

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ERLEN CRISTINA BOTELHO

Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones  
hospitalares de *Acinetobacter baumannii*

Maringá  
2017

ERLEN CRISTINA BOTELHO

Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones  
hospitalares de *Acinetobacter baumannii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da  
Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde  
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso

Maringá  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

B748e Botelho, Erlen Cristina  
Estudo "in vitro" da eficácia de antissépticos  
contra clones hospitalares de *Acinetobacter  
baumannii* / Erlen Cristina Botelho. -- Maringá,  
2017.  
57 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

1. Higienização das mãos - Hospital. 2.  
Higienização das mãos - Pacientes infectados -  
*Acinetobacter baumannii*. 3. Higienização das mãos -  
Superfícies ambientais - *Acinetobacter baumannii*.  
4. Higienização das mãos - Hospital - Antisséptico.  
5. Norma Européia 13727 - Teste de suspensão. I.  
Cardoso, Celso Luiz, orient. II. Universidade  
Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III.  
Título.

CDD 23.ed. 613

MN-0040251



# FOLHA DE APROVAÇÃO

ERLEN CRISTINA BOTELHO

Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Sheila Alexandra Belini Nishiyama  
UNINGÁ

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Bronharo Tognim  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 28 de Março de 2017.

Local da defesa: Sala 110, Bloco I-90, Campus da Universidade Estadual de Maringá.

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, pela força e perseverança para que pudesse chegar até aqui. Agradeço também pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor.*

*Aos meus pais Edis e Fátima, por todo o ensinamento, o exemplo que me deram para ser uma pessoa melhor e o apoio incondicional que sempre me proporcionaram.*

*A meu querido esposo, Elias, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Muito obrigada por todo amor, companheirismo e compreensão.*

*Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Celso pela oportunidade, obrigada por todos os seus ensinamentos compartilhados, por sua dedicação, compreensão e apoio para realização deste trabalho.*

*Aos professores Dr. Benício Alves de Abreu Filho e Dra. Maria Cristina Bronharo Tognim pelos ensinamentos recebidos durante a realização da parte experimental deste estudo no laboratório de microbiologia.*

*Às minhas queridas amigas Dalila e Aniely, vocês foram fundamentais para a conquista desse sonho. Que nossa amizade continue além do laboratório.*

*Às funcionárias do Setor de Microbiologia Básica: Vilma, Lourdes, Adriana, Rosana e Maria, por toda colaboração durante a realização do meu projeto e por sempre estarem dispostas a me ajudarem.*

*À CAPES, pelo apoio financeiro.*

*Enfim a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho.*

*Agradeço com muito carinho todos vocês!*

## EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa  
que a fez tão importante”

(Antoine de Saint-Exupéry)

## Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*

### RESUMO

**Introdução.** A resistência de amostras hospitalares de *Acinetobacter baumannii* aos antibióticos tem sido frequentemente descrito na literatura, entretanto, poucos estudos têm investigado a resistência deste microrganismo aos antissépticos.

**Objetivo.** Avaliar a eficácia dos principais antissépticos usados para a higiene das mãos contra isolados hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*. A possível associação entre a resistência a antibióticos e antissépticos foi também investigada.

**Métodos.** O teste de suspensão quantitativo, realizado na presença de substâncias interferentes, conforme descrito na Norma Européia 13727 (EN 13727), foi usado para investigar a atividade bactericida da clorexidina a 2%, povidona-iodo a 1%, álcool etílico 70% (p/p) e do álcool etílico em gel 70% (v/v) contra diferentes clones hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* (N=33). Como requerimento mínimo para a atividade bactericida o produto testado deve demonstrar uma redução de pelo menos 5 log<sub>10</sub> (preparações alcoólicas) ou de 3 log<sub>10</sub> (clorexidina, povidona-iodo) no teste de suspensão.

**Resultados.** Todos os isolados de *Acinetobacter baumannii* foram sensíveis aos antissépticos testados nas condições limpa (albumina 1,5%) ou suja (albumina 15% mais hemácias de carneiro a 15%). A ação bactericida média±dp dos produtos testados, expressa pelo fator de redução logarítmica, nas condições limpa e suja, foram de, respectivamente, 7,40±0,20 e 7,36±0,53 (clorexidina); 7,36±0,46 e 7,37±0,41 (povidona-iodo); 7,46±0,20 e 7,42±0,32 (álcool etílico); 7,40±0,32 e 7,48±0,12 (álcool gel); demonstrando que cada produto testado cumpriu o critério exigido para aprovação pela EN 13727.

**Conclusão.** Todos os isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* foram mortos pelos antissépticos comumente usados na prática hospitalar, sugerindo que higiene das mãos deve ser efetiva na prevenção da disseminação de *A. baumannii* nos hospitais. Não foi encontrada associação entre a resistência aos antibióticos e a reduzida susceptibilidade aos antissépticos.

**Palavras-chaves.** *Acinetobacter*, antisséptico, Norma Européia 13727, teste de suspensão.

“In vitro” study on efficacy of antiseptics against hospital clones of *Acinetobacter baumannii*

## ABSTRACT

**Introduction.** The resistance of hospital isolates of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics has been frequently described in literature; however, few studies have investigated the resistance of this microorganism to antiseptics.

**Objective.** To evaluate the efficacy of the main antiseptics used for hand hygiene against multidrug-resistant hospital isolates of *Acinetobacter baumannii*. The possible association between antibiotic and antiseptic resistance was also assessed.

**Methods.** The quantitative suspension test performed in the presence of interfering substances as described in the 13727 European Standard method (EN 13727) was used to investigate the bactericidal activity of 2% chlorhexidine, 1% povidone-iodine, 70% w/w ethyl alcohol and 70% v/v ethyl alcohol gel against different multidrug-resistant hospital clones of *Acinetobacter baumannii* (N = 33). As a minimum requirement for the bactericidal activity the tested product shall demonstrate at least a 5 log<sub>10</sub> reduction (for alcoholic preparations) or at least a 3 log<sub>10</sub> reduction (for chlorhexidine and povidone-iodo) in the suspension test.

**Results.** All isolates of *Acinetobacter baumannii* were sensitive to the antiseptics tested under clean conditions (bovine albumin solution 1.5%) or dirty (15% bovine albumin solution plus 15% sheep erythrocytes). The mean±sd of bactericidal action of the tested products, expressed by the logarithmic reduction factor, in the clean and dirty conditions, were, respectively, 7.40±0.20 and 7.36±0.53 (chlorhexidine); 7.36±0.46 and 7.37 ±0.41 (povidone-iodine); 7.46±0.20 and 7.42±0.32 (ethyl alcohol); 7.40±0.32 and 7.48±0.12 (alcohol gel); demonstrating that each product tested fulfilled EN 13727.

**Conclusion.** We conclude that all hospital isolates of *Acinetobacter baumannii* were killed by commonly used antiseptics and hand hygiene should be effective in limiting their spread in hospitals. Association between resistance to antibiotics and a decreased susceptibility to antiseptics was not found.

**Keywords.** *Acinetobacter*, antiseptics, EN 13727, suspension test.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Journal of Hospital Infection*  
disponível em:  
<<http://www.elsevierhealth.com/journals/jhin>>

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I</b> .....	11
1.1. Introdução.....	12
1.2. Justificativa .....	17
1.3. Objetivos .....	17
1.4. Referências .....	19
1.5. Anexo 1 .....	22
<b>2. CAPÍTULO II</b> .....	24
2.1. Manuscrito: Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones hospitalares de <i>Acinetobacter baumannii</i>	
2.1.1. Página Título .....	25
2.1.2. Resumo .....	26
2.1.3. Introdução.....	28
2.1.4. Métodos .....	30
2.1.5. Resultados .....	42
2.1.6. Discussão.....	48
2.1.7. Agradecimentos.....	51
2.1.8. Referências .....	52
<b>3. CAPÍTULO III</b> .....	54
3.1. Conclusões .....	55
3.2. Perspectivas futuras.....	56

## **CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica**

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Acinetobacter* é constituído por cocobacilos Gram-negativos, capsulados, não pigmentados, catalase positivos, não fermentadores de glicose, oxidase positivos ou negativos, imóveis e aeróbios estritos. Atualmente o Comitê Internacional de Sistemática de Procariotos reconhece a existência de 53 espécies no gênero *Acinetobacter*, cuja lista de classificação e nomenclatura é mostrada no Anexo 1 (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; AL ATROUNI, JOLY-GUILLOU, 2016; WONG et al., 2016; NEMEC, 2017).

*Acinetobacter* spp são microrganismos ubiqüitários, podendo ser encontrados em diferentes ambientes como, por exemplo, na pele humana (DIJKSHOORN et al., 2005), na água e solo (KRIZOVA et al., 2015), em plantas (ALVAREZ-PEREZ; HERRERA, 2013) e animais (RAFEI et al., 2015). A maioria das espécies de *Acinetobacter* não é patogênica, sendo algumas espécies encontradas vivendo como comensais na pele de indivíduos saudáveis (DOI; MURRAY; PELEG, 2015).

Entretanto, nas últimas décadas, algumas das espécies do gênero *Acinetobacter*, particularmente *Acinetobacter baumannii*, tornaram-se importantes patógenos hospitalares devido a crescente frequência e gravidade de infecções causadas em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (e.g., pneumonia associada à ventilação mecânica, infecções da corrente sanguínea e do trato urinário, infecções da pele, meningite) e a ampla resistência destes microrganismos aos principais antibióticos usados na prática hospitalar. (BERGOGNE-BÉRÉZIN; JOLY-GUILLOU, 1989; BERGOGNE-BÉRÉZIN, TOWNER, 1996; DIJKSHOORN, NEMEC, SEIFERT, 2007; FALAGAS et al., 2008; CHUANG et al., 2011; ROSSI, 2011; WISPLINGHOFF et al., 2012; LEE et al., 2013; ANTUNES, TOWNER, 2014; OZGUR et al., 2014; FREIRE et al., 2016).

Adicionalmente, a capacidade de sobrevivência de *Acinetobacter* spp. por longos períodos no ambiente hospitalar facilita sua transmissão entre pacientes via equipe de saúde ou materiais inanimados (BERGOGNE-BÉRÉZIN, TOWNER, 1996; GETSCHELL-WHITE, DONOWITZ, GROSCHEL, 1989; WENDT et al., 1997; ALSAN; KLOMPAS, 2010).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa na unidade de terapia intensiva adulto (UTI-Adulto) de um hospital universitário detectou a presença, no período de 2004 a 2008, de um clone endêmico de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos e sensível apenas a polimixina e tigeciclina. Este clone foi isolado em 12% dos pacientes internados na UTI-Adulto durante janeiro a julho de 2008, sendo encontrado nas grades dos leitos, monitor cardíaco, ventilador mecânico, sítios da pele dos pacientes, nas luvas dos

profissionais de saúde e objetos utilizados na assistência ao paciente (SAAFELD et al., 2009, SILVA et al., 2012).

As infecções causadas por *A. baumannii* têm sido frequentemente associadas a mortalidade, devido ao aumento do surgimento de cepas resistentes a carbapenêmicos (SPELLBERG e BANOMO, 2013). A taxa de mortalidade em pacientes com bacteremia ou pneumonia associada à ventilação mecânica causada por *A. baumannii* é de 50% a 60% (ERBAY et al., 2009; MUNOZ-PRICE et al., 2010, CHUNG et al., 2011, SONG et al., 2011).

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos encontrados em *Acinetobacter* spp. são representados pela alteração do sítio de ação dos antimicrobianos, alteração na permeabilidade da membrana externa (porinas), bomba de efluxo ativa e produção de enzimas. Estes mecanismos podem ocorrer de forma isolada ou combinada em uma única cepa bacteriana (RUSSEL, 2001).

Alteração do sítio de ação dos antimicrobianos, no caso dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, ocorre pela modificação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que diminuem sua afinidade pelos beta-lactâmicos (SUAREZ et al., 2006). Em *Acinetobacter* spp a resistência aos beta-lactâmicos não é comumente associada a alterações das PBPs, no entanto, um estudo realizado na Espanha foi identificado cepas de *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos por ausência ou expressão reduzida de PBP-2 (FERNANDEZ-CUENCA et al., 2003).

A resistência as quinolonas também esta associada à alteração no sítio de ação dos antimicrobianos, os principais alvos são as enzimas topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, necessárias à duplicação do DNA bacteriano. Essas enzimas são constituídas de duas subunidades GyrA e GyrB e ParC e ParE respectivamente (JACOB, 2005). Em *Acinetobacter* spp. essa resistência esta relacionada a mutações nos genes que codificam as subunidades GyrA e ParC (RIBERA et al., 2004).

