "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 12, No. 1, 1999, pp. 147-179.
149. Alam, M. M., Kobayashi, N., Uehara, N., and Watanabe, N., "Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*," *Microb.Drug Resist.*, Vol. 9, No. 2, 2003, pp. 109-121.
150. Wang, J. T., Sheng, W. H., Wang, J. L., Chen, D., Chen, M. L., Chen, Y. C., and Chang, S. C., "Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 62, No. 3, 2008, pp. 514-517.
151. Noguchi, N., Suwa, J., Narui, K., Sasatsu, M., Ito, T., Hiramatsu, K., and Song, J. H., "Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999," *J.Med.Microbiol.*, Vol. 54, No. Pt 6, 2005, pp. 557-565.
152. al Masaudi, S. B., Russell, A. D., and Day, M. J., "Comparative sensitivity to antibiotics and biocides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Saudi Arabia and Great Britain," *J.Appl.Bacteriol.*, Vol. 71, No. 4, 1991, pp. 331-338.
153. Smith, K., Gemmell, C. G., and Hunter, I. S., "The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 61, No. 1, 2008, pp. 78-84.
154. Fraise, A. P., "Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides," *Symp.Ser.Soc.Appl.Microbiol.*, No. 31, 2002, pp. 158S-162S.
155. Anderson, R. L., Carr, J. H., Bond, W. W., and Favero, M. S., "Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants," *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, Vol. 18, No. 3, 1997, pp. 195-199.
156. Suller, M. T. and Russell, A. D., "Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*," *J.Antimicrob.Chemother.*, Vol. 46, No. 1, 2000, pp. 11-18.
-

-
157. Bamber, A. I. and Neal, T. J., "An assessment of triclosan susceptibility in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 41, No. 2, 1999, pp. 107-109.
158. Heath, R. J., White, S. W., and Rock, C. O., "Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents," *Prog.Lipid Res.*, Vol. 40, No. 6, 2001, pp. 467-497.
159. Heath, R. J., Li, J., Roland, G. E., and Rock, C. O., "Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene," *J.Biol.Chem.*, Vol. 275, No. 7, 2000, pp. 4654-4659.
160. Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D., "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 22, No. 4, 2009, pp. 582-610.
161. Hancock, R. E. and Speert, D. P., "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment," *Drug Resist.Updat.*, Vol. 3, No. 4, 2000, pp. 247-255.
162. Riou, M., Carbonelle, S., De Vos, D., Simon, A., Tulkens, P. M., and Van Bambeke, F., "Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to biocides among clinical isolates collected from intensive care units patients with nosocomial pneumonia in 5 Belgian teaching hospitals during the 2004-2008 period. 49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Poster C2-628[San Francisco, CA, EUA.]. 2009.

Ref Type: Abstract

163. Daniels, C. and Ramos, J. L., "Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 15 Suppl 1, 2009, pp. 32-36.
164. Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., and Bartolo, R. G., "Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility," *J.Hosp.Infect.*, Vol. 55, No. 2, 2003, pp. 98-107.
165. Daniels, C. and Ramos, J. L., "Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps," *Clin.Microbiol.Infect.*, Vol. 15 Suppl 1, 2009, pp. 32-36.
166. Levy, S. B., "Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance," *Symp.Ser.Soc.Appl.Microbiol.*, No. 31, 2002, pp. 65S-71S.
167. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., and Schweizer, H. P., "Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to

-
- triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 45, No. 2, 2001, pp. 428-432.
168. Braoudaki, M. and Hilton, A. C., "Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents," *J.Clin.Microbiol.*, Vol. 42, No. 1, 2004, pp. 73-78.
169. Lister, P. D., Wolter, D. J., and Hanson, N. D., "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms," *Clin.Microbiol.Rev.*, Vol. 22, No. 4, 2009, pp. 582-610.
170. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R., and Schweizer, H. P., "Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ," *Antimicrob.Agents Chemother.*, Vol. 45, No. 2, 2001, pp. 428-432.

Abstract

Purpose. The aim of this study was to evaluate the microbiocidal effect of distinct concentrations of chlorhexidine gluconate, triclosan, PVP-I and benzalkonium chloride, against multidrug-resistant bacterial clones spread out in the Brazilian territory. **Methods.** The microbiocidal effect of chlorhexidine gluconate, triclosan, PVP-I and benzalkonium chloride was evaluated against two *Staphylococcus aureus* (MRSA - SCCmec types III and IVc); one vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE; *vanA*); one SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolate; one carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. Tests were carried out according to European Standard EN1040 - Quantitative Suspension Test. Neutralizer was prepared according the EN1040. Biocides were inactivated after one minute and five minutes of contact. *S. aureus* ATCC 6538 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 were tested as quality control strains. The genetic relatedness of the isolates that showed reduced susceptibility to biocides was confirmed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Results.** Chlorhexidine gluconate and PVP-I showed ≥ 5 log reduction in the number of CFU/mL. Benzalkonium chloride did not demonstrate microbiocidal effect in the 5% concentration against *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* Sccmec type IVc, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* P10093 and ATCC 15442. The 10% concentration of benzalkonium chloride showed microbiocidal effect against all isolates, except *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* P10093 and *K. pneumoniae*. Triclosan was active against Gram positive isolates, except *E. faecalis* in the 0,2% concentration, however did not showed activity to *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *K. pneumoniae*. **Conclusion.** PVP-I and chlorhexidine gluconate were the most active agents tested and kept activity against multidrug resistant clones. In contrast, Triclosan had poor ME against Gram-negative clinical isolates. The correlation between antibiotic and biocide resistance is still unclear and could be mediated by several mechanisms. More studies are necessary to determine the epidemiological importance of our findings.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)