

SIMONE SILVA IAMIN CHEQUER

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E BIOCIDAS EM BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE PACIENTES E AMBIENTE HOSPITALARES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

SIMONE SILVA IAMIN CHEQUER

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E BIOCIDAS EM BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE PACIENTES E AMBIENTE HOSPITALARES

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

APROVADA EM: 25 de agosto de 2003.

---

Prof. Jose Mario da Silveira Mezencio  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos

---

Prof<sup>a</sup> Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

---

Dr<sup>a</sup> Virgínia Maria Chaves Alves

---

Prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

Ao Rodrigo, meu marido, por ser  
companheiro, amigo e por estar sempre  
presente em minha vida.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela oportunidade e pela orientação.

Aos professores conselheiros, Nélio José de Andrade e Jose Mario da Silveira Mezencio, pelo incentivo e pelo apoio.

Ao Dr. Rovilson Lara, médico da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, pelo apoio e pelo empenho na obtenção dos isolados, além da disponibilidade em responder às dúvidas de Medicina e do entusiasmo pelo assunto.

A Fernandes, bioquímico, por ceder gentilmente os isolados de espécimes clínicos.

Ao professor Jorge Macedo, pelo apoio e pela confiança em mim depositada.

Às professoras Flávia e Maria Aparecida e à Dr<sup>a</sup> Virgínia, pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

À Degussa, representada por Fernanda Furlan, pela doação da amostra de Digluconato de clorhexidina, usada neste trabalho.

À ISP corporações, representada por Marcos Viana, pelo fornecimento da amostra de PVP-I, usada neste trabalho.

À Fernanda, pela amizade sincera, pelo apoio e por vibrarmos juntas, a cada etapa vencida.

A Patrícia e Cida, pela amizade conquistada, pelo apoio e pelos momentos alegres e descontraídos.

A todos os colegas do laboratório de Microbiologia Industrial, pelo convívio harmonioso.

A Zezinho, pelo apoio nas leituras da MIC.

A Leo e Alessandra, por ajudar-me a finalizar a MIC, num momento tão importante.

A Manoela e Silvia, estagiárias, pela dedicação, pela seriedade e pelo compromisso com o trabalho.

Às amigas Gal e Mara Denise, pelo apoio.

Ao amigo Renatinho, por estar sempre disposto a ajudar-me com alegria e dedicação.

Ao professor Marcos Totola e à Cassia, pela dedicação na identificação dos isolados.

À Cláudia, do laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio e pelo incentivo.

A Newton, bioquímico, pela orientação na escolha dos antimicrobianos utilizados.

Ao laboratório de proteínas, pelo auxílio.

A Danilo, Evandro e Toninho, pelo convívio, pelas brincadeiras, pelo respeito e por atenderem a meus pedidos, quase sempre com urgência.

A Nilcéia, Laura e Aparecida, sempre dispostas a ajudar-me.

À Márcia, pela amizade e pelo incentivo.

À Valéria Minim, pelos conselhos.

À professora Míriam, pelo convívio, pelas brincadeiras e pelo apoio.

À Rita Maria, companheira de alguns trabalhos, pelo apoio e pelo incentivo.

A meus familiares, pelo carinho e por impulsionar-me a vencer.

A Graziela e Helzi, pelo carinho, pela amizade e pelo incentivo.

A Rodrigo, meu marido, por compreender o meu cansaço, meu nervosismo, minha ausência nos finais de semana; por perder noites de sono levando-me e buscando-me no laboratório; e, sobretudo, pelo carinho e pelo amor.

A Lucca, nosso filho, que está por vir, por proporcionar-me uma gravidez tranqüila, permitindo-me concluir este trabalho em tempo hábil.

A Deus, pela saúde.

## **BIOGRAFIA**

SIMONE SILVA IAMIN CHEQUER, filha de José Zaharãm lamin e Maria da Conceição Silva lamin, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 10 de agosto de 1972.

Em Março de 1994, ingressou na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais e, em dezembro de 1997, graduou-se em Economia Doméstica.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia da UFV.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1. Bactérias isoladas de espécimes clínicos .....	11
3.2. Isolamento de bactérias do ambiente hospitalar .....	11
3.3. Identificação das bactérias isoladas .....	13
3.4. Resistência aos antimicrobianos .....	14
3.5. Resistência ao Digluconato de Clorhexidina e ao Polivinilpirrolidona-iodo .....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1. Isolamento e identificação .....	17
4.2. Resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter         baumannii</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas de ambientes e pacientes hospitalares, a antimicrobianos .....	19



	Página
4.3. Resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas de ambientes e pacientes hospitalares, ao Digluconato de Clorhexidina e ao Polivinilpirrolidona-iodo.....	29
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## RESUMO

CHEQUER, Simone Silva Iamin, Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Resistência a antimicrobianos e biocidas em bactérias isoladas de pacientes e ambiente hospitalares.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Jose Mario da Silveira Mezencio e Nélio José de Andrade.

Bactérias Gram positivas e Gram negativas foram isoladas de pele de pacientes, de espécimes clínicos e do ambiente de um Centro de Terapia Intensiva hospitalar com o objetivo de estudar sua resistência a agentes biocidas e outros antimicrobianos. Dos trinta e oito isolados do ambiente, treze foram identificados como *Staphylococcus* sp.; sete como *S. aureus*; dez como *Acinetobacter* sp.; um como *Acinetobacter baumannii*; e sete como *Pseudomonas aeruginosa*. Na pele de pacientes, dos dezessete isolados, encontraram-se sete de *P. aeruginosa*; cinco de *Staphylococcus* sp.; quatro de *Escherichia coli*; e um de *S. aureus*. Entre os dez isolados dos espécimes clínicos, três foram identificados como *P. aeruginosa*; três como *Staphylococcus* sp.; dois como *A. baumannii*; um como *Acinetobacter* sp.; e um como *Stenotrophomonas altophila*. A resistência a cinco ou a mais antimicrobianos foi freqüente na maioria dos isolados de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os isolados de *P. aeruginosa*, provenientes da pele de pacientes, apresentaram-se mais multirresistentes quando comparados à linhagem-tipo, e

houve prevalência de resistência à tetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e a perfloxacina. Houve prevalência de sensibilidade a imipenem, ciprofloxacina, norfloxacina, ceftazidima e a amicacina. Os três isolados de *A. baumannii* apresentaram sensibilidade a imipenem e resistência a norfloxacina, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, amicacina, gentamicina, perfloxacina, tetraciclina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e ciprofloxacina. Destes, dois isolados foram sensíveis à fosfomicina. Todos os oito isolados identificados como *S. aureus* apresentaram sensibilidade a fosfomicina; seis a amicacina; e cinco a tetraciclina, ciprofloxacina e vancomicina. Todos foram resistentes à penicilina; sete a norfloxacina, eritromicina, gentamicina, oxacilina e cefoxitina; seis a clindamicina e ticarcilina/ácido clavulânico; e cinco, a cefalotina. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) do digluconato de clorhexidina indicam maior suscetibilidade da espécie *S. aureus*, quando comparada com *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Houve diferença de resistência entre os isolados de diferentes origens, principalmente entre os identificados como *P. aeruginosa*. Isolados de *A. baumannii* apresentaram MICs, para polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I), pelo menos duas vezes maiores que a linhagem de referência. MICs de PVP-I em *P. aeruginosa* e *S. aureus* não foram muito superiores aos encontrados nas respectivas linhagens-tipo. Não houve correlação entre a resistência aos antimicrobianos e aos biocidas.