A parede celular das bactérias do gênero *Acinetobacter*, assim como de toda bactérias Gram-negativa, possui uma membrana externa lipopolissacarídica contendo proteínas – porinas – chamadas de “outer membrane protein” (OMP), que são canais proteicos pelos quais são transportadas moléculas hidrofílicas, como os antibióticos carbapenêmicos (NIKAIDO, 1994). Quando os genes que codificam essas porinas sofrem mutações, pode ocorrer produção de proteínas alteradas não funcionais, perda ou expressão diminuída tendo como consequência a alteração do transporte de diferentes moléculas, incluindo as de antibióticos (SUAREZ et., 2006).

Em *Acinetobacter baumannii* estudos tem demonstrado que a OmpA esta envolvida na resistência de alguns antimicrobianos como cloranfenicol, aztreonam e ácido nalidíxico, sugerindo que a OmpA participa na extrusão de antimicrobianos a partir do espaço periplásmico (LEE et al., 2017, SMANI et al., 2014, SUGAWARA; NIKAIDO, 2012).

Geralmente, a alteração das porinas está associada à presença de bomba de efluxo responsável pela resistência a múltiplos fármacos (LIN et al., 2017). A resistência a imipenem, tigeciclina e colistina, que são importantes antibióticos usados no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii*, também tem sido associada à presença de bomba de efluxo (HU et al., 2007, PELEG et al., 2007, RUZIN et al., 2007, LIN et al., 2017).

Embora os mecanismos de resistência aos antibióticos citados anteriormente sejam importantes, o mecanismo mais prevalente em *A. baumannii* é a produção de enzimas inativadoras de antibióticos, principalmente as  $\beta$ -lactamases, devido sua facilidade de disseminação para outros microrganismos, uma vez que os genes codificadores destas enzimas encontram-se geralmente localizados em plasmídeos ou transposons (PELEG; HOOPER, 2010, POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

Segundo Ambler (1980) as  $\beta$ -lactamases podem ser distribuídas em quatro grupos: Classe A – Serino  $\beta$ -lactamases, incluindo as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbenicilinas; Classe B – Metallo- $\beta$ -lactamases; Classe C – Cefalosporinas cromossomais; Classe D – Oxacilinas.

Em relação a classe A, caracterizada pelas ESBL, foram detectadas em *A. baumannii* as enzimas PER, GES, VEB e KPC (WALTHER-RASMUSSEN; HOUIBY, 2007, ROBLEDO; et al., 2010). Na classe B, também denominada metallo- $\beta$ -lactamases, em *Acinetobacter* foram descritas: IMP, VIM, SIM e NDM (DJAHMI et al., 2014). Na classe C de modo geral, todos isolados de *Acinetobacter* codificam cromossomicamente a cefalosporinase AmpC (JACOBY, 2009).

A classe D é constituída pelas carbapenemases do tipo OXA (oxacilinas) que constituem o principal mecanismo de resistência a carbapenêmicos em *A. baumannii* (LIN; LAN, 2014). Atualmente, as oxacilinas podem ser distribuídas em seis subgrupos: OXA-51-like (intrínseca cromossomal), OXA-58-like, OXA-23-like (variantes OXA-23, 27, 49), OXA-24-like (variantes OXA-24, 25, 26 E 40) e OXA-148-like e OXA-235-like (adquiridas) (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010). A primeira carbapenemase do tipo OXA identificada em *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos foi o grupo OXA-23, isolada em

1985 no Reino Unido. No Brasil o primeiro relato ocorreu em Curitiba, Paraná, durante um surto no hospital das clínicas em 2003 (DALLA-COSTA et al., 2003).

Estudos tem demonstrado que a presença de um elemento de sequência de inserção do inglês “insertion sequence” (IS), como *ISAbal* e *ISAbag*, aumenta a expressão da carbapenemase significativamente (NIGRO et al., 2016, WARNER et al., 2016). Um estudo realizado na Índia mostrou que os genes *bla<sub>OXA-51</sub>* e *bla<sub>OXA-23</sub>* estavam presentes em todos os 103 isolados de *A. baumannii* resistentes a carbapenem e quase 80% dos isolados tinham o elemento de inserção *ISAbal* associado ao gene *bla<sub>OXA-23</sub>* (VIJAYAKUMAR et al., 2016).

Em nossa região, um estudo realizado por nossa equipe de pesquisadores ao investigar a presença de *ISAbal* associado ao gene *bla<sub>OXA-23</sub>* em isolados clínicos de *A. baumannii*, constatou que 81% dos isolados foram resistentes aos carbapenêmicos e apresentavam a combinação *ISAbal-bla<sub>OXA-23</sub>*. Essa associação aumentou de 22% em 2009 para 73% em 2013 (VIANA et al., 2015).

A disseminação de infecções causadas por isolados Gram-negativos resistentes a múltiplos fármacos tornou-se um grande desafio público em todo o mundo. De acordo com o último relatório da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Acinetobacter* spp. é o quarto patógeno mais isolado de pacientes internados em UTIs (11,8%) e o microrganismo que apresenta maior taxa de resistência aos carbapenêmicos (77,4%), quando comparado com outros isolados Gram-negativos (ANVISA, 2016). Diante dessa situação, as polimixinas são uma das últimas opções terapêuticas, entretanto, há evidências de que a resistência a colistina vem aumentando com o tempo (SADER et al., 2014, YAU et al., 2009).

Em um hospital da nossa região, considerado centro de referência médica em serviços médicos gerais e de alta complexidade, com 313 leitos, foi realizado um estudo comparativo da evolução da resistência aos antimicrobianos em *A. baumannii* nos períodos de 1994-1996 e 2004-2007. O estudo demonstrou um aumento significativo na resistência aos carbapenêmicos passando de 2% em 1994-1996 para 73% nos anos de 2004-2007. Esses dados alertam para o elevado número de isolados resistentes aos carbapenêmicos, limitando as opções terapêuticas e evidenciando a importância de se monitorar o perfil de resistência de isolados clínicos dessa espécie (Viana et al., 2011).

Recentemente a Organização Mundial da Saúde publicou a primeira lista de agentes patogênicos prioritários resistentes aos antibióticos, que representam a maior ameaça para a saúde humana. A espécie *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos encontra-se como o primeiro patógeno para o qual é necessário urgentemente o desenvolvimento de novos antibióticos, devido a gravidade das infecções e altas taxas de mortalidade (WHO, 2017).

Atualmente existem três clones epidêmicos principais de *A. baumannii*, denominados clones internacionais I, II e III. As cepas pertencentes ao clone internacional II são frequentemente multirresistentes e associadas a infecções hospitalares (DIANCOURT et al., 2010). Identificados inicialmente como clones europeus com origem em surtos ocorridos na Europa, posteriormente renomeado como clones internacionais, uma vez que estão associados a infecção e disseminação epidêmica não apenas na Europa, mas também em outras partes do mundo (NEMEC et al., 1999, MUGNIER et al., 2010).

A clonalidade pode ser baseada em estudos que utilizam metodologias para avaliações globais como a metodologia de “Multilocus sequence typing” (MLST), gerando dados que podem ser comparados mundialmente, possibilitando o conhecimento da origem clonal dos isolados (MAIDEN, 2006). Porém para estudos locais a clonalidade é baseada nos resultados obtidos por metodologias como PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis) ou ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), que se destinam a comparar os isolados auxiliando na elucidação de surtos hospitalares.

Em nosso hospital, a utilização da técnica de ERIC-PCR possibilitou Viana e colaboradores (2016) demonstrarem que um clone endêmico de *A. baumannii* estava presente na UTI-adulto desde 2004 (SAAFELD et al., 2009). Após a implementação de medidas de controle, tais como, a publicação de um manual de orientações; promoção da higiene das mãos; isolamento de pacientes colonizados ou infectados com bactérias multirresistentes, incluindo a aplicação de precauções de contato e limpeza e desinfecção de salas de isolamento; e um programa de culturas de vigilância, favoreceu a diminuição e a eliminação do clone endêmico. No entanto, o estudo também demonstrou que novos clones surgiram resultando na mudança no modo de disseminação de *A. baumannii* no hospital. A presença de IS*Aba1-bla*<sub>OXA-23</sub> foi reconhecida como um obstáculo para a comissão de controle de infecção hospitalar no controle destes novos clones resistentes de *A. baumannii* (VIANA et al., 2015).

Os biocidas, como antissépticos e desinfetantes, são amplamente utilizados em hospitais como parte de programas de prevenção e controle das infecções hospitalares como: álcool gel 70%, álcool etílico 70%, clorexidina e polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) (HAYASHI et al., 2017).

Os produtos a base de álcool são os agentes preferidos para antisepsia das mãos porque eles reduzem a contagem bacteriana das mãos de forma mais eficaz do que o sabão comum e as soluções antissépticas detergentes, como por exemplo, clorexidina e polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) (PICHEANSATHIAN, 2004).

A clorexidina tem atividade bactericida de largo espectro com um rápido início de ação por ruptura de parede das células bacterianas. O PVPI, no entanto, tem uma ação bactericida por difusão através da parede celular bacteriana e inibição da proteína intracelular e síntese de ácidos nucleicos, e seu início de ação leva mais tempo que o da clorexidina (LIM; KAM, 2008).

Alguns pesquisadores sugerem que a presença de concentrações sub-inibitórias ou uso inadequado de biocidas poderiam selecionar clones de *A. baumannii* resistentes com reduzida susceptibilidade aos biocidas (KAWAMURA-SATO et al., 2008, RUSSELL, 2004).

A seleção de isolados resistentes de *A. baumannii* com reduzida susceptibilidade aos biocidas poderia ser explicada através de mecanismos comuns de resistência como permeabilidade da membrana externa e bombas de efluxo, conforme descrito anteriormente (ABUZAID; HAMOUDA; AMYES, 2012, MAILLARD, 2007, WINDER et al., 2000).

Um estudo realizado com 49 isolados clínicos de *A. baumannii*, mostrou que os isolados com susceptibilidade reduzida ao digluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e triclosan também foram mais resistentes a alguns antimicrobianos como, por exemplo, ciprofloxacina, carbapenem, aminoglicosídeos e tetraciclinas, resultado da associação com a expressão de genes que codificam algumas bombas de efluxo (AdeB e AmvA) e a redução da expressão de genes codificadores de algumas porinas (OmpA e CarO) (CUENCA et al., 2015).

Alguns estudos tem avaliado a atividade dos antissépticos através de técnicas como, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antissépticos ou pela Norma Européia 1040 (KAWAMURA-SATO et al., 2008, EKIZOGLU et al., 2016). No entanto, nosso estudo foi realizado de acordo com a Norma Europeia 13727 (2015), na presença de substancia interferentes que simulam uma condição real do uso de antissépticos.

## JUSTIFICATIVA

A emergência da resistência aos agentes antimicrobianos em *Acinetobacter baumannii* tem sido frequentemente descrito na literatura (ROSSI, 2011; WONG et al. 2017), entretanto, poucos estudos têm investigado a resistência deste microrganismo aos antissépticos e desinfetantes (MARTRO,2003). Alguns pesquisadores sugerem que em bactérias Gram-negativas (e.g., diversas espécies de enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), pode ocorrer uma associação da resistência aos antibióticos com a reduzida susceptibilidade aos antissépticos, limitando assim a eficácia da antisepsia das mãos na

prevenção e controle das infecções hospitalares causadas por estes microrganismos. Por isso, é importante investigar a susceptibilidade “in vitro” destes patógenos hospitalares, principalmente em hospitais onde eles são endêmicos, para entender o real significado deste problema.

Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo realizado em nosso meio com objetivo de investigar a eficácia dos principais antissépticos usados para a higienização das mãos na prática hospitalar contra isolados multirresistentes de *A. baumannii*, utilizando como modelo experimental o teste de suspensão quantitativo realizado na presença de substâncias interferentes, conforme descrito na Norma Européia 13727 (EN 2015).

## **OBJETIVOS**

### **GERAL:**

Investigar a eficácia dos principais antissépticos usados para a higiene das mãos contra isolados hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*.

### **ESPECÍFICOS:**

Avaliar a ação bactericida dos principais antissépticos usados na higiene das mãos, incluindo a clorexidina 2%, povidona-iodo 1%, álcool etílico 70% (p/p) e álcool etílico 70% (v/v) em gel contra diferentes clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aos agentes antimicrobianos, utilizando como modelo experimental o teste de suspensão quantitativo realizado na presença de substâncias interferentes (e.g., proteína, hemácias), conforme descrito na Norma Européia 13727.

Investigar a existência de uma possível associação entre a resistência aos antibióticos e a reduzida susceptibilidade aos antissépticos dos isolados hospitalares de *A. baumannii* multirresistentes aos agentes antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS

- AL ATROUNI, A; JOLY-GUILLOU, M.L.; HAMZE, M.; KEMPF, M. Reservoirs of non-baumannii *Acinetobacter* species. **Front Microbiol**, 7:49, 2016.
- ALSAN, M.; KLOMPAS, M. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. **J Clin Outcomes Manag**, 17(8): 363–369, 2010.
- ÁLVAREZ-PÉREZ, S.; LIEVENS, B.; JACQUEMYN, H.; HERRERA, C.M. *Acinetobacter nectarisp.nov.* and *Acinetobacter boissierisp.nov.*, isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 63: 1532–1539, 2013.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.**, 289 (1036): 321-331, 1980.
- ANTUNES, L. C. S.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. **Pathog Dis.**, 71, 292–301, 2014.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; JOLY-GUILLOU, M.L. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect.* London, v. 18, Suppl. A, p. 250-255, 1991.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E; TOWNER, K.J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Washington, *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 9, p. 148-165, 1996.
- Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+de+Seguran%C3%A7a+do+Paciente+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n%C2%BA+14+Avalia%C3%A7%C3%A3o+dos+indicadores+nacionais+das+Infec%C3%A7%C3%B5es+Relacionadas+%C3%A0+Assist%C3%A2ncia+%C3%A0+Sa%C3%BAde+%28IRAS%29+e+Resist%C3%A2ncia+microbiana/dbd57c96-937f-45d3-93fd-e76684b7f35c>, 2016 [accessed 10.04.17].
- CHUANG, Y.C.; SHENG, W.H.; et al. Influence of genospecies of *Acinetobacter baumannii* complex on clinical outcomes of patients with *Acinetobacter* bacteremia. **Clin Infect Dis.**, 52(3):352–360, 2011.
- DIJKSHOORN, L., VANAKEN, E., SHUNBURNE, L.; et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalized individuals. **Clin. Microbiol. Infect.**, 11: 329–332, 2005.
- DIJKSHOORN L, NEMEC A, SEIFERT H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Rev** 2007; 5: 939-951.
- DOI, Y; MURRAY, G.L.; PELEG, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. **Semin Respir Crit Care Med**, 36: 85–98, 2015.
- ERBAY A, IDIL A, GÖZEL MG, et al. Impact of early appropriate antimicrobial therapy on survival in *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. **Int J Antimicrob Agents**.34: 575–579, 2009.
- FALAGAS, M.E.; KARVELI, E.A.; SIEMPOS, I.I.; VARDAKAS, K.Z. *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. **Epidemiol Infect.**, 136 (08): 1009–19, 2008.

- FERNANDEZ-CUENCA, F. et al. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 51: 565-574, 2003.
- FREIRE, M. P.; OLIVEIRA, D. G.; GARCIA, C. P.; et al. Bloodstream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. **Clin. Microbiol Infect**, 22: 352–358, 2016.
- GETSCHELL-WHITE, S.I. et al. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol Chicago**, v. 10, p. 402-406, 1989.
- JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infections Diseases**, 41(2): 120-126, 2005.
- KRIZOVA, L.; MAIXNEROVA, M.; SEDO, O.; NEMEC, A. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 65: 857–863, 2015.
- LEE C-R, LEE JH, PARK M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 7: 55, 2017.
- NEMEC, A. <http://apps.szu.cz/anemec/anemic.htm> (acessado em março de 2017).
- MUNOZ-PRICE LS, ZEMBOWER T, PENUGONDA S, et al. Clinical outcomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections: Study of a 2-state monoclonal outbreak. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 31: 1057–1062, 2010.
- NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J. Biol. Chem**, 269: 3905-3908, 1994.
- OZGUR, E. S.; HORASAN, E. S.; KARACA, K.; et al. Ventilator-associated pneumonia due to extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors, clinical features, and outcomes. **Am J Infect Control**, 42: 206–208, 2014.
- PELEG, A.Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clin. Microbiol. Rev**, 21(3): 538-582, 2008.
- PICHEANSATHIAN, W. A systematic review on the effectiveness of alcohol-based solutions for hand hygiene. **Internal Journal of Nursing Practice**, Australia, v.10, p. 3-9, 2004.
- RAFEI, R.; KEMPF, M.; EVEILLARD, M.; et al. Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. **Future Microbio**, 9: 1179–1194, 2014.
- RAFEI, R.; HAMZE, M.; PAILHORIÈS, H.; et al. Extra-human epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. **Appl. Environ. Microbiol**, 81: 2359–2367, 2015.
- RIBERA, A. et al. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance to quinolones and beta-lactams in *Acinetobacter baumannii* genospecies 3. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(4): 1430-1432, 2004.
- ROSSI F. The challenges of Antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases* 2011; 52 (9):1138-1143.
- RUSSEL, A.D. Principles of antimicrobial activity and resistance. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. **Baltimore, Willians & Wilkins**, 31-54, 2001.

SAALFELD SMS, VIANA GF, SIQUEIRA VLD, CARDOSO CL, GARCIA LB; TOGNIM MCB. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive-care unit. **J. Hosp. Infect.**, 72 (4): 365-368, 2009.

SILVA SRB, ROSA NM, WINGETER MA, PINTO NB, TOGNIM MCB, GARCIA LB, CARDOSO CL. Hand contamination during hospital patient care. **Int. J. Infect. Dis.**, 16(8): 641-642, 2012.

SMANI, Y., FABREGA, A., ROCA, I., et al. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 58, 1806–1808, 2014.

SONG JY, CHEONG HJ, CHOI WS, et al. Clinical and microbiological characterization of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. **J Med Microbiol.** 60: 605–611, 2011.

SPELLBERG, B.; BONOMO, R. A. “Airborne Assault”: A New Dimension in *Acinetobacter baumannii* Transmission. **Crit Care Med**, 41(8): 2-3, 2013.

SUAREZ, C. J. et al. Mecanismos de resistência a carbapenems em *P. aeruginosa*, *Anicetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estratégias para suprevencion y control. **Infectio**, 10(2): 85-93, 2006.

SUGAWARA, E.; NIKAIDO, H. OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. **J. Bacteriol.** 194: 4089–4096, 2012.

WENDT, C. et al. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, p. 1394-1397, 1997.

WISPLINGHOFF, H.; PAULUS, T.; LUGENHEIM, M.; et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. **J Infect.**, 64: 282–290, 2012.

World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>, [accessed 10.04.17].

## ANEXO 1.

Table. Classification and nomenclature of the genus *Acinetobacter*

Validly published species name (n=53)	Former (informal) designation	Reference	Cultured (mainly) from *
<i>A. albensis</i>	Taxon 31	Krizova et al. 2015b	Soil, water
<i>A. apis</i> †		Kim et al. 2014	Honey bee intestine
<i>A. baumannii</i>	Genomic species 2	Bouvet & Grimont 1986	Human, warm-blooded animals
<i>A. baylyi</i>		Carr et al. 2003	Activated sludge, soil
<i>A. beijerinckii</i>	Phenon 7	Nemec et al. 2009	Human, animals, soil, water
<i>A. bereziniae</i>	Genomic species 10	Nemec et al. 2010, Bouvet & Grimont 1986	Human
<i>A. bohemicus</i>	Taxon 26	Krizova et al. 2014	Soil, water
<i>A. boissieri</i>		Álvarez-Pérez et al. 2013	Floral nectar
<i>A. bouvetii</i> †		Carr et al. 2003	Activated sludge
<i>A. brisouii</i> †		Anandham et al. 2010	Peat
<i>A. calcoaceticus</i>	Genomic species 1	Bouvet & Grimont 1986	Soil, water, human
<i>A. celticus</i>	Taxon 33	Radolfova-Krizova et al. 2016b	Soil, water
<i>A. courvalinii</i>	Genomic species 14BJ	Nemec et al. 2016, Bouvet & Jeanjean 1989	Human, animals
<i>A. dijkshoorniae</i> #	NB14	Cosgaya et al. 2016	Human, water
<i>A. dispersus</i>	Genomic species 17	Nemec et al. 2016, Bouvet & Jeanjean 1989	Soil, water, human
<i>A. equi</i>		Poppel et al. 2016	Horse
<i>A. gandensis</i>	Taxon 30	Smet et al. 2014	Horse, cattle, water
<i>A. gemeri</i> †		Carr et al. 2003	Activated sludge
<i>A. grimontii</i> † (= <i>A. junii</i> ) ‡		Carr et al. 2003, Vaneechoutte et al. 2008	Activated sludge
<i>A. guangdongensis</i> †		Feng et al. 2014a	Lead-zinc ore
<i>A. guillouiae</i>	Genomic species 11	Nemec et al. 2010, Bouvet & Grimont 1986	Soil, water, human
<i>A. gyllenbergii</i>	Phenon 3	Nemec et al. 2009	Human
<i>A. haemolyticus</i>	Genomic species 4	Bouvet & Grimont 1986	Human
<i>A. harbinensis</i> †		Li et al. 2014b	River water
<i>A. indicus</i> †		Malhotra et al. 2012	Soil
<i>A. johnsonii</i>	Genomic species 7	Bouvet & Grimont 1986	Soil, water, human, animals
<i>A. junii</i>	Genomic species 5	Bouvet & Grimont 1986	Human, animals, water, soil
<i>A. kookii</i>		Choi et al. 2013	Soil, water
<i>A. lactucae</i> † #		Rooney et al. 2016	Lettuce
<i>A. lwoffii</i>	Genomic species 9	Bouvet & Grimont 1986, Tjernberg & Ursing 1989	Human, animals, soil, water
<i>A. modestus</i>	Taxon 18	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Human, water
<i>A. nectaris</i>		Alvarez-Perez et al. 2013	Floral nectar
<i>A. nosocomialis</i>	Genomic species 13TU	Nemec et al. 2011, Tjernberg & Ursing 1989	Human
<i>A. pakistanensis</i> † (= <i>A. bohemicus</i> ) ‡		Abbas et al. 2014, Nemec & Radolfova-Krizova 2016	Wastewater
<i>A. parvus</i>	Phenon 4	Nemec et al. 2003	Human, animals
<i>A. pittii</i>	Genomic species 3	Nemec et al. 2011, Bouvet & Grimont 1986	Human, soil, water
<i>A. populi</i>		Li et al. 2015	Populus bark
<i>A. pragensis</i>	Taxon 28	Radolfova-Krizova et al. 2016a	Soil, water
<i>A. proteolyticus</i>	Taxon 19	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Human
<i>A. puyangensis</i>		Li et al. 2013	Populus bark
<i>A. qingfengensis</i>		Li et al. 2014a	Populus bark
<i>A. radioresistens</i>	Genomic species 12	Nishimura et al. 1988, Bouvet & Grimont 1986	Human, soil, cotton
<i>A. rudis</i>		Vaz-Moreira et al. 2011	Raw milk, wastewater
<i>A. schindleri</i>	Phenon 2	Nemec et al. 2001	Human, animals
<i>A. seiffertii</i>	'Close to 13TU'	Nemec et al. 2015, Gemer-Smidt & Tjernberg 1993	Human
<i>A. soli</i> †		Kim et al. 2008	Human, soil
<i>A. tandoii</i> †		Carr et al. 2003	Activated sludge, water, soil
<i>A. tjernbergiae</i>		Carr et al. 2003	Activated sludge
<i>A. townneri</i>		Carr et al. 2003	Activated sludge, water, soil
<i>A. ursingii</i>	Phenon 1	Nemec et al. 2001	Human
<i>A. variabilis</i>	Genomic species 15TU	Krizova et al. 2015a	Human, animals, soil
<i>A. venetianus</i>		Vaneechoutte et al. 2009, Di Cello et al. 1997	Salt water
<i>A. vivianii</i>	Taxon 20	Nemec et al. 2016, Touchon et al. 2014	Human, soil, water

Species name published ahead of print in the IJSEM (n=3)	Former (informal) designation	Reference	Cultured (mainly) from *
' <i>A. colistiniresistens</i> '	Genomic sp. 13BJ/14TU	Nemec et al. 2017, Bouvet & Jeanjean 1989/Tjernberg & Ursing 1989	Human
' <i>A. defluvii</i> ' †		Hu et al. 2017	Hospital sewage
' <i>A. larvae</i> ' †		Liu et al. 2016	Moth larval gut

Tentative species designation (n=5)	Other designation	Reference	Cultured (mainly) from *
Genomic sp. 6		Bouvet & Grimont 1986	Human
Genomic sp. 15BJ		Bouvet & Jeanjean 1989	Human
Genomic sp. 16		Bouvet & Jeanjean 1989	Human
Taxon 21		Touchon et al. 2014	Human
Taxon 22		Touchon et al. 2014	Human
Taxon 23	Genomic species 8	Touchon et al. 2014, Bouvet & Grimont 1986	Soil, water, animals, human

## ANEXO 1 (continuação).

Table. Classification and nomenclature of the genus *Acinetobacter* - continued

Effectively but not validly published species name (n=10)	Other designation	Reference	Cultured (mainly) from *
' <i>A. antiviralis</i> ' †		Lee et al. 2009	Tobacco plant roots
' <i>A. halotolerans</i> ' †		Dahal et al. 2017	Soil
' <i>A. kyonggiensis</i> ' †		Lee & Lee 2010	Sewage treatment plant
' <i>A. marinus</i> ' †		Yoon et al. 2007	Sea water
' <i>A. oleivorans</i> ' † ¶		Kang et al. 2011	Soil
' <i>A. oryzae</i> ' †		Chaudhary et al. 2012	Rice
' <i>A. plantarum</i> ' † (= <i>A. junii</i> ) §		Du et al. 2016	Wheat
' <i>A. refrigeratoris</i> ' † (= <i>A. variabilis</i> ) §		Feng et al. 2014b	Refrigerator
' <i>A. seohaensis</i> ' † (= <i>A. townneri</i> ) §		Yoon et al. 2007	Sea water
' <i>A. septicus</i> ' † (= <i>A. ursingii</i> ) ‡		Kilic et al. 2007, Nemeč et al. 2008	Human

## Notes

\* Based also on studies other than those included in the reference list.