## ABSTRACT

CHEQUER, Simone Silva Iamin, Universidade Federal de Viçosa, August, 2003. **Antimicrobial and biocide resistance in bacteria isolated from hospital patients and environment.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee members: Jose Mario da Silveira Mezencio e Nélio José de Andrade.

Gram-positive and Gram-negative bacteria were isolated from patients skin surfaces, clinical samples, and the environment in an intensive care unit at a hospital in order to determine their resistance to and other biocides antimicrobial agents. Among the thirty eight environmental isolates, thirteen were identified as *Staphylococcus* sp; seven were *S. aureus*; ten were *Acinetobacter* sp.; one *Acinetobacter baumannii*, and seven *Pseudomonas aeruginosa*. From patients skin surfaces were isolated seven strains of *P. aeruginosa*, five *Staphylococcus* sp, two *A. baumannii*, one *Acinetobacter* sp and one *Stenotrophomonas altophila*. Resistance to five or more antibiotics was found in most isolates identified as *P. aeruginosa* and *S. aureus*. When compared to the type-strain, isolates of *P. aeruginosa* were more multiresistant, prevailing resistance to tetracycline, chloranphenicol, sulfamethoxazol/trimetropin, and perfloxacin. Sensitivity to imipenem, ciprofloxacin, norfloxacin, and ceftazidime prevailed in most isolates of this species. All *A. baumannii* isolates were sensitive to imipenem and resistant to

the other antibiotics tested. All the *S. aureus* isolates were resistant to penicillin, seven were resistant to norfloxacin, erythromycin, gentamycin, oxacillin, cefoxitin; six were resistant to clindamycin, ticarcillin/clavulanic acid, and five to cefalotin. Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) for chlorhexidine digluconate showed that *S.aureus* is more sensitive to this biocide as compared to *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Differences in resistance could be noticed among isolates of distinct origins, mainly among *P. aeruginosa* isolates. MICs for PVP-I for *A. baumannii* were at least twice as large as that for the type-strain. MICs for PVP-I for *P. aeruginosa* and *S. aureus* were not very different from those for the respective type-strains. There was no correlation between resistance to biocides and resistance to antibiotics.

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares constituem grave problema de saúde pública, visto que provocam importantes impactos na atividade social e econômica, e estão relacionadas com morbidade e mortalidade em geral.

No Brasil, o problema da infecção foi reconhecido pelo Estado em 1983, mediante portaria 196, do Ministério da Saúde, que tornou obrigatória a implantação de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em todos os hospitais.

Os agentes etiológicos das infecções hospitalares são, na maioria, de natureza bacteriana, mas tem sido crescente o relato de participação de agentes de natureza viral e fúngica.

Resistência bacteriana a antibióticos é um fenômeno bem documentado e os mecanismos de resistência são geralmente bem descritos, entretanto, resistência bacteriana a biocidas foi descrita mais recentemente. A possível ligação de resistência de bactérias a biocida e a antibióticos tem sido relatada por vários autores.

Estratégias para controle e prevenção de infecção incluem o uso de biocidas na forma de anti-sépticos e desinfetantes. Os anti-sépticos mais utilizados na maioria dos hospitais são digluconato de clorhexidina (CHG), álcool etílico 70% e polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I), considerados, pela portaria 930/92 do Ministério da Saúde, como adequados a este fim.

Novos conservantes e desinfetantes são introduzidos no mercado, cada vez com menor frequência, o que aumenta os problemas relativos ao desenvolvimento de resistência a agentes antimicrobianos. As poucas opções limitam a possibilidade de rotatividade de produtos e favorecem, possivelmente, o desenvolvimento de populações resistentes. Desse modo, é importante entender todos os aspectos da interação entre biocidas e microrganismos, particularmente os seus mecanismos de ação e o desenvolvimento de resistência.

Este trabalho objetivou isolar, de ambiente e pacientes hospitalares, bactérias relacionadas com episódios de infecção hospitalar; identificar esses isolados; verificar seus modelos de resistência aos antimicrobianos usados como drogas terapêuticas; e, finalmente, verificar seus perfis de resistência a CHG e PVP-I.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a descoberta da penicilina em 1929, centenas de agentes antimicrobianos foram desenvolvidos e utilizados em terapia, o que reduziu a morbidade e a mortalidade associadas a numerosas doenças infecciosas. O uso também resultou no aumento da incidência de bactérias resistentes a antibióticos (WHITE et al., 2001), levando ao aumento da prevalência de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ANVISA, 2000). O surgimento da resistência foi primeiro observado em hospitais, onde os agentes antimicrobianos são usados e, posteriormente, entre isolados da comunidade (WHITE et al., 2001).

Estudo realizado pelo coordenador da CCIH de um hospital de médio porte, onde parte deste trabalho foi realizada, mostra a frequência de isolados, de espécimes clínicos, causadores de infecção hospitalar (Quadro 1).

Hospitais representam um nicho ecológico natural para organismos resistentes. O uso intenso de antibióticos provê ambiente onde esses organismos podem prosperar, sem dificuldade de competição com os organismos suscetíveis. Hospitais são ambientes complexos que abrigam a microbiota intestinal e da pele, a nasal e a oral de pacientes, visitantes e assistentes, além de numerosos nichos ambientais, que vão desde a água e o esgoto até equipamentos (WILSON et al., 1997). O papel de carreadores (assistentes, visitantes e, ou, acompanhantes) é bastante documentado em surtos hospitalares com *Staphylococcus aureus*, resistente à metilina, MRSA (COX et al., 1995).



Quadro 1 – Frequência de isolados no Centro de Terapia Intensiva, no período de janeiro de 2001 a setembro de 2002

Isolado	Infecção comunitária		Infecção hospitalar		Total
	Nº	%	Nº	%	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0.00	16	15.53	16
<i>Acinetobacter</i> sp.	0	0.00	2	1.94	2
<i>Aeromonas</i> sp.	1	3.33	1	0.97	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0.00	1	0.97	1
<i>Candida albicans</i>	1	3.33	1	0.97	2
<i>Candida</i> sp.	1	3.33	3	2.91	4
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3.33	1	0.97	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0.00	1	0.97	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3.33	3	2.91	4
<i>Enterobacter</i> sp.	1	3.33	1	0.97	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	3.33	4	3.88	5
<i>Escherichia coli</i>	2	6.67	9	8.74	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	23.33	8	7.77	15
<i>Klebsiella</i> sp.	1	3.33	0	0.00	1
<i>Proteus mirabilis</i>	2	6.67	6	5.83	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	13.33	27	26.21	31
<i>Serratia marcescens</i>	0	0.00	1	0.97	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	6.67	17	16.5	19
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	10.00	1	0.97	4
<i>Streptococcus alfa-hemolítico</i>	1	3.33	0	0.00	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	3.33	0	0.00	1

Igualmente, organismos resistentes podem vir da comunidade. Tem sido evidenciado aumento de pacientes, em cuidados domiciliares, colonizados com MRSA, organismos que têm sido isolados de pacientes da comunidade com infecção e sem histórico de hospitalização (HEROLD et al., 1998). O impacto causado por esses organismos resistentes em hospitais pode ser significativo. Pacientes colonizados, antes de serem admitidos, constituem fonte de contaminação (HOSEIN et al., 2002).

Enquanto biocidas desempenham importante papel na limitação de fontes potenciais de infecção e ainda parecem ser efetivos, há consenso de que o aumento do uso de biocidas na comunidade acarreta o desenvolvimento da resistência, assim como o potencial para resistência cruzada a antibióticos de uso clínico (LEVY, 2000).

Durante as últimas décadas, houve considerável aumento nas infecções adquiridas em hospitais, causadas por bactérias multiresistentes. Como resultado, o risco de contaminação microbiana e de infecção tem levado ao aumento do uso de desinfetantes e anti-sépticos (McDONNELL e RUSSELL, 1999). Em surtos hospitalares, a disseminação de patógenos resistentes a antibióticos no ambiente tem sido demonstrada (LYYTIKAINEN et al., 1995). Os patógenos nosocomiais, isolados de ambiente hospitalar, têm se mostrado particularmente resistentes aos antibióticos (KÖLJALG et al., 1999; GILLESPIE et al., 2000).

Bactérias do ambiente podem estar envolvidas na transmissão de infecção (DANCER, 1999), sendo difícil distinguir a transmissão direta de paciente para paciente daquela via ambiente (TALON, 1999).

Geralmente, as investigações são limitadas a espécimes oriundos de pacientes com suspeita de infecção, exceto quando problemas de infecção cruzada são encontrados (HOSEIN et al., 2002).

As bactérias do ambiente hospitalar possuem características peculiares que permitem a sua permanência e disseminação, como, por exemplo, resistência à ação de muitos antibióticos e de anti-sépticos. Podem ser veiculadas pelas mãos ou por meios líquidos e algumas agem como oportunistas, visto que são bem adaptadas para colonizar pacientes e causar infecções. Entre as bactérias, algumas são comuns à maioria dos hospitais, como *S. aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* (LEVY, 2000).

Biocidas usados como anti-sépticos e, ou, desinfetantes são importantes para alcançar níveis apropriados de desinfecção de superfícies e materiais, especialmente em ambiente hospitalar (MAILLARD, 2002).

Tendo em vista o grave problema das infecções hospitalares no Brasil, o Ministério da Saúde considerou, mediante Portaria nº 930/92, os seguintes princípios ativos adequados aos anti-sépticos: clorhexidina (biguanida); solução alcoólica (álcool etílico e isopropílico); solução iodada (iodo em álcool 70%); iodóforo (polivinilpirrolidona-iodo); solução aquosa de permanganato de potássio e solução aquosa à base de sais de prata (ANVISA, 2000).

Em contraste com os agentes quimioterápicos, biocidas têm múltiplos alvos na célula microbiana, e os danos causados resultam no efeito bactericida (MAILLARD, 2002). Os antibióticos atuam na inibição da síntese de peptidoglicano ( $\beta$ -lactâmicos e glicopeptídeos), de proteínas (tetraciclina, cloranfenicol, mupirocina, macrolídeos), além de inibir RNA polimerase (rifamicina) ou DNA girase (quinolonas) (ZHENG e YOUNG, 1993). No entanto, os biocidas podem interagir com a parede celular ou com o envelope (glutaraldeído), produzir mudanças na integridade da membrana citoplasmática (agentes catiônicos), dissipar força próton-motora (ácidos orgânicos e ésteres), inibir enzimas de membrana (substâncias que interagem com grupos tiol) e ainda agir como quelante (óxido etileno) e interquelante (acridina) (DENYER e STEWART, 1998).

A atividade dos biocidas varia grandemente entre os diferentes tipos de microrganismos. Entre as bactérias vegetativas, as micobactérias são provavelmente as mais resistentes à desinfecção, seguidas pelas Gram-negativas e Gram-positivas (MAILLARD, 2002). Essa classificação baseia-se na diferença de permeabilidade, ou não, dos microrganismos ao agente ativo (DENYER e MAILLARD, 2002). Em relação à suscetibilidade a biocidas, a estrutura e a composição do envelope externo diferem entre microrganismos. A membrana externa de bactérias Gram-negativas (NIKAIDO e VAARA 1985; GILBERT et al., 1990) e a parede celular de micobactérias (TRIAS e BENZ, 1994) atuam na permeabilidade e são responsáveis pela resistência intrínseca desses microrganismos a componentes antimicrobianos (MAILLARD, 2002). A membrana citoplasmática é composta, essencialmente, de uma bicamada de fosfolípido permeada com proteínas; é semipermeável e regula a transferência de solutos e metabólitos dentro e fora do citoplasma celular (Singer e Nicholson, 1972; Salton e Owen 1976, citados por MAILLARD 2002). A membrana citoplasmática é considerada o principal alvo dos biocidas (MAILLARD, 2002).

Um dos efeitos da interação dos biocidas com a célula bacteriana é a mudança na hidrofobicidade celular. Por exemplo, tem sido observado que a hidrofobicidade de bactérias Gram-negativas altera quando estas são tratadas com compostos catiônicos, como clorhexidina (EL-FALAHA et al., 1985; FITZGERALD et al., 1992).

O modo de ação da clorhexidina é, particularmente, bem documentado. Atua principalmente em membrana celular de bactérias, causando perda do material intracelular, inibição da respiração e desnaturação de proteínas citoplasmáticas (DENYER, 1995; DENYER e STEWART, 1998).

Os biguanidas têm alta afinidade com fosfolipídios ácidos, como fosfatidil glicerol ou difosfatidil glicerol, induzindo a zonas de desestabilização e destruição da membrana plasmática. Nas bactérias Gram-negativas, a membrana externa pode representar uma barreira de proteção (WOODCOCK, 1988).

Outro anti-séptico de importância hospitalar é o iodo. Embora soluções de iodo alcoólico ou aquoso tenham sido usadas, por muitos anos, como anti-sépticos, apresentam restrições de uso, devido ao fato de serem associadas à irritação da pele dos manipuladores (Mc DONNELL e RUSSELL, 1999). Esse problema foi superado com o desenvolvimento de formulações conhecidas como iodóforo, complexo de iodo em agente solubilizante ou carreador que atua como reservatório de iodo ativo (GOTTARDI, 1991). O modo exato de ação do iodo não é bem conhecido. Provavelmente, existam três mecanismos de ação do iodo. Ele penetra na parede celular das bactérias e combina com o aminoácido tirosina, formando o diiodotirosina; provavelmente, reage com outros constituintes da célula como nucleotídeos, culminando em morte celular. A oxidação do grupo SH do aminoácido cisteína, que impede a formação de pontes S-S, parece ser o modo de ação mais importante deste anti-séptico (GOTTARDI, 1991).

Bactérias são, muitas vezes, capazes de sobreviver na presença dos agentes antimicrobianos. Algumas apresentam resistência intrínseca (DAVIES, 1997), como a encontrada em esporos bacterianos, em micobactéria e em alguns tipos de bactérias Gram-negativas (TATTAWASART et al., 1999).

Outras populações, normalmente suscetíveis, podem adquirir resistência por mutações (DAVIES, 1997), por aquisição de genes de resistência, por meio de plasmídeos ou de transposons, ou ainda pela combinação de ambos os mecanismos (TATTAWASART et al., 1999).