† Species description based on a single strain only.

‡ The first name is a later heterotypic synonym of that shown in parentheses.

§ The first name is probably a later heterotypic synonym of that shown in parentheses (Nemeč & Radolfova-Krizova, unpublished).

¶ *A. lwoffii* and Taxon 23 correspond, respectively, to genomic species 9 and 8 sensu Bouvet & Grimont (1986) (Nemeč & Radolfova-Krizova, unpublished).

# '*A. dijkschoorniae*' and '*A. lactucae*' are synonyms (ANLB between the published whole-genome sequences of the respective type strains is as high as 97.2%).

¶ Strain '*A. oleivorans*' DR1 is closely related to the *A. calcoaceticus*-like strains described by Gerner-Smidt & Tjernberg (1993) (Nemeč & Radolfova-Krizova, unpublished).

## References (hyperlinks)

- Abbas S, Ahmed I, Kudo T et al. (2014) *Pak J Agri Sci* 51:595–608. [Validation list 161]
- Álvarez-Pérez S, Lievens B, Jacquemyn H, Herrera CM. (2013) *Int J Syst Evol Microbiol* 63:1532–9.
- Anandham R, Weon H-Y, Kim S-J et al. (2010) *J Microbiol* 48:36–9. [Validation list 140]
- Bouvet PJM & Grimont PAD. (1986) *Int J Syst Bacteriol* 36:228–40.
- Bouvet PJM & Jeanjean S. (1989) *Res Microbiol* 140:291–9.
- Carr EL, Kämpfer P, Patel BKC et al. (2003) *Int J Syst Evol Microbiol* 53:953–63.
- Chaudhary HJ, Peng G, Hu M et al. (2012) *Microb Ecol* 63:813–21.
- Choi JY, Ko G, Jheong W et al. (2013) *Int J Syst Evol Microbiol* 63:4402–6.
- Cosgaya C, Mari-Almirall M, Van Assche A et al. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:4105–11.
- Dahal RH, Chaudhary DK, Kim J. (2017) *Arch Microbiol* In press.
- Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R. (1997) *Res Microbiol* 148:237–49.
- Du J, Singh H, Yu H et al. (2016) *Arch Microbiol* 198:393–8.
- Feng G-D, Yang S-Z, Wang Y-H et al. (2014a) *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3417–21.
- Feng G, Yang S, Wang Y et al. (2014b) *Curr Microbiol* 69:888–93.
- Gerner-Smidt P & Tjernberg I. (1993) *APMIS* 101:826–32.
- Hu Y, Feng Y, Zhang X, Zong Y. (2017) *Int J Syst Evol Microbiol* In press.
- Kang Y-S, Jung J, Jeon CO, Park W. (2011) *J Microbiol* 49:29–34.
- Kilic A, Li H, Mellmann A et al. (2007) *J Clin Microbiol* 46:902–8.
- Kim D, Baik KS, Kim MS et al. (2008) *J Microbiol* 46:396–401. [Validation list 128]
- Kim PS, Shin N-R, Kim JY et al. (2014) *J Microbiol* 52:639–45. [Validation list 160]
- Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemeč A. (2014) *Syst Appl Microbiol* 37:467–73. [Validation list 161]
- Krizova L, McGinnis J, Maixnerova M et al. (2015a) *Int J Syst Evol Microbiol* 65:857–63.
- Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemeč A. (2015b) *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3905–12.
- Lee H-J & Lee S-S. (2010) *J Microbiol* 48:754–9.
- Lee J-S, Lee KC, Kim KK et al. (2009) *J Microbiol Biotechnol* 19:250–6.
- Li Y, Piao C, Ma Y et al. (2013) *Int J Syst Evol Microbiol* 63:2963–9.
- Li Y, He W, Wang T et al. (2014a) *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1043–50.
- Li W, Zhang D, Huang X, Qin W. (2014b) *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1507–13.
- Li Y, Chang J, Guo L et al. (2015) *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4461–68.
- Liu S, Wang Y, Ruan Z et al. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* In press.
- Malhotra J, Anand S, Jindal S et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol* 62:2883–90.
- Nemeč A, De Baere T, Tjernberg I et al. (2001) *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1891–9.
- Nemeč A, Dijkshoorn L, Cleenwerck I et al. (2003) *Int J Syst Evol Microbiol* 53:1563–7.
- Nemeč A, Musilek M, Vanechoute M et al. (2008) *J Clin Microbiol* 46:2826–7.
- Nemeč A, Musilek M, Maixnerová M et al. (2009) *Int J Syst Evol Microbiol* 59:118–24.
- Nemeč A, Musilek M, Sedo O et al. (2010) *Int J Syst Evol Microbiol* 60:896–903.
- Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M et al. (2011) *Res Microbiol* 162:393–404. [Validation list 140]
- Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M et al. (2015) *Int J Syst Evol Microbiol* 65:934–42.
- Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M et al. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:1673–85.
- Nemeč A, Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Sedo O. (2017) *Int J Syst Evol Microbiol* In press.
- Nemeč A & Radolfova-Krizova L. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5614–7.
- Nishimura Y, Ino T, Iizuka H. (1988) *Int J Syst Bacteriol* 38:209–11.
- Poppel MT, Skiebe E, Laue M et al. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:881–8.
- Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemeč A. (2016a) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3897–903.
- Radolfova-Krizova L, Maixnerova M, Nemeč A. (2016b) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5392–8.
- Rooney AP, Dunlap CA, Flor-Weiler LB. (2016) *Int J Syst Evol Microbiol* 66:3566–72.
- Smet A, Cools P, Krizova L et al. (2014) *Int J Syst Evol Microbiol* 64:4007–15.
- Tjernberg I & Ursing J. (1989) *APMIS* 97:595–605.
- Touchon M, Cury J, Yoon E-J et al. (2014) *Genome Biol Evol* 6:2866–82.
- Vanechoute M, De Baere T, Nemeč A et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58:937–40.
- Vanechoute M, Nemeč A, Musilek M et al. (2009) *Int J Syst Evol Microbiol* 59:1376–81.
- Vaz-Moreira I, Novo A, Hantsis-Zacharov E et al. (2011) *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2837–43.
- Yoon J-H, Kim I-G, Oh T-K. (2007) *J Microbiol Biotechnol* 17:1743–50.

Updated: March 4, 2017

Alexandr Nemeč (<http://apps.szu.cz/anemeč/anemeč.htm>)

## **Capítulo II – Manuscrito**

**PAGINA TÍTULO**

**Título.** Estudo “in vitro” da eficácia de antissépticos contra clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*.

**Autores.** Erlen Cristina Botelho<sup>a</sup>, Dalila Kozerski<sup>a</sup>, Aniely Correa de Moraes<sup>a</sup>, Carolina Veronêz Garbúggio, Maisa Cristina Barreto Zago<sup>a</sup>, Maria Cristina Bronharo Tognim<sup>a</sup>, Celso Luiz Cardoso<sup>a\*</sup>

**Afiliação.** <sup>a</sup>Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

**Autor correspondente.** Prof. Celso Luiz Cardoso, Laboratório de Microbiologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Campus Universitário. 87020-900 Maringá, Paraná, Brazil.

Fone: +55 44 3011-4953. Fax: +55 44 3011-5941

E-mail: clcardoso@uem.br

**Título corrido.** Ação de antissépticos em *A. baumannii*.

## RESUMO

**Introdução.** A resistência de amostras hospitalares de *Acinetobacter baumannii* aos antibióticos tem sido frequentemente descrito na literatura, entretanto, poucos estudos têm investigado a resistência deste microrganismo aos antissépticos.

**Objetivo.** Avaliar a eficácia dos principais antissépticos usados para a higiene das mãos contra isolados hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*. A possível associação entre a resistência a antibióticos e antissépticos foi também investigada.

**Métodos.** O teste de suspensão quantitativo, realizado na presença de substâncias interferentes, conforme descrito na Norma Européia 13727 (EN 13727), foi usado para investigar a atividade bactericida da clorexidina a 2%, povidona-iodo a 1%, álcool etílico 70% (p/p) e do álcool etílico em gel 70% (v/v) contra diferentes clones hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* (N=33). Como requerimento mínimo para a atividade bactericida o produto testado deve demonstrar uma redução de pelo menos 5 log<sub>10</sub> (preparações alcoólicas) ou de 3 log<sub>10</sub> (clorexidina, povidona-iodo) no teste de suspensão.

**Resultados.** Todos os isolados de *Acinetobacter baumannii* foram sensíveis aos antissépticos testados nas condições limpa (albumina 1,5%) ou suja (albumina 15% mais hemácias de carneiro a 15%). A ação bactericida média±dp dos produtos testados, expressa pelo fator de redução logarítmica, nas condições limpa e suja, foram de, respectivamente, 7,40±0,20 e 7,36±0,53 (clorexidina); 7,36±0,46 e 7,37±0,41 (povidona-iodo); 7,46±0,20 e 7,42±0,32 (álcool etílico); 7,40±0,32 e 7,48±0,12 (álcool gel); demonstrando que cada produto testado cumpriu o critério exigido para aprovação pela EN 13727.

**Conclusão.** Todos os isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* foram mortos pelos antissépticos comumente usados na prática hospitalar, sugerindo que higiene das mãos deve

ser efetiva na prevenção da disseminação de *A. baumannii* nos hospitais. Não foi encontrada associação entre a resistência aos antibióticos e a reduzida susceptibilidade aos antissépticos.

**Palavras-chaves.** Acinetobacter, antisséptico, Norma Européia 13727, teste de suspensão.

## INTRODUÇÃO

A higienização das mãos é considerada o procedimento isolado mais importante na prevenção das infecções relacionadas à assistência à saúde porque muitas destas infecções são causadas por microrganismos transmitidos pelas mãos contaminadas dos profissionais da saúde, principalmente quando a higiene das mãos é omitida, negligenciada ou realizada com produtos inadequados.<sup>1-3</sup>

Nas últimas décadas, as bactérias do gênero *Acinetobacter*, particularmente *Acinetobacter baumannii*, tornaram-se importantes patógenos hospitalares devido a crescente frequência e gravidade de infecções causadas em pacientes internados em unidades de tratamento intensivo e sua ampla resistência aos principais antibióticos usados na prática hospitalar. Surtos de infecções hospitalares causados por estes microrganismos podem durar vários anos devido sua longa sobrevivência no ambiente inanimado.<sup>4-7</sup>

Um estudo, realizado em nosso hospital mostrou que um clone endêmico de *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos e sensível apenas a polimixina e tigeciclina foi isolado em 12% dos pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva Adulto (UTI-A). Este clone foi encontrado nas grades dos leitos, monitor cardíaco, ventilador mecânico, sítios da pele dos pacientes, nas luvas dos profissionais de saúde e objetos utilizados na assistência ao paciente. Este microrganismo ainda persiste em nossa UTI-A, apesar da adoção de medidas de prevenção e controle específicas, com ênfase nas técnicas de limpeza e desinfecção do ambiente, higiene das mãos, uso de luvas e de rigorosos critérios de isolamento.<sup>8,9</sup>

Outro estudo em nossa UTI-A mostrou que as preparações alcoólicas e um sabão líquido comum foram mais efetivos do que a clorexidina na descontaminação das mãos enluvadas dos profissionais de enfermagem após o cuidado a pacientes colonizados ou

infectados com o clone endêmico multirresistente do *Acinetobacter baumannii*.<sup>9</sup> Estes achados clínicos foram confirmados em um estudo de laboratório no qual utilizamos como modelo experimental a contaminação das mãos de voluntários humanos com uma cepa representativa do clone multirresistente de *A. baumannii* endêmico em nosso hospital.<sup>10</sup>

Com base nestes achados, a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar passou a estimular o uso das preparações alcoólicas na UTI-A. Essa medida resultou em uma diminuição acentuada da disseminação do clone multirresistente de *Acinetobacter baumannii* endêmico em nosso hospital. Estes dados sugerem que esse clone de *A. baumannii* poderia apresentar uma reduzida susceptibilidade a clorexidina, que era o produto mais usado para a higienização das mãos dos profissionais de saúde da UTI-A.