Os mecanismos de resistência a antibióticos são bem elucidados. Essencialmente, envolvem a redução no transporte de antibiótico (impermeabilidade ou efluxo), degradação ou modificação da droga por ataque

de enzimas e modificação do sítio-alvo (RUSSEL e CHOPRA, 1996; CHOPRA, 1998; RUSSELL, 1998).

Resistência a biocidas é menos comum e parece refletir a multiplicidade de alvos dentro da célula. A resistência tipicamente resulta de mudanças celulares que levam ao acúmulo de biocidas, incluindo alterações no envelope celular que limitam o transporte, ou expressão de sistemas de efluxo. Mutações do sítio-alvo, embora raras, são relatadas (POOLE, 2002).

Sistemas de efluxo relacionados com resistência a biocidas caracterizam-se por uma gama de substratos que acomodam uma variedade de agentes não-relacionados estruturalmente, nos quais podem incluir os antibióticos (PAULSEN et al., 1996; NIKAIDO, 1998).

De acordo com PAULSEN et al. (1996), *P. aeruginosa* possui sistema de efluxo que expulsa drogas com potencial para danificar a célula. A presença de resistência a multidrogas, que conferem resistência a antibióticos, anti-sépticos, desinfetantes e conservantes, é bem documentada em *S. aureus* (LITTLEJOHN et al., 1992; PAULSEN et al., 1996; HEIR et al., 1999; MUNOZ-BELLIDO et al., 1999). Maior atenção é dada aos sistemas de efluxo em bactérias Gram-negativas, mas esses parecem conferir resistência mais a antibióticos que a biocidas (POOLE et al., 1993; PAULSEN et al., 1996; MASUDA et al., 1999; ZIHA-ZARIFI et al., 1999).

Assim como o sistema de efluxo em *S. aureus* possui uma gama de substratos, é possível também que pelo menos um dos vários sistemas conhecidos de *P. aeruginosa* possa conferir-lhe resistência simultânea a biocidas e a antibióticos (THOMAS et al., 2000).

Em *S. aureus*, as proteínas QacA/B e Smr, cujos genes estão localizados em plasmídeos, são relatadas como exportadoras de biocidas. Esses genes são comuns em isolados clínicos de *S. aureus* (LEELAPORN et al., 1994).

Sistemas de efluxo capazes de acomodar biocidas em bactérias Gram-negativas são similarmente transportadores de multidrogas. Nestes incluem QacE e QacE $\Delta$ 1, inicialmente identificados em *Klebsiella pneumoniae*, mas presentes em outras bactérias Gram-negativas (PAULSEN et al., 1996). Em *P. aeruginosa*, os sistemas de efluxo conhecidos incluem as proteínas MexAB-

OprM, MexCD-OpRJ e MexEF-OprN, cujos genes residem no cromossoma (CHUANCHUEN et al., 2001).

O desenvolvimento da resistência a desinfetantes e conservantes não é um fenômeno novo. Em 1952, CHAPLIN isolou linhagens resistentes a compostos quaternários de amônio (in CHAPMAN, 1998).

A correlação entre resistência a biocidas e a antibióticos também tem sido demonstrada. Linhagens de MRSA mostraram ser menos suscetíveis à clorhexidina e aos compostos quaternários de amônio (QAC), do que linhagens de *Staphylococcus aureus*, sensíveis à metilicina – MSSA (IRIZARRY et al., 1996, SULLER e RUSSELL, 1999). Em contraste, MRSA e MSSA foram igualmente sensíveis à clorhexidina e ao PVP-I (McDONNELL e RUSSELL, 1999; BARRY et al., 1999).

Resistência cruzada entre clorhexidina e vários antibióticos, tais como  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, foi demonstrada (KÖLJALG et al., 2002). Observou-se resistência cruzada também em *Pseudomonas stutzeri*, envolvendo clorhexidina e vários antibióticos (RUSSELL et al., 1998; e TATTAWASART et al., 1999).

Resistência à clorhexidina e a cinco tipos de antibióticos foi encontrada em linhagens de *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Providencia stuartii* e *Serratia marscences*, isoladas do trato urinário de pacientes submetidos à cateterização por longo período de tempo. O uso difundido de clorhexidina parece ter sido responsável pela seleção das linhagens resistentes aos antibióticos (Stickler et al., 1974, citados por RUSSEL et al., 1998).

Linhagens de *P. mirabilis*, resistentes à clorhexidina e a antibióticos, foram responsáveis por surto em hospital. Entretanto, não há evidência de ligação genética entre as resistências; a resistência foi considerada mais intrínseca que mediada por plasmídeos (DANCE et al., 1987).

Resistência à clorhexidina, mediada por plasmídeos, foi observada em *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, resistentes a antibióticos (LEELAPORN et al., 1994). O plasmídeo pSAJ1, segundo YAMAMOTO et al. (1988), confere resistência a antibióticos, bem como à clorhexidina, em MRSA.

Em *S. aureus*, resistência a biocidas catiônicos, tais como clorhexidina, compostos quaternários de amônia, acridinas e diamidinas, tem sido observada

(NIKAIDO, 1998) e tem sido atribuída ao sistema de efluxo multidroga, no qual os genes *qac A/B* são os mais importantes (ROUCH et al., 1990).

O desenvolvimento de resistência a outros biocidas, como iodofóro, também tem sido relatado em ambiente clínico, onde a formação de biofilme desempenha papel importante (GRAVEN et al., 1981).

Estratégias para controle e prevenção de infecção incluem o uso de biocidas na forma de anti-sépticos e desinfetantes. Porém, o entendimento da resistência aos antibióticos e aos biocidas pode levar a estratégias que venham controlar e corrigir os pontos passíveis de falha no controle de infecção hospitalar.

É evidente a necessidade de se detectarem, mais cedo, os possíveis mecanismos de resistência de bactérias, em ambiente hospitalar, aos biocidas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

#### **3.1. Bactérias isoladas de espécimes clínicos**

As bactérias aqui caracterizadas foram isoladas de diferentes espécimes clínicos, como urina, secreção do trato respiratório e escarro de pacientes submetidos à terapia intensiva, e do ambiente hospitalar. Os isolados de espécimes clínicos foram gentilmente cedidos por um laboratório clínico.

Além dos isolados, foram utilizadas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, como controle positivo.

#### **3.2. Isolamento de bactérias do ambiente hospitalar**

O isolamento de bactérias do ambiente hospitalar foi realizado no Centro de Terapia Intensiva (CTI). Foram selecionados grupos ou espécies relacionados com episódios de infecção hospitalar.

Para obtenção desses isolados foram escolhidos os aparelhos mais comumente utilizados pela equipe médica e auxiliar, incluindo o de medir



pressão arterial, o estetoscópio e o respirador, além do leito dos pacientes, especialmente a grade e o colchão.

A metodologia recomendada por VANDERZANT e SPLITTSTOESSER (1992) foi utilizada no isolamento dessas bactérias. No equipamento não-mensurável foi feito *swab* em toda a sua extensão, em três posições diferentes. Na superfície, o *swab* foi aplicado em quatro lugares diferentes, obedecendo-se à medida de 2cm por 25cm, e em três posições diferentes. De uma posição para outra, a cabeça do *swab* foi mergulhada em solução salina e retirado o excesso. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas, em baixa temperatura, em caixa de isopor com gelo e analisadas no período de 2 horas. No laboratório, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas, por espalhamento, em superfície em ágar seletivo Mac Conkey nº 3, marca Oxoid, para *A. baumannii* (KONEMAN et al.; MERCK 1996), ágar Mannitol (MERCK, 1996) para *S. aureus* e ágar Cetremida (MERCK, 1996) para *P. aeruginosa*. As placas, em duplicatas, foram incubadas a 37°C, por 18 a 20 horas (KONEMAN et al.; 1992, MERCK 1996).

As colônias características foram repicadas em estrias compostas nos respectivos meios de isolamento até a obtenção de culturas puras. Logo após, as culturas foram armazenadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), adicionado de 20% glicerol, e estocadas a 80°C negativos.

A filtração do ar no Centro de Terapia Intensiva foi avaliada. A metodologia recomendada por VANDERZANT e SPLITTSTOESSER (1992) foi utilizada no isolamento. As placas, em duplicatas, que continham os meios seletivos para cada isolado foram colocadas sobre o aparelho (air sampler, Merck) e filtrados 1000L de ar, por 10 minutos. Essas placas foram acondicionadas em caixa de isopor e transportadas para o laboratório, onde foram incubadas a 37°C, por 18 a 20 horas. As colônias características foram repicadas em estrias compostas nos seus respectivos meios, até a obtenção de cultura pura, e posteriormente cultivadas em caldo e estocadas, a 80°C negativos, em 20% glicerol.

Amostras de água que abastece o respirador e o umidificador foram também coletadas, e a metodologia recomendada por VANDERZANT e SPLITTSTOESSER (1992) foi utilizada no isolamento. Alíquotas de 0,1mL foram transferidas, por espalhamento, em superfície em ágar nutriente. As

placas, em duplicatas, foram incubadas a 37°C, por 18 a 20 horas. As colônias presentes foram repicadas em meios seletivos para cada isolado, seguindo o mesmo procedimento já citado.

### **3.3. Identificação das bactérias isoladas**

A identificação dos isolados foi feita no Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia do Meio Ambiente. Na identificação foi utilizado o sistema MIS (Microbial Identification System) versão 4.0, que é baseado na composição de metil ésteres de ácidos graxos. Com base na metodologia recomendada pelo MIS, estrias dos isolados foram feitas em Ágar Soja Triptona (TSA), para isolados do ambiente, e Ágar Soja Triptona, enriquecido com sangue, para os isolados de pacientes. A alça de repicagem foi flambada apenas do terceiro para o quarto quadrante, para verificar a pureza da cultura. As placas foram incubadas a 28°C e 35°C para isolados do ambiente e dos pacientes, respectivamente, por 24 horas. Após esse período, uma alça (equivalente a 0,04g de massa celular) de colônias foi transferida para um tubo onde 1mL do primeiro reagente (NaOH +Etanol) foi adicionado para ocorrer a lise da célula e, assim, a liberação dos ácidos graxos. Os tubos foram agitados (Vortex) por 10 segundos e colocados em banho-maria a 98°C, por 5 minutos. Após esse período, foram novamente agitados, por 10 segundos, e colocados em banho-maria a 100°C, por 25 minutos. Posteriormente, o segundo reagente (HCL +Metanol) foi adicionado, visando à metilação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES). Os tubos foram agitados, por 5 segundos, e colocados em banho-maria a 80°C, por 10 minutos. Em seguida, o terceiro reagente (Hexano + metil tert-butil éter - MTBE) foi adicionado, permanecendo em contato por 10 minutos; em seguida, a fase aquosa foi removida com auxílio de uma pipeta Pasteur. Finalmente, o quarto reagente (NaOH) foi colocado em contato com a fase orgânica, por 5 minutos, para remover os ácidos graxos livres e resíduos de reagentes do extrato orgânico. Este extrato foi transferido para outro tubo e realizada a análise em cromatografia gasosa, por intermédio do Software Sherlock<sup>®</sup>. O perfil de ácido graxo foi então comparado a uma biblioteca de referência, armazenada em base de dados, para determinar e identificar o microrganismo desconhecido.

### **3.4. Resistência aos antimicrobianos**

Os testes de resistência aos antimicrobianos foram feitos pelo método de difusão de disco Kirby-Bauer (BAUER et al., 1965). A escolha dos antimicrobianos foi baseada nos quimioterápicos utilizados na medicina humana (Quadro 2).

Os isolados foram reativados em caldo BHI, da marca Oxoid, a 37°C, por 18 horas. Após esse período, a suspensão foi padronizada para densidade ótica 0,4 em comprimento de onda ( $\lambda$ ) 630nm, em espectrofotômetro (Spectrome 20D, Milton Roy), o que corresponde às concentrações de  $10^8$  UFC/mL para bactérias Gram-negativas e  $10^7$  UFC/mL para *S. aureus*, as quais foram verificadas anteriormente pela metodologia de plaqueamento em superfície. O padrão para leitura no espectrofotômetro foi o caldo BHI (Oxoid).

Após padronização, as culturas foram espalhadas, uniformemente, com swabs estéreis nas superfícies das placas de Petri de 150mm, nas quais havia 42 mL de Ágar Mueller Hinton, da marca Oxoid. As placas foram secas por dois minutos, e, com auxílio de uma pinça, os discos de antimicrobianos, da marca Cecon, foram colocados em posições equidistantes nas placas de Petri, que foram incubadas imediatamente a 35°C, por 18 horas. As placas com os antibióticos oxacilina e vancomicina foram incubadas por 24 horas. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos; calcularam-se suas médias nas placas em duplicatas; e foi usado, como referência, o padrão NCCLS (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000).

### **3.5. Resistência ao Digluconato de Clorhexidina e ao Polivinilpirrolidona-iodo**

A resistência dos isolados foi caracterizada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima, utilizando-se a metodologia padronizada no laboratório de Microbiologia Industrial (MOREIRA, 2002).

As culturas congeladas a - 80°C, em glicerol 20%, foram reativadas em caldo BHI (Oxoid) e incubadas a 37°C, durante 14 horas. Posteriormente, a suspensão foi padronizada na D.O. 0,4, conforme já descrito. Ao atingirem a D.O. 0,4, as culturas foram centrifugadas, por 15 minutos, a 1912g 15°C, e o sobrenadante foi descartado. Novo meio foi adicionado, e as culturas diluídas em caldo BHI, para  $10^5$  UFC/mL.

Quadro 2 – Antimicrobianos utilizados, classes e concentrações

Classe de Antimicrobianos	Antimicrobianos	Conc./ Disco (µg)
Aminoglicosídeos	Amicacina (a,b,c)	30
	Gentamicina (a,b,c)	10
Beta-lactâmicos	Ceftriaxona (b,c)	30
	Ceftazidima (b,c)	30
	Cefotaxima (b,c)	30
	Imipenem (b,c)	10
	Cefalotina (a)	30
	Cefoxitina (a)	30
	Oxacilina (a)	5
	Penicilina G (a)	10 *
Cloranfenicol	Cloranfenicol (b,c)	30
Peptídicos	Vancomicina (a)	30
Fosfomicina	Fosfomicina (a,b,c)	200
Lincosamídeo	Clindamicina (a)	2
Macrolídeos	Claritomicina (a)	15
	Eritromicina (a)	15
Quinolonas	Ciprofloxacina (a,b,c)	5
	Norfloxacina (a,b,c)	10
	Perfloxacina (b,c)	5
Sulfa	Sulfametoxazol +Trimetoprim (a)	25
Tetraciclina	Tetraciclina (a,b,c)	30

a: *Staphylococcus aureus*; b: *Pseudomonas aeruginosa*; c: *Acinetobacter baumannii*.