Este fato talvez possa explicar, entre outros aspectos, a longa permanência do clone multirresistente de *A. baumannii* como patógeno endêmico na UTI-A do nosso hospital. Entretanto, é importante salientar que a reduzida susceptibilidade de patógenos hospitalares a antissépticos e desinfetantes é ainda matéria de debate e mais estudos são necessários para o melhor conhecimento deste assunto.<sup>11</sup>

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação bactericida dos principais antissépticos usados na higiene das mãos, representados por clorexidina, povidona-iodo, álcool líquido e álcool gel, contra diferentes clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*, utilizando como modelo experimental o teste de suspensão quantitativo realizado na presença de substâncias interferentes descrito na Norma Européia 13727.<sup>12</sup>

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Amostras Bacterianas.** Foram selecionados da “Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Médica” do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, 33 diferentes clones hospitalares multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* isolados no período de 1994 a 2014 de pacientes internados em unidades críticas de três hospitais da região norte e noroeste do estado do Paraná, Brasil. Os microrganismos eram estocados em tubos do tipo “eppendorff”, com capacidade de 1,5 mL (Greiner Bio-One Brasil Produtos Médico Hospitalar Ltda., Americana, SP, Brasil), contendo caldo Müeller-Hinton (BBL-Difco, Sparks, Maryland, USA) adicionado de 30% (v/v) de glicerol (Merck, Darmstadt, Germany), mantidos em “freezer” a -20°C.

Todos os isolados hospitalares de *A. baumannii* investigados no presente estudo foram previamente caracterizados por tipagem molecular (dados não demonstrados) através do uso da técnica "Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)".<sup>13</sup> Apenas um isolado de *A. baumannii* por clone foi investigado, selecionando-se sempre que possível aquele que apresentou maior resistência aos agentes antimicrobianos, utilizando-se como marcadores a sensibilidade ou a resistência a carbapenêmicos e polimixina B e a produção de enzimas  $\beta$ -Lactamases da classe das oxacilinas (Tabela 1).

**Antibiograma e identificação das amostras bacterianas.** Inicialmente, a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* foi analisada com base nos resultados de rotina do antibiograma realizado com o emprego de sistemas automatizados de identificação e antibiograma – Phoenix®100, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA ou MicroScan®, DadeBehring Inc., West Sacramento, CA, USA. O perfil de sensibilidade aos principais antibióticos utilizados no tratamento das infecções causadas por

*A. baumannii* foi confirmado pela determinação da concentração inibitória mínima (descrito abaixo). Testes fenotípicos complementares de identificação, incluindo oxidase, mobilidade em gota pendente, crescimento às temperaturas de 37°C, 41°C e 44°C foram realizados para confirmação de *A. baumannii*.<sup>14,15</sup>

**Determinação da Concentração Inibitória Mínima.** A determinação da concentração inibitória mínima dos isolados de *A. baumannii* foi realizada por ágar diluição, utilizando-se a técnica recomendada pelo “Clinical and Laboratory Standard Institute” – CLSI M7-A10-2015.<sup>16</sup> Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos: ceftriaxona (BioChimico, Instituto BioChimico Ltda, Rio de Janeiro, Brasil); ceftazidime (Glaxo Smith Kline, London, United Kingdom); cefepime (Bristol-Myers-Squibb, Guayaquil, Equador); imipenem (Merck Sharp & Dohme, Darmstadt, Germany); meropenem (AstraZeneca, London, United Kingdom) e polimixina B (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

**Antissépticos.** Foram testados os principais agentes usados para a higiene das mãos na prática hospitalar, representado pelos seguintes produtos: (i) solução antisséptica-detergente contendo 2% de digluconato de clorexidina (Riohex®, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil); (ii) solução antisséptica-detergente contendo 10% de polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I), com 1% de iodo ativo (Laboriodine Degermante®, Segmenta Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil); (iii): álcool etílico a 70% (p/p), preparado no momento de uso pela mistura de 70g de álcool etílico absoluto (Merck) com 30g de água destilada; (iv) álcool gel 70% (v/v) (Riogel®, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil).

**Teste de Suspensão ( $N_a$ ).** A atividade bactericida dos produtos foi avaliada pelo teste de suspensão quantitativo, realizado na presença de substâncias interferentes (i.e., proteína e hemácias de carneiro), de acordo com a Norma Européia 13727.<sup>12</sup> A técnica do teste de suspensão, indicada para produtos prontos para uso, é descrita a seguir.

1. MICRORGANISMOS TESTES. Os microrganismos testes foram representados pelos isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* (N=33) e pela amostra de coleção de cultura *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) usada para efeito de comparação.
2. MICRORGANISMOS CONTROLES. Os microrganismos controles utilizados para a validação do teste de suspensão, foram as seguintes amostras de coleção de cultura: *Escherichia coli* K12, NCTC 10538 (National Collection of Type Cultures, London, England); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; *Enterococcus hirae* ATCC 10541 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
3. CULTURA DE TRABALHO. Remover do “freezer” a  $-20^{\circ}\text{C}$  os tubos “eppendorffs” contendo a suspensão das bactérias a serem testadas e deixar descongelar a temperatura ambiente. A seguir, com auxílio de alça bacteriológica (alça de níquel-cromo com 3 mm de diâmetro interno), semear a suspensão bacteriana por técnica de esgotamento na superfície de placas contendo “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL, Sparks, Maryland, USA). Incubar as placas em aerobiose na estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 24 a 48 horas. Confirmar a pureza das colônias pelo exame microscópico (imersão) das propriedades morfotintoriais das células bacterianas em esfregaços corados pela técnica de Gram.<sup>17</sup> Transferir uma colônia bacteriana da placa para tubos 13x100mm contendo “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL) inclinado, semear por estrias na superfície do meio. Incubar o tubo na estufa em aerobiose a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas (subcultivo 1). Fazer um novo subcultivo a partir do subcultivo 1 e incubar na estufa em

aerobiose a 37°C por 24 horas (subcultivo 2). Usar o subcultivo 2 como a cultura de trabalho.

4. INÓCULO DO TESTE DE SUSPENSÃO (N). Em um Erlenmeyer de 125mL, contendo 5g de pérolas de vidro (3-5mm de diâmetro), previamente esterilizado, adicionar assepticamente 10mL de uma solução de salina triptonada preparada de acordo com a seguinte fórmula: cloreto de sódio 0,85g; “Tryptone” (Difco-BBL) 0,1g; água destilada 100mL. Após dissolver os ingredientes, esterilizar a salina triptonada na autoclave a 121°C por 15 minutos. Para o preparo do inóculo da suspensão teste transferir várias alçadas da cultura de trabalho para o Erlenmeyer contendo a salina triptonada (10mL), friccionando a massa bacteriana da alça contra a parede do frasco para deslocar as células antes do contato com a salina triptonada, de forma a se obter uma suspensão mais estável possível. Homogeneizar o frasco durante 3 minutos em agitador mecânico. Aspirar a suspensão sobrenadante às pérolas de vidro e transferir assepticamente 4mL para um tubo de ensaio 13x100mm estéril. Ajustar o número de células desta suspensão para  $1,5 \times 10^9$  a  $5,0 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Manter a suspensão em banho-maria a 20°C e realizar o teste de suspensão dentro de 2 horas.

4.1. Ajuste da turbidez da suspensão bacteriana. Preparar a turbidez inicial da suspensão bacteriana por comparação visual ao tubo número cinco da escala de McFarland que equivale a  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL.<sup>15</sup> A seguir, ajustar a turbidez da suspensão em espectrofotômetro utilizando filtro verde e comprimento de onda de 620  $\mu\text{m}$  (Modelo Spectronic 21D, Milton Ray, USA) com base na contagem de viáveis realizada pelo uso da seguinte técnica: preparar diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) pela mistura de 1mL da suspensão bacteriana com 9mL de solução salina triptonada 0,1%. Semear 0,1mL das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  e 1mL das diluições  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  (dividido em volumes de 0,5mL por placa) na superfície de placas contendo “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL). Incubar as

placas em aerobiose na estufa a 37°C. Fazer a contagem das colônias após 24 horas de incubação. Expressar o resultado final da contagem em UFC/mL. A contagem de viáveis esperada para as diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  era de, respectivamente, 150 a 500 UFC/mL e 15 a 50 UFC/mL.

5. SUSPENSÕES DE VALIDAÇÃO ( $N_V$ ,  $N_{VB}$ ).

5.1. Suspensão de validação ( $N_V$ ). Diluir a suspensão teste (N) com solução salina triptonada a 0,1% até se obter uma suspensão bacteriana contendo  $3,0 \times 10^3$  UFC/mL a  $1,6 \times 10^4$  UFC/mL [cerca de  $\frac{1}{4}$  (1+3) da diluição  $10^{-5}$ ].

5.2. Suspensão de validação do controle de neutralizantes ( $N_{VB}$ ). Diluir a suspensão teste (N) com solução salina triptonada a 0,1% até se obter uma suspensão bacteriana contendo  $3,0 \times 10^4$  UFC/mL a  $1,6 \times 10^5$  UFC/mL [cerca de  $\frac{1}{4}$  (1+3) da diluição  $10^{-4}$ ].

**Nota:** Manter as suspensões de validação ( $N_V$ ,  $N_{VB}$ ) em banho-maria a 20°C e realizar o teste de suspensão dentro de 2 horas.

6. TESTE DE SUSPENSÃO ( $N_A$ ) – FIGURA 1. Descrição geral do teste: em um tubo de ensaio 16x160mm (tubo-1), misturar 0,2mL de uma solução de albumina bovina fração V a 1,5% no teste de condição limpa (baixa concentração da substância interferente) ou 0,2mL de uma solução contendo albumina bovina fração V (15%) mais hemácias de carneiro (15%, v/v) no teste de condição suja (alta concentração de substâncias interferentes) com 0,1mL do inóculo do teste de suspensão (N). Homogeneizar e manter o tubo por  $2\text{min} \pm 10\text{s}$  em banho-maria a 20°C – tempo de contato da pré-mistura. A seguir, adicionar para cada condição do teste 9,7mL do antisséptico ao tubo-1. Após 30 segundos de contato, a temperatura de 20°C, transferir 1mL desta mistura para outro tubo 16x160mm contendo 1mL de água destilada estéril e 8mL de solução neutralizante (tubo-2). Após  $10 \pm 0,2$  segundos de contato, transferir volumes de 0,5mL do tubo-2 para a superfície de, respectivamente, quatro placas contendo “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL) e

imediatamente, com auxílio da pipeta, semear por estrias a superfície do meio de cultura nos planos paralelo e perpendicular ao diâmetro da placa, obtendo-se assim a semeadura de 1mL (0,5mL+0,5mL) em duplicata. Incubar as placas em aerobiose na estufa a 37°C. Fazer a contagem das colônias após 24 e 48 horas de incubação. Expressar o resultado final da contagem em UFC/mL. A atividade bactericida dos antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) é considerada efetiva (i.e. o produto é aprovado no teste de suspensão) quando a redução do número de bactérias viáveis do inóculo inicial for de 3 Log<sub>10</sub> (i.e., redução de 99,9%) ou de 5 Log<sub>10</sub> (i.e., redução de 99,999%) para as preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel).

7. SOLUÇÃO NEUTRALIZANTE. De acordo com o produto testado, a solução neutralizante era constituída da mistura dos seguintes agentes neutralizantes:

7.1. Álcool etílico 70% e álcool gel. Polisorbato 80 a 3% (Inlab, São Paulo, SP, Brasil); lecitina de soja a 0,3% (Via Farma importadora Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e saponina 3% (Inlab, São Paulo, SP, Brasil).

7.2. Povidona-iodo. Tiosulfato de sódio a 1% (Labsynth Produtos para laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), polisorbato 80 a 3% (Inlab) e lecitina de soja a 0,3% (Via Farma importadora Ltda).

7.3. Clorexidina. Tiosulfato de sódio a 0,5% (Labsynth Produtos para laboratórios Ltda), polisorbato 80 a 10%? ou 3%? (Inlab) e lecitina de ovo a 3% (CR Vertuan Indústria de Produtos Naturais e Nutracêuticos, Maringá, PR, Brasil); L-histidina 0,1% (Labsynth Produtos para laboratórios Ltda) e saponina 3% (Inlab).

8. CONTROLES. Em paralelo ao teste de suspensão realizar os controles da condição experimental, da ação tóxica dos neutralizantes e do efeito residual dos produtos testados.

8.1. Controle A (Figura 2) – Controle da condição experimental – Transferir 0,1ml da suspensão de validação (N<sub>v</sub>) para um tubo contendo 0,2ml de solução de albumina bovina

fração V a 1,5% no teste de condição limpa ou 0,2ml de solução contendo albumina bovina fração V (15%) mais hemácias de carneiro (15%, v/v) no teste de condição suja. Manter os tubos em banho-maria a 20°C por 2 minutos– tempo de contato da pré-mistura. A seguir, adicionar 9,7ml de água dura no controle dos antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) ou 9,7ml de água destilada estéril no controle das preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel). Após 30 segundos de contato, semear 1mL da mistura de cada tubo, em duplicata, na superfície de “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL) conforme descrito anteriormente no item 5. Incubar as placas em aerobiose na estufa a 37°C durante 24 horas. Expressar o resultado final da contagem de colônias em UFC/mL.

8.1.1. Técnica de preparo da água dura. Em um Erlenmeyer de 125mL estéril, adicionar asepticamente 40,3mL de água destilada estéril; 0,3mL da Solução A e 0,4mL da Solução B. Usar a solução de água dura no máximo 12 horas após o preparo.

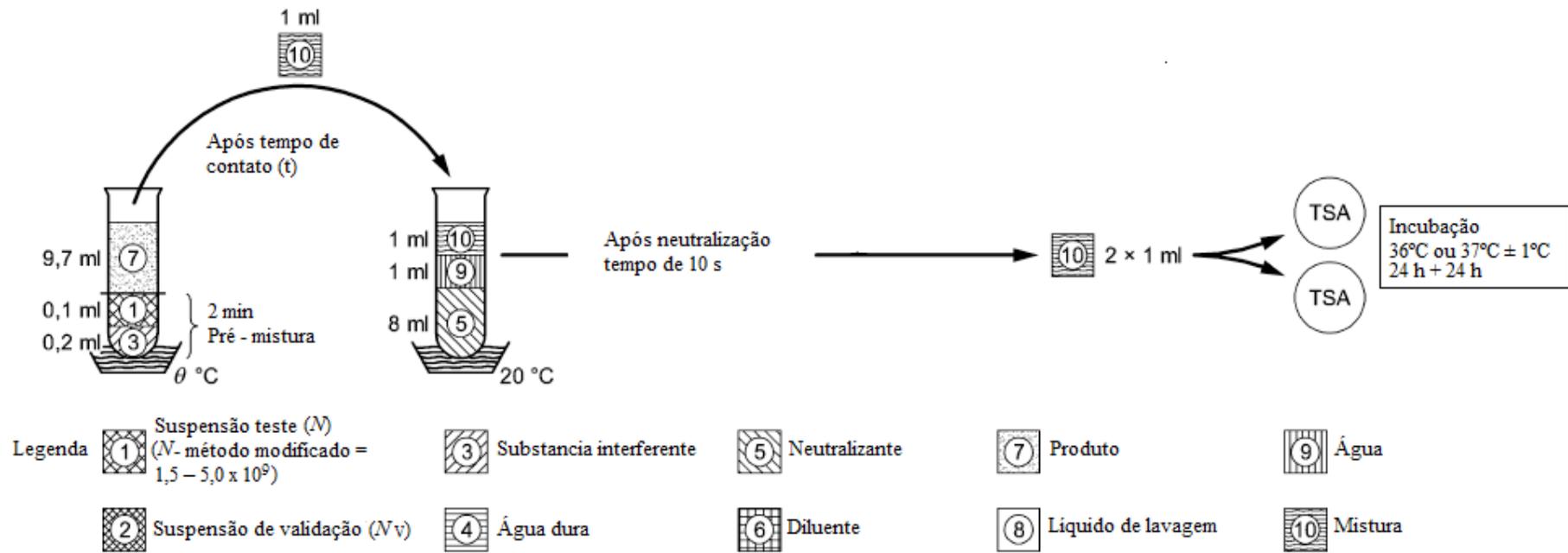
Solução A. Fórmula: 1,98g de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ); 4,62g de cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ); água destilada, 100mL. Dissolver os ingredientes e esterilizar a solução na autoclave a 121°C por 15 minutos. Manter a solução em refrigerador e usar até 30 dias após o preparo.

Solução B. Dissolver 0,35g de bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) em 10mL de água destilada. Esterilizar por filtração em membrana com poros de 0,45 $\mu$ m (MF™ Membrane Filters; Merck-Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda). Manter a solução em refrigerador e usar até sete dias após seu preparo.

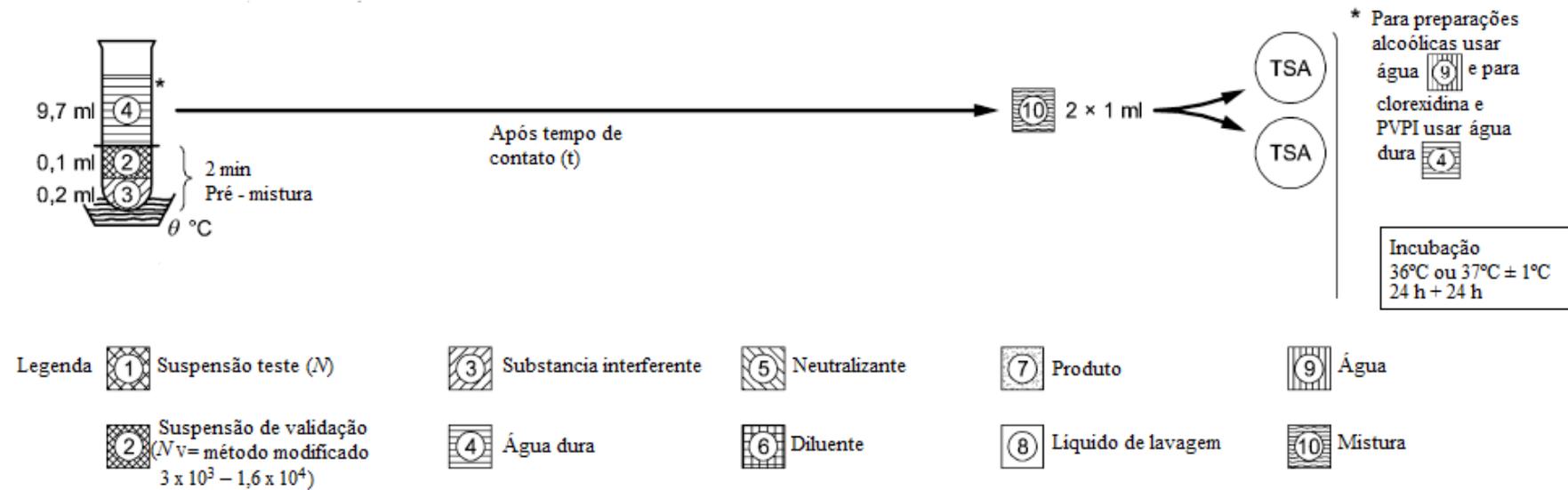
8.2. Controle B (Figura 3) – Controle da ausência de toxicidade dos neutralizantes – Transferir 1mL da suspensão de validação ( $N_{VB}$ ) para um tubo contendo 9mL da solução neutralizante específica para cada produto testado. Transferir 0,5mL dessa mistura para o tubo-1 contendo 4,5 mL de solução neutralizante (diluição 1:10). Transferir 0,5 mL da mistura do tubo-1 para o tubo-2 contendo 4,5 mL de solução neutralizante (diluição 1:100).

Após 30 segundos de contato, semear 1mL da mistura do tubo-2, em duplicata, na superfície de “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL) conforme descrito anteriormente no item 5. Durante a realização da técnica manter todos os tubos em banho-maria a 20°C. Incubar as placas em aerobiose na estufa a 37°C. Fazer a contagem das colônias após 24 e 48 horas de incubação. Expressar o resultado final da contagem em UFC/mL.

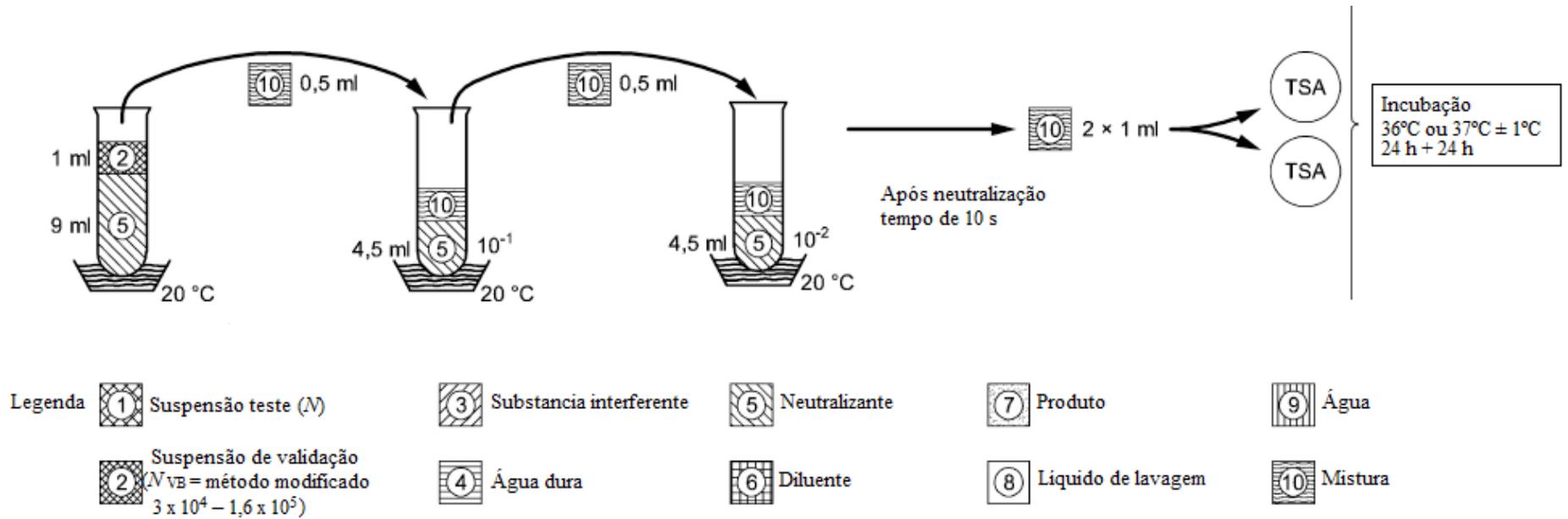
8.3. Controle C (Figura 4) – Validação da neutralização-diluição – Transferir 0,1ml de solução salina triptonada a 0,1% para um tubo contendo 0,2mL de solução de albumina bovina fração V a 1,5% no teste de condição limpa ou 0,2mL de solução contendo albumina bovina fração V (15%) mais hemácias de carneiro (15%, v/v) no teste de condição suja. A seguir, adicionar para cada condição do teste 9,7mL do produto a ser testado. Após 30 segundos, transferir 1,1mL dessa mistura para um tubo, mantido em banho-maria a 20°C, contendo 8,8mL da solução neutralizante específica para cada um dos produtos testados. Após 10 segundos, adicionar ao tubo 0,1mL da suspensão de validação ( $N_V$ ) e deixar em contato por 30 minutos. A seguir, semear 1mL dessa mistura, em duplicata, na superfície de “Tryptic Soy Agar” (Difco-BBL) conforme descrito anteriormente no item 5. Incubar as placas em aerobiose na estufa a 37°C durante 24 horas. Expressar o resultado final da contagem de colônias em UFC/mL.



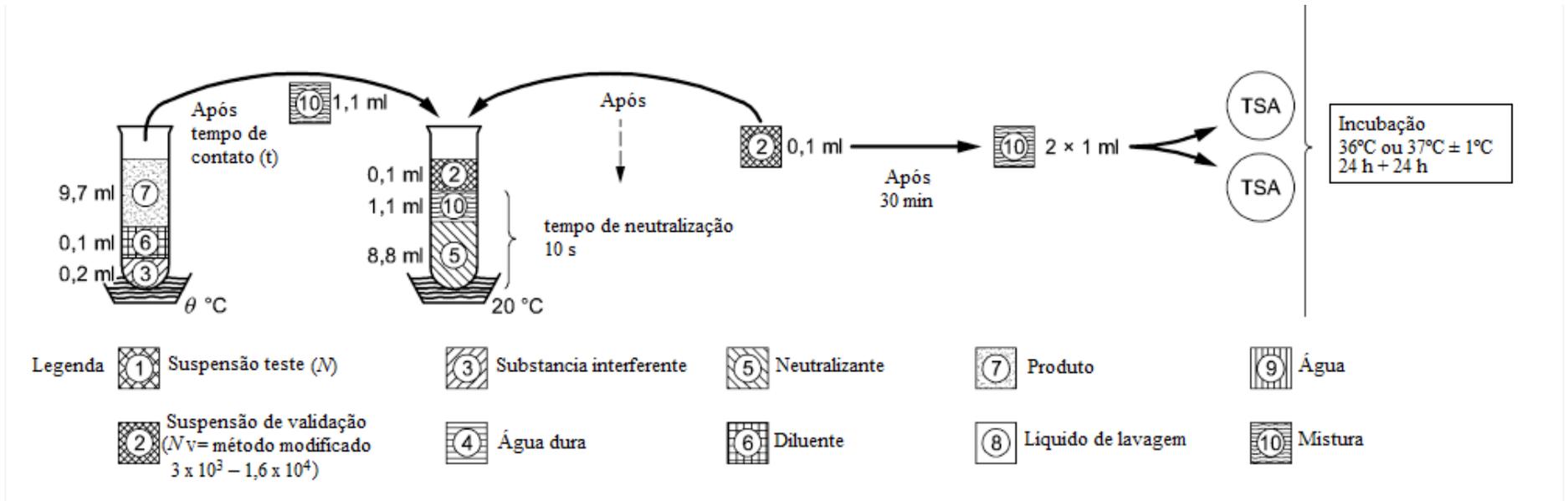
**Figura 1.** Teste de suspensão ( $N_A$ ) na presença de substâncias interferentes (proteína e hemácias de carneiro) de produtos prontos para uso para a higiene das mãos: antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) e preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel).



**Figura 2.** Controle A – Controle da condição experimental do teste de suspensão ( $N_A$ ) na presença de substâncias interferentes (proteína e hemácias de carneiro) de produtos prontos para uso para a higiene das mãos: antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) e preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel).



**Figura 3.** Controle B – Controle da ausência de toxicidade dos neutralizantes do teste de suspensão ( $N_A$ ) na presença de substâncias interferentes (proteína e hemácias de carneiro) de produtos prontos para uso para a higiene das mãos: antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) e preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel).



**Figura 4.** Controle C – Validação da neutralização-diluição do teste de suspensão ( $N_A$ ) na presença de substâncias interferentes (proteína e hemácias de carneiro) de produtos prontos para uso para a higiene das mãos: antissépticos detergentes (clorexidina e povidona-iodo) e preparações alcoólicas (álcool etílico 70% e álcool gel).

## RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentadas as características da origem dos 33 clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii* e o perfil de sensibilidade aos principais antibióticos do grupo  $\beta$ -Lactâmico, representado pelas cefalosporinas de 3ª geração (ceftriaxona, ceftazidime) e de 4ª geração (cefepime) e os carbapenêmicos (imipenem e meropenem); a polimixina-B e a produção de  $\beta$ -Lactamases da classe das oxacilinas.

Conforme mostrado na Tabela 1, todos os clones hospitalares de *A. baumannii* sensíveis aos carbapenêmicos, produtores ou não de OXA-23, foram resistentes as cefalosporinas e sensíveis a polimixina B. Os clones resistentes aos carbapenêmicos, com exceção do clone HU-UEL-24, foram sensíveis apenas a polimixina B. Os clones hospitalares de *A. baumannii* HU-UEL-680, HU-UEL-576 e HUM-Ac-59, produtores de OXA-23, foram resistentes as cefalosporinas, carbapenêmicos e a polimixina.

Atividade bactericida dos antissépticos degermantes representada pela clorexidina a 2% e povidona-iodo (PVP-I) a 10% com teor de 1% de iodo livre e das preparações alcoólicas incluindo o álcool etílico 70% (p/p) e o álcool gel (álcool etílico 70% v/v) contra os diferentes clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii* com diversos perfis de sensibilidade aos antibióticos avaliada pelo teste de suspensão quantitativo realizado na presença de substâncias interferentes (proteína e hemácias de carneiro) é apresentada na Tabela 2. Nenhum dos isolados de *Acinetobacter baumannii* testados mostrou susceptibilidade aos antissépticos degermantes ou as preparações alcoólicas no teste de suspensão realizado em condição limpa (i.e., na presença de albumina 1,5%) ou suja (i.e., na presença de albumina 15% mais hemácias de carneiro a 15%).

Conforme evidenciado na Tabela 2, a atividade bactericida dos produtos testados, expressa pelo fator de redução logarítmica (FRL), nas condições limpa e suja, variaram de,

respectivamente, 6,51 a 7,59 e 4,44 a 7,81 para clorexidina; 5,64 a 7,81 e 5,66 a 7,69 para povidona-iodo; 6,54 a 7,81 e 6,24 a 7,81 para álcool etílico; 6,03 a 7,65 e 7,24 a 7,81 para álcool gel. A média e o desvio padrão do FRL dos produtos testados nas condições limpa e suja foram de, respectivamente,  $7,40 \pm 0,20$  e  $7,36 \pm 0,53$  para clorexidina;  $7,36 \pm 0,46$  e  $7,37 \pm 0,41$  para povidona-iodo;  $7,46 \pm 0,20$  e  $7,42 \pm 0,32$  para álcool etílico;  $7,40 \pm 0,32$  e  $7,48 \pm 0,12$  para álcool gel (Tabela 2).

**Tabela 1.** Características dos clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii* e perfil de sensibilidade<sup>1</sup> aos principais antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos (cefalosporinas e carbapenêmicos) e polimixina-B e a produção de enzimas  $\beta$ -Lactamases da classe das oxacilinas.

Amostras bacterianas	Data de isolamento	Origem	Antimicrobianos ( $\mu\text{g/mL}$ )						Produção de oxacilinase
			CTX	CTZ	CEP	IMI	MER	PMB	
<b>Sensíveis<sup>2</sup> sem OXA-23</b>									
HU-Uel-18T	20/06/1994	Ponta de cateter	R (>512)	R (64)	R (128)	S (1)	S (2)	S (2)	51
HU-Uel-14	23/10/1995	Ambiente (cama)	R (>512)	R (32)	R (32)	S (2)	S (2)	S (2)	51
HU-Uel-4071	27/10/2004	Secreção traqueal	R (>512)	R (64)	R (64)	S (1)	S (2)	S (2)	51
HU-Uel-97	14/11/1995	Solução enteral	R (32)	R (32)	R (64)	S (1)	S (2)	S (2)	51
HU-Uel-102	21/10/1996	Secreção traqueal	R (>512)	R (256)	R (256)	S (1)	S (2)	S (2)	51
<b>Sensíveis<sup>2</sup> com OXA-23:</b>									
Sc-Ab-04	12/05/2009	Secreção traqueal	R (>512)	R (128)	R (64)	S (1)	S (2)	S (1)	51,23
Sc-Ab-34	22/06/2009	Hemocultura	R (>512)	R (>256)	R (128)	S (0,5)	S (2)	S (1)	51,23
Sc-Ab-39	22/03/2010	“Swab” oral/nasal	R (16)	R (4)	R (4)	S (1)	S (1)	S (1)	51,23
<b>Resistentes<sup>3</sup> sem OXA-23:</b>									
HU-Uel-3813	11/04/2004	Circuito de ar	R (>512)	R (>256)	R (64)	R (32)	R (32)	S (2)	51
Sc-Ac-36	04/03/2010	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (16)	R (16)	S (1)	51
Sc-Ac-43	13/03/2010	Hemocultura	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (16)	R (16)	S (1)	51
Sc-Ac-46	19/03/2010	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (4)	R (8)	S (1)	51
HUM-Ac-21	19/06/2011	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (8)	R (8)	S (2)	51
HUM-Ac-72	22/07/2012	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (32)	R (16)	R (16)	S (2)	51
HUM-Vi-341	28/08/2012	“Swab” retal	R (>512)	R (>256)	R (256)	R (32)	R (32)	S (2)	51

... /

... / Continuação da **Tabela 1.**

Amostras bacterianas	Data de isolamento	Origem	Antimicrobianos (µg/mL)						Produção de oxacilinase
			CTX	CTZ	CEP	IMI	MER	PMB	
<b>Resistentes<sup>3</sup> com OXA-23:</b>									
HU-UEL-24	27/11/1994	Ponta de cateter	R (>512)	R (32)	R (16)	S (2)	S (1)	S (2)	51,23
HU-UEL-4605	08/11/2004	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (64)	R (16)	R (16)	S (1)	51,23
HU-UEL-4345	27/08/2007	Secreção traqueal	R (512)	R (>256)	R (256)	R (32)	R (32)	S (1)	51,23
HUM-Ac-17	28/05/2011	Hemocultura	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
Sc4-Ac-113	10/11/2014	“Swab” nasal	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (64)	R (32)	S (1)	51,23
Sc-Ac-20	02/11/2009	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (>64)	R (32)	S (0,25)	51,23
Sc-Ac-59	14/04/2010	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (16)	R (16)	S (1)	51,23
Sc4-Ac-57	21/06/2014	Ponta de cateter	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (32)	R (32)	S (0,25)	51,23
HUM-Vi-11	14/09/2011	“Swab” retal	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
HUM-Vi-264	15/04/2013	“Swab” retal	R (>512)	R (>256)	R (64)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
HUM-Ac-27	21/07/2011	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (128)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
HUM-Ac-74	14/08/2012	Secreção traqueal	R (>512)	R (256)	R (128)	R (64)	R (16)	S (0,5)	51,23
HUM-Ac-57	28/02/2012	Hemocultura	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
HUM-Ac-104	19/06/2013	Ponta de cateter	R (64)	R (>256)	R (128)	R (32)	R (32)	S (2)	51,23
HUM-Ac-127	13/05/2014	Secreção traqueal	R (512)	R (>256)	R (>256)	R (32)	R (32)	S (0,25)	51,23
<b>Multirresistentes<sup>4</sup> com OXA-23:</b>									
HU-UEL-680	23/10/2011	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (256)	R (180)	R (>64)	R (16)	51,23
HU-UEL-576	09/10/2011	Secreção traqueal	R (>512)	R (>256)	R (256)	R (8)	R (8)	R (32)	51,23
HUM-Ac-59	23/03/2012	Aspirado traqueal	R (>512)	R (>256)	R (>256)	R (64)	R (64)	R (4)	51,23

CTX, ceftriaxona; CTZ, ceftazidime; CEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; PMB, Polimixina B; R, Resistente; S, sensível.

1. Concentração inibitória mínima determinada pelo método de ágar diluição<sup>16</sup>; 2. Sensível aos carbapenêmicos; 3. Resistentes aos carbapenêmicos; 4. Resistentes aos carbapenêmicos e polimixina B.

**Tabela 2.** Atividade bactericida dos principais antissépticos usados para a higienização das mãos, expressa pelo fator de redução logarítmico (FRL), contra diferentes clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii* avaliada pelo teste de suspensão quantitativo realizado na presença de substâncias interferentes em condições limpa (albumina a 1,5%) e suja (albumina a 15% e hemácias de carneiro a 15%), conforme descrito na Norma Européia 13727<sup>12</sup>

Amostras testadas	Clorexidina 2%		Povidona-iodo 1%		Álcool etílico 70% (p/p)		Álcool Gel	
	Limpa	Suja	Limpa	Suja	Limpa	Suja	Limpa	Suja
<b>Sensíveis a carbapenêmicos não produtoras de OXA-23:</b>								
HU-UEL-18T	7,60	7,60	7,61	7,61	7,61	7,61	7,61	7,61
HU-UEL-14	7,37	4,44	7,37	7,37	7,37	7,37	6,37	7,37
HU-UEL-4071	7,38	7,35	7,42	7,42	7,42	7,42	7,42	7,42
HU-UEL-97	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
HU-UEL-102	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65	7,65
<b>Sensíveis a carbapenêmicos produtoras de OXA-23:</b>								
Sc-Ab-04	7,65	7,64	5,95	7,25	7,25	6,25	7,25	7,25
Sc-Ab-34	7,50	7,50	7,57	7,57	7,57	7,57	7,57	7,57
Sc-Ab-39	7,41	7,41	7,45	7,45	7,45	7,45	7,45	7,45
<b>Resistentes a carbapenêmicos não produtoras de OXA-23:</b>								
HU-UEL-3813	7,30	7,30	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48
Sc-Ac-36	6,51	7,81	7,81	6,81	7,81	7,81	6,03	7,81
Sc-Ac-43	7,56	7,56	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53	7,53
Sc-Ac-46	7,31	7,31	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32
HUM-Ac-21	7,69	7,69	7,69	7,69	7,69	7,69	7,69	7,69
HUM-Ac-72	7,35	7,35	6,35	5,66	7,18	7,18	7,35	7,35
HUM-Vi-341	7,56	7,56	7,56	7,56	7,56	6,56	7,56	7,56
<b>Resistentes a carbapenêmicos produtoras de OXA-23:</b>								
HU-UEL-24	7,38	7,38	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39	7,39
HU-UEL-4605	7,39	7,39	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59
HU-UEL-4345	7,33	7,33	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48
HUM-Ac-17	7,57	7,57	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62
Sc4-Ac-113	7,38	7,38	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35
Sc-Ac-20	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32

/... Continuação Tabela 2.

Amostras testadas	Clorexidina 2%		Povidona-iodo 1%		Álcool etílico 70% (p/p)		Álcool Gel	
	Limpa	Suja	Limpa	Suja	Limpa	Suja	Limpa	Suja
<b>Resistentes a carbapenêmicos produtoras de OXA-23:</b>								
Sc-Ac-59	7,41	7,41	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
Sc4-Ac-57	7,49	7,49	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
HUM-Vi-11	7,38	7,38	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
HUM-Vi-264	7,58	7,58	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41	7,41
HUM-Ac-27	7,48	7,48	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
HUM-Ac-74	7,43	7,43	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54	7,54
HUM-Ac-57	7,33	7,33	7,33	7,33	7,33	7,33	7,33	7,33
HUM-Ac-104	7,22	7,22	5,64	6,06	6,54	6,24	7,24	7,24
HUM-Ac-127	7,21	7,21	7,52	7,52	7,52	7,52	7,52	7,52
<b>Multirresistentes<sup>1</sup>:</b>								
HU-UEL-680	7,47	7,47	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48	7,48
HU-UEL-576	7,59	7,59	7,45	7,45	7,45	7,45	7,45	7,45
HUM-Ac-59	7,18	7,18	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62
<b>Amostra padrão de <i>Acinetobacter baumannii</i>:</b>								
<i>A. baumannii</i> ATCC19606	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32	7,32
<b>Amostras Controles<sup>2</sup>:</b>								
<i>Escherichia coli</i> K12 NCTC 10538	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59	7,59
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	7,49	7,49	7,49	7,49	7,49	7,49	7,49	7,49
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62	7,62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38	7,38

NCTC, National Collection of Type Cultures, London, England; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA.

1. Resistentes a carbapenêmicos e polimixina B; 2, amostras de coleção de cultura usadas como controles para validação do teste de suspensão descrito na Norma Européia.<sup>1</sup>..

## DISCUSSÃO

A emergência da resistência aos antibióticos em *Acinetobacter baumannii* tem sido frequentemente descrito na literatura, entretanto, a resistência deste microrganismo aos antissépticos e desinfetantes têm sido pouco investigada.<sup>18,19</sup> Alguns pesquisadores sugerem que a exemplo do que ocorre em bactérias Gram-positivas (e.g., estafilococos, enterococos), as bactérias Gram-negativas, tais como, enterobactérias, pseudomonas, acinetobacter, também podem apresentar uma associação da resistência aos antibióticos com a reduzida susceptibilidade aos antissépticos. Essa associação poderia limitar a eficácia da antissepsia das mãos na prevenção e controle das infecções hospitalares causadas por esses microrganismos.<sup>20,21</sup> Por isso, acreditamos que é importante monitorar “in vitro” a susceptibilidade destes patógenos hospitalares aos antissépticos, principalmente em hospitais onde eles são endêmicos, para entender o real significado deste problema.

Vários pesquisadores têm investigado a atividade antibacteriana de antissépticos contra isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* utilizando diferentes métodos de estudo, como por exemplo, a determinação da concentração inibitória mínima e testes de suspensão, como por exemplo, aquele descrito na Norma Européia 1040.<sup>19,21-25</sup> Entretanto, em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado em nosso meio abordando a atividade bactericida dos principais produtos usados na higienização das mãos em isolados hospitalares multirresistentes de *A. baumannii*, utilizando o teste de suspensão descrito na Norma Européia 13727.<sup>12</sup>

O fundamento do teste de suspensão quantitativo descrito na Norma Européia 13727<sup>12</sup> é avaliar a atividade bactericida do produto na presença de substâncias orgânicas (e.g., proteína, sangue) que podem interferir na sua atividade antimicrobiana. Os resultados do nosso estudo mostraram que todos os clones hospitalares de *A. baumannii* multirresistentes

aos antibióticos, foram mortos pelos antissépticos comumente usados para a higiene das mãos na prática hospitalar. Esse achado demonstra que a higiene das mãos, quando executada no momento indicado, com a técnica correta e com produtos nas concentrações de uso adequadas, deve ser efetiva na prevenção da transmissão cruzada de *A. baumannii* pelas mãos contaminadas dos profissionais de saúde, que é considerada a principal via de disseminação deste microrganismo nos hospitais.<sup>8,9,19</sup>

Apesar de não termos encontrado em nosso estudo nenhum clone hospitalar de *A. baumannii*, multirresistente aos antibióticos, com reduzida susceptibilidade ou resistência aos antissépticos testados, é importante salientar que vários estudos têm reportado a existência de associação entre a resistência a antibióticos e aumento da susceptibilidade aos biocidas em outros patógenos hospitalares, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e *Enterococos* resistente a vancomicina.<sup>24,26-28</sup> Por isso, estudos como o nosso, aqui descrito, são importantes para monitorar a sensibilidade de *A. baumannii* aos antissépticos usados para a higiene das mãos e para surpreender um possível surgimento de cepas hospitalares de *A. baumannii* com reduzida susceptibilidade aos antissépticos.

Nos testes de suspensão, independente da metodologia empregada, é indispensável o uso de neutralizantes adequados para impedir um possível efeito residual dos produtos testados que pode inibir o crescimento do microrganismo testado no meio de cultivo, conhecido como efeito “carryover”. Com este propósito nós usamos uma mistura de neutralizantes, seguindo as recomendações da Norma Européia 13727<sup>12</sup>, que foi efetiva para todos os produtos ensaiados, especialmente para a clorexidina e povidona-iodo, produtos com reconhecido efeito residual. A mistura de neutralizantes foi eficiente e não mostrou efeito inibitório sobre os microrganismos testados.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Primeira, o reduzido número de isolados de *A. baumannii* investigados por hospital. Acreditamos que o estudo precisa ser ampliado,

testando-se um maior número de amostras de *A. baumannii* para torná-lo mais representativo. Segunda limitação, apesar do período de estudo não ser o mesmo nos três hospitais envolvidos na pesquisa, acreditamos que este fato não teve influência na tendência dos resultados encontrados.

Em resumo, os resultados do presente estudo mostraram que todos os clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*, multirresistentes aos antibióticos, foram mortos pelos antissépticos comumente usados na prática hospitalar, sugerindo que higiene das mãos com preparações alcoólicas (e.g., álcool gel) ou antissépticos-detergentes (e.g., clorexidina, povidona-iodo) deve ser efetiva na prevenção da disseminação de *A. baumannii* nos hospitais. Não foi encontrada associação entre a resistência aos antibióticos e a reduzida susceptibilidade aos antissépticos nos diferentes clones hospitalares de *A. baumannii* investigados no presente estudo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado (ECB) durante a realização do presente estudo.

Ao Programa de Auxílio à Pesquisa (PROAP) da CAPES pelo apoio financeiro parcial do projeto.

## REFERÊNCIAS

1. Boyce JM, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol* 2002; **23** (Suppl. 12): S3-S40.
2. Ministério da Saúde (Brasil), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segurança do paciente – Higienização das mãos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.109p.
3. World Health Organization. WHO guidelines on hand hygiene in health care. First global patient safety challenge: clean care is safe care. Geneva: WHO, 2009. 270p.
4. Bergogne-Bérézin E, Joly-Guillou ML. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *J. Hosp. Infect* 1991; **18**,(Suppl. A.): 250-255.
5. Bergogne-Bérézin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin.Microbiol.Rev* 1996;**9**: 148-165.
6. Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection. *N. Engl. J. Med* 2008; **358**: 1271-1281.
7. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin. Infect. Dis* 2011 **52** (9): 1138-114.
8. Saalfeld SMS, Viana GF, Siqueira VLD, Cardoso CL, Garcia LB; Tognim MCB. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive-care unit. *J. Hosp. Infect* 2009, **72** (4): 365-368.
9. Silva SRB, Rosa NM, Wingeter MA, Pinto NB, Tognim MCB, Garcia LB, Cardoso CL. Hand contamination during hospital patient care. *Int. J. Infect. Dis* 2012, **16** (8): 641-642.
10. Silva SRB, Verga LM, Garcia DB, Nascimento WM, Garcia LB, Tognim MCB, Cardoso CL. Eficácia do sabão e antissépticos na higiene das mãos contaminadas com *Acinetobacter baumannii* multirresistente e endêmico em um hospital ensino. Tema Livre Oral No. 3435 apresentado ao “XIV Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar”. Curitiba, PR, Brasil. Período: 19-22 de Novembro de 2014. *J. Infect. Control*, 2014, **3** (4): 194.
11. Harbarth S, Soh ST, Horner C, Wilcox MH. Is reduced susceptibility to disinfectants and antiseptics a risk in healthcare settings? A point/counterpoint review. *J. Hosp. Infect* 2014, **87**: 194-202.
12. European Standard EN 13727:2012+A2:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity in the medical area – Test method and requirements (phase 2, step 1). Brussels: European Committee for Standardization, 2015.
13. Silbert S, Pfaller MA, Holli RJ, Barth AL, Sader HS. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. *Infect. Control Hosp. Epidemiol* 2004, **25**: 847-851.
14. Bouvet PJ, Grimont PA. Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol* 1987; **138** (5): 569-578.
15. MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 2000. p, 825-826.

16. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Document M7-A6, vol. 23, No.2, 2015.
17. Bier O. Microbiologia e Imunologia. 23<sup>a</sup> ed., Melhoramentos: São Paulo; 1985. p. 930-931, 983-985.
18. Wong D., et al. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clin. Microbiol Ver* 2017, **30**: 409–447.
19. Martró E., et al. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *J. Hosp. Infect* 2003; **55**: 39-46.
20. Russell AD, Tattawasart U, Maillard JY, et al. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2151.
21. Wisplinghoff H, Schmitt R, Wöhrmann A, Stefanik D, Seifert H. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Hosp. Infect* 2007; **66**: 174-181.
22. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2008; **61**: 568–576.
23. Kawamura-Sato K, Wachino J, Kondo T, Ito H, Arakawa Y. Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1975–1983.
24. Ekizoglu M, Sagiroglu M, Kiliç E, Haşçelik AG. An investigation of the bactericidal activity of chlorhexidine digluconate against multidrug-resistant hospital isolates. *Turk J Med Sci* 2016; **46**: 903-909.
25. Hayashi M. *et al.* Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. *Journal of Hospital Infection* 2017; **95**: 318-323.
26. Suller MT, Russell AD. Antibiotic and biocide resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Hosp Infect* 1999; **43**: 281–291.
27. Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, et al. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a residual concentration. *J Hosp Infect* 2000; **46**: 297-303.
28. Batra R, Cooper BS, Whiteley C, Patel AK, Wyncoll D, Edgeworth JD. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010; **50**: 210-217.

### **CAPÍTULO III– Conclusões e Perspectivas Futuras**

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo mostraram que todos os clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*, multirresistentes aos antibióticos, foram mortos pelos antissépticos comumente usados para a higiene das mãos na prática hospitalar.

Os resultados também sugerem que a higiene das mãos com preparações alcoólicas (e.g., álcool etílico, álcool gel) ou antissépticos-detergentes (e.g., clorexidina, povidona-iodo) deve ser efetiva na prevenção da disseminação de *A. baumannii* nos hospitais.

Não foi encontrada associação entre a resistência aos antibióticos e a reduzida susceptibilidade aos antissépticos nos diferentes clones hospitalares de *A. baumannii*, multirresistentes aos antibióticos, investigados no presente estudo.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Acreditamos que estudos como este são necessários para monitorar clones hospitalares de *Acinetobacter baumannii*, multirresistentes aos antibióticos, com objetivo de surpreender o surgimento nestes microrganismos de uma possível resistência cruzada entre antibióticos e antissépticos, a exemplo do que já foi constatado em outros patógenos hospitalares.