\* correspondente a 10 U.I.

As placas de microtitulação (Nunc-Immuno Plates, Dinamarca<sup>®</sup>) foram previamente esterilizadas, por exposição à radiação UV, por 30 minutos e, em seguida, 230µl da cultura diluída foram adicionados aos orifícios da placa de microtitulação juntamente com os anti-sépticos, nas diferentes concentrações no total de 300 µl por orifício da placa. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata e foram feitos os controles de esterilidade e da curva padrão de crescimento.

Os anti-sépticos digluconato de clorhexidina (Degussa) e PVP-I (Isp incorporation) foram diluídos em água e filtrados em membrana MILLIPORE<sup>®</sup>.

O aparelho leitor de ELISA (Titerk multiscan<sup>®</sup>, Plus-MKII) foi utilizado no acompanhamento do crescimento dos isolados, com filtro de 560nm. As leituras foram realizadas em intervalos preestabelecidos, e a curva-padrão de crescimento foi construída com a média aritmética das triplicatas e plotada em programa MICROSOFT<sup>®</sup> EXCEL 2000. As curvas foram avaliadas, e a MIC foi estabelecida como a menor concentração do anti-séptico que impedia o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária do controle, que se constituía da bactéria cultivada em BHI sem o anti-séptico.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento e identificação

Foram obtidos e identificados 65 isolados, entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, de ambiente e de pacientes do Centro de Terapia Intensiva de um hospital. Dessas, 10 foram isoladas de espécimes clínicos cedidos por um laboratório; 17, de pele de pacientes; 25, do ambiente; 12, da água de umidificador e de respirador; e 1, do ar, isolados neste trabalho. Esses isolados pertencem às famílias *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Micrococcaceae* (*Staphylococcus*) e *Neisseriaceae* (*Acinetobacter*).

Os Quadros 3, 4 e 5 mostram a distribuição dos isolados, conforme a quantidade encontrada e o local de isolamento.

Cálculos baseados nas possíveis quantidades (unidades, dezenas ou centenas) de bactérias presentes nas placas de Petri permitiram estimar a quantidade de células presentes nos locais de isolamento. As bactérias estão presentes na água, aproximadamente  $10^2$  UFC por mililitro. A amostra de pele foi obtida, por *swab*, de axila ou de superfície de aproximadamente  $50\text{cm}^2$  na área próxima ao pescoço. Nesse caso, cada isolado representa, aproximadamente,  $10^3$  a  $10^4$  UFC por  $50\text{cm}^2$  nos locais de pele amostrados. Nas amostras do ambiente obteve-se o mesmo valor da amostra de pele.

Quadro 3 – Distribuição dos isolados de ambiente do Centro de Terapia Intensiva

Isolado	Aparelho de pressão	Leito	Estetoscópio	Respirador	Ar
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	2	1	0	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	3	1	0	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	9	0	2	1

Quadro 4 – Distribuição dos isolados da água do umidificador e respirador

Isolado	Umidificador	Respirador
<i>Acinetobacter</i> sp.	2	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	2

Quadro 5 – Distribuição dos isolados da pele de pacientes e de espécimes clínicos

Isolado	Pele	Espécimes clínicos
<i>Acinetobacter</i> sp.	0	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	2
<i>Escherichia coli</i>	4	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	3
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	1

Com exceção da água, não existem valores da quantidade de células permitidas nesses locais, os quais sirvam de referência. É desejável que bactérias patogênicas e oportunistas resistentes não estejam presentes nesses locais, pois podem representar risco de contaminação e infecção de pacientes.

Na água do umidificador e do respirador foram encontrados sete diferentes isolados de *P. aeruginosa*. A diferença entre estes pode ser constatada pelos modelos de resistência a antimicrobianos desses isolados, demonstrados no Quadro 7. *P. aeruginosa* está associada a infecções

respiratórias em pacientes hospitalares (LEVY, 2000). Sua presença em equipamentos usados para facilitar a respiração de pacientes é indesejável. Além de *P. aeruginosa*, foram encontrados na água dos equipamentos cinco isolados identificados como *Acinetobacter* sp., bactéria também indesejável, uma vez que essa água deve apresentar-se livre de microrganismos.

Considerando-se os isolados da pele e dos espécimes clínicos, *P. aeruginosa* foi o mais encontrado (10 isolados), seguido do gênero *Staphylococcus* (Quadro 5). Apenas 1 isolado foi identificado como *S. aureus*.

*S. aureus* é um patógeno oportunista que está presente na mucosa nasal, na pele e nos pêlos de 50% ou mais de indivíduos saudáveis. Pode também ser isolado do ar, da poeira, da água de esgoto, de equipamentos, de superfícies do ambiente e de alguns alimentos (LEVY, 2000). *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são também patógenos oportunistas que podem ser isolados da água, assim como de espécimes clínicos (LEVY, 2000).

As bactérias identificadas neste trabalho são comuns à maioria dos hospitais e são as principais responsáveis por infecção hospitalar no hospital onde tais bactérias foram isoladas, de acordo com um estudo feito pelo responsável pela CCIH (Quadro 1).

#### **4.2. Resistência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, isoladas de ambientes e pacientes hospitalares, a antimicrobianos**

Os Quadros 6, 7 e 8 mostram os modelos de resistência de 28 isolados a antimicrobianos, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. aureus*, provenientes de ambientes e de pacientes hospitalares.

Todos os isolados de *P. aeruginosa* (17) (Quadro 7) foram resistentes à tetraciclina; 94,12% (16), 70,59% (12) e 64,7% (11), a cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim e perfloxacina, respectivamente. Observou-se que não houve sensibilidade a esses antimicrobianos, porque os isolados não-resistentes apresentaram resultados de resistência intermediária a essas drogas. Nota-se que 82,4% (14/17) foram sensíveis a imipenem; 64,7% (11/17), a ciprofloxacina, norfloxacina, ceftazidima; e 58,82% (10/17), a ampicacina.



Quadro 6 – Modelo de resistência a antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada da água, de espécimes clínicos e de pele

20

ISOLADO	ANTIMICROBIANOS (µg/disco)												
	NOR 10	CLO 30	SUT 25	AMI 30	FOS 200	GEN 10	PEF 5	IPM 10	TET 30	CTX 30	CAZ 30	CRO 30	CIP 5
3H		R	R		R		R		R				
4H		R	R	R	R	R	I		R	R	I	R	
5H		I	I		I	R	R		R	R	R	R	
6H		I	R				R		R	I			
10H		R	R		R		I		R	I		R	
11H		I	R		I		I		R	I		I	
12H		R	R		I		I		R	R		I	
1PP		I	R		R	R	R		R	I			
29P		R	R		R		I		R	I		R	
30P		R	R		R		I		R	I		R	
39P		R	R		R		I		R	I		R	
4PP	R	I	R	R		R	R		R	I			R
5PP	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R
8PP	R	R	R	R	R	R	R		R	I			R
13PP	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R
14PP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
22PP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ATCC10145		I	R	I		R	R		R	R		I	

NOR: norfloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; AMI: amicacina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; PEF: perfloxacin; IPM: imipenem; TET: tetraciclina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; R: resistência; I: intermediário; espaço em branco: sensível; H: isolado da água; P: isolado de espécimes clínicos; PP: isolado de pele de paciente.

Quadro 7 – Modelo de resistência a antimicrobianos de *Acinetobacter baumannii*, isolado de ambiente e de espécimes clínicos

ISOLADO	ANTIMICROBIANOS (µg/disco)												
	NOR 10	CLO 30	SUT 25	AMI 30	FOS 200	GEN 10	PEF 5	IPM 10	TET 30	CTX 30	CAZ 30	CRO 30	CIP 5
16A	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R	R
31P	R	R	R	R		R	R		R	R	R	R	R
34P	R	R	R	R	I	R	R		R	R	R	R	R
ATCC19606				R		R				I		R	

NOR: norfloxacin; CLO: cloranfenicol; SUT: sulfametoxazol/trimetoprim; AMI: amicacina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; PEF: perfloxacin; IPM: imipenem; TET: tetraciclina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; R: resistência; I: intermediário; espaço em branco: sensível; A: isolado de ambiente; P: isolado de espécimes clínicos.

Quadro 8 – Modelo de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*, isolado de ambiente e de pele de paciente

ISOLADO	ANTIMICROBAINOS (µg/disco)														
	NOR 10	AMI 30	FOS 200	GEN 10	TET 30	CIP 5	PEN 10	ERI 15	CLA 15	CFL 30	TIC 75/10	CLI 2	CFO 30	OXA 1	VAN 30
1 <sup>A</sup>	R			R	I		R	R	I	R		R	R	R	R
3A	R			R		R	R	R		R	R	R	R	R	
5A							R								
6A	R	R		R			R	R	R	R	R	R	R	R	
14A	R	R		R		R	R	R	R		R	R	R	R	
15A	R			R	R		R	R			R	I	R	R	R
21A	R			R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R
24PP	R			R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	
ATCC12600		I						I							

NOR: norfloxacina; AMI: amicacina; FOS: fosfomicina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; TET: tetraciclina; PEN: penicilina; ERI: eritromicina; CLA: claritromicina; CFL: cefalotina; TIC: ticarcilina/ ácido clavulânico; CLI: clindamicina; CFO: cefoxitina; OXA: oxacilina; VAN: vancomicina; R: resistência; I: intermediário; espaço em branco: sensível; A: isolado de ambiente; PP: isolado de pele de paciente.

Todos os três isolados de *A. baumannii* (Quadro 7) foram sensíveis a imipenem e resistentes a norfloxacin, cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, amicacina, gentamicina, perfloxacin, tetraciclina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e ciprofloxacina; dois foram sensíveis à fosfomicina; e um apresentou grau de resistência intermediária.

Nos isolados de *S. aureus* (Quadro 8), observou-se que todos os oito foram sensíveis à fosfomicina; seis, à amicacina; e cinco, a tetraciclina, ciprofloxacina e vancomicina; todos foram resistentes à penicilina; sete, a norfloxacin, eritromicina, gentamicina, oxacilina e cefoxitina; seis, a clindamicina e ticarcilina/ ácido clavulânico; e cinco, à cefalotina.

Os sete isolados de *P. aeruginosa* de pele foram diferentes quanto à resistência a antimicrobianos (Quadro 6). Os isolados 14PP e 22PP foram, nesse sentido, idênticos e resistentes a todos os antibióticos testados. O isolado 5PP foi sensível apenas a imipenem, e o isolado 13PP, apenas à fosfomicina. Considerando-se que os antibióticos testados foram usados contra *Pseudomonas* e que os níveis de antibióticos testados foram Kirby-Bauer, ilustra-se, aqui, a severidade do quadro de resistência de bactérias, existentes na pele de pacientes hospitalares, a antimicrobianos, que podem disseminá-las nesse ambiente. As bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre os organismos capazes de desenvolver estratégias de proteção contra antibacterianos mais eficazes (NIKAIDO, 1998). Comparados à linhagem-tipo (ATCC 10145), os isolados da pele de pacientes apresentaram-se mais multirresistentes. Esses isolados apresentaram mais resistência que os isolados da água de equipamentos e de espécimes clínicos. É interessante notar que o modelo de resistência de *P. aeruginosa*, isolada de espécimes clínicos, é único (Quadro 6), o que pode indicar sua natureza clonal. O modelo em questão, resistência a cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, fosfomicina, tetraciclina e ceftriaxona e resistência intermediária a perfloxacin e cefotaxima, foi identificado no isolado 10H.

Os modelos de resistência de *P. aeruginosa*, isoladas de água de umidificador e de respirador, não diferem muito do modelo da linhagem-tipo, ATCC 10145. O mesmo pode ser dito dos isolados de espécimes clínicos (Quadro 6).

*A. baumannii* é um patógeno oportunista, de importância hospitalar, que está associado a infecções do trato urinário, do trato respiratório superior, da

pele e do pulmão e a bacteremia (KÔLJALG et al., 1999). Foi encontrado em espécimes clínicos e no aparelho de pressão (Quadros 3 e 5). Os modelos de resistência desses isolados (Quadro 7) mostram sua natureza multirresistente. O modelo de resistência do isolado, obtido de aparelho de pressão (16A), é o mesmo do isolado clínico 31P (Quadro 7). Em todos os casos, o modelo de resistência difere do da linhagem-tipo, ATCC 19606, que é resistente a apenas 3 dos 13 antimicrobianos testados.

O modelo de resistência do *S. aureus* ATCC 12600, linhagem-tipo desta espécie, mostra apenas padrão intermediário de resistência/sensibilidade aos antibióticos amicacina e eritromicina (Quadro 9). É sensível a todos os outros antibióticos considerados relevantes para esta espécie, como referido no manual NCCLS, 2001.

Em contraste, o modelo de resistência do isolado de pele 24PP (Quadro 8) foi resistente a 11, dos 15 antibióticos testados, é sensível a amicacina, fosfomicina, tetraciclina e vancomicina.

Todos os isolados identificados como *S. aureus* foram sensíveis à fosfomicina e todos, à penicilina. Apenas 1 isolado, *S. aureus* 5A, foi resistente a apenas 1 antimicrobiano, penicilina; e todos os outros apresentaram modelos de multirresistência. Segundo NCCLS, 2001, resistência à oxacilina, em *S. aureus*, estende-se a todos os outros  $\beta$ -lactâmicos. Nesse caso, isso não foi observado, uma vez que os isolados 14A e 15A foram resistentes à oxacilina e sensíveis à cefalotina, cefalosporina de primeira geração, o que pode indicar mecanismo de resistência à oxacilina não-convencional, presente nos referidos isolados.

#### **4.3. Resistência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, isoladas de ambientes e pacientes hospitalares, ao Digluconato de Clorhexidina e ao Polivinilpirrolidona-iodo**

Os Quadros 9, 10 e 11 mostram os valores da concentração inibitória mínima (MIC), obtidos pelo efeito de diversas concentrações dos anti-sépticos sobre o crescimento das bactérias isoladas de ambientes e pacientes hospitalares (Figuras 1 e 2).

Quadro 9 – Concentração inibitória mínima de digluconato de clorhexidina e polivinilpirrolidona-iodo de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada da água, de espécimes clínicos e de pele de pacientes

ISOLADOS	MIC (mg/L)	
	CHG	PVP-I
3H	8	500
4H	5	500
5H	5	600
6H	5	600
10H	5	500
11H	8	600
12H	8	600
29P	8	600
30P	14	600
39P	2	600
1PP	5	550
4PP	11	600
5PP	14	600
8PP	8	600
13PP	11	550
14PP	11	600
22PP	14	600
ATCC10145	5	450

H: isolado da água; P: isolado de espécimes clínicos; PP: isolado de pele de paciente; MIC: Concentração inibitória mínima; CHG: digluconato de clorhexidina; PVP-I: polivinilpirrolidona-iodo.

Quadro 10 – Concentração inibitória mínima de digluconato de clorhexidina e polivinilpirrolidona-iodo de *Acinetobacter baumannii*, isolado de ambiente e de espécimes clínicos

ISOLADOS	MIC (mg/L)	
	CHG	PVP-I
16A	2	300
31P	5	550
34P	5	450
ATCC19606	2	150

A: isolado de ambiente; P: isolado de espécimes clínicos; MIC: Concentração inibitória mínima CHG: digluconato de clorhexidina; PVP-I: polivinilpirrolidona-iodo.

Quadro 11 – Concentração inibitória mínima de digluconato de clorhexidina e polivinilpirrolidona-iodo de *Staphylococcus aureus*, isolado de ambiente e de pele de paciente

ISOLADOS	MIC (mg/L)	
	CHG	PVP-I
1A	5	300
3A	0,3	500
5A	5	450
6A	0,5	450
14A	1,1	500
15A	0,6	450
21A	1,2	300
24PP	0,7	500
ATCC12600	1,9	450

A: Isolado de ambiente; PP: Isolado de pele de paciente; MIC: Concentração inibitória mínima; CHG: Digluconato de clorhexidina; PVP-I: Polivinilpirrolidona-iodo.

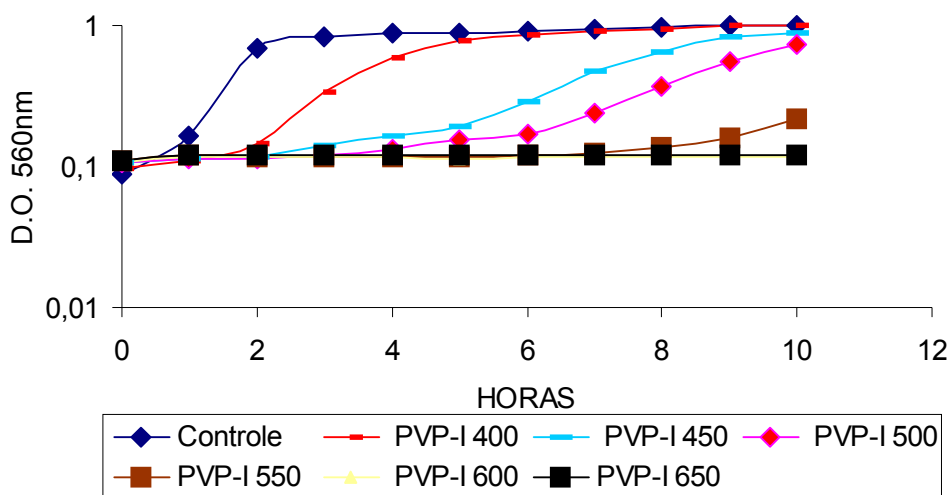


Figura 1 – Efeito de concentrações (mg/L) de polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de pele de paciente.

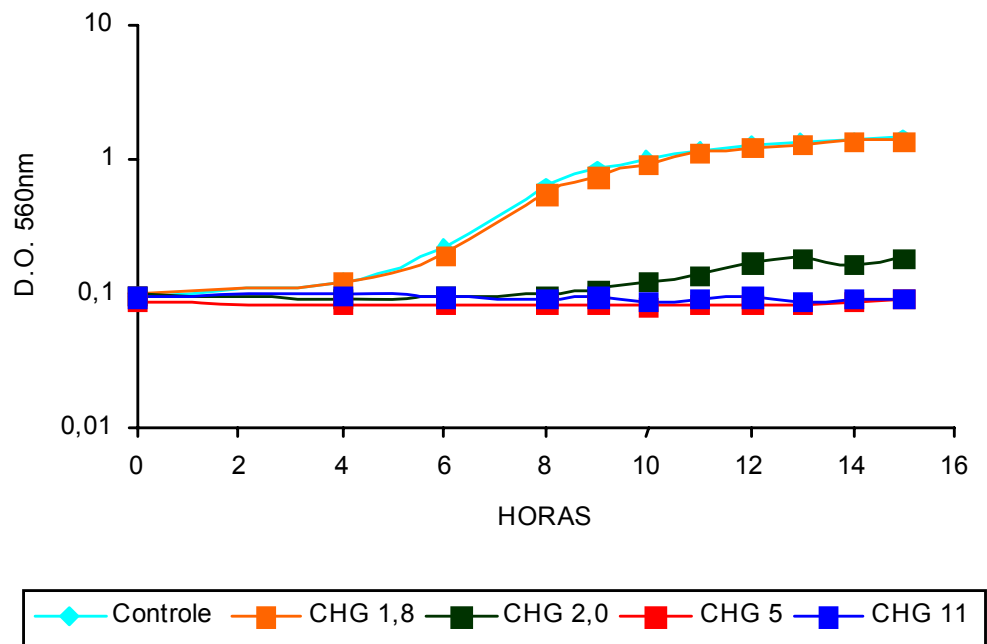


Figura 2 – Efeito de concentrações (mg/L) de digluconato de clorhexidina (CHG) sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada de pele de paciente.

Os valores encontrados para clorhexidina variaram de 2 a 14mg/L, para bactérias Gram-negativas, e de 0,3 a 5mg/L, para *S. aureus*. A maior suscetibilidade observada em *S. aureus*, comparada com as bactérias Gram-negativas, era esperada.

Em geral, bactérias Gram-positivas são consideradas mais sensíveis a biocidas do que bactérias Gram-negativas, devido à diferença na permeabilidade dessas bactérias ao biocida (McDONNELL e RUSSELL, 1999).

BLOCK e FURMAN (2002), ao determinarem MICs de clorhexidina em bactérias isoladas de espécimes clínicos, obtiveram valores de 0,5 a 64mg/L, para *S. aureus*, e de 16 a 128mg/L, para *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. KÖLJALG e colaboradores (2002) também determinaram MICs de clorhexidina dessas bactérias, isoladas de espécimes clínicos, e observaram valores de 32mg/L para *A. baumannii*, 16mg/L para *P. aeruginosa* e 1mg/L para *S. aureus*. Esses resultados mostram que houve grande variação e também que a resistência ao biocida clorhexidina, nos isolados aqui estudados, não é comparável aos níveis mais altos de resistência relatados na literatura, exceto



no que se refere aos isolados 1A e 5A de *S. aureus* (Quadro 11). Por serem isolados principalmente multirresistentes a antibióticos, esta observação é relevante, por indicar que possivelmente não há correlação entre mecanismos de resistência aos antibióticos e mecanismos de resistência a esse biocida.

No caso de clorhexidina, houve diferença de resistência entre isolados de diferentes origens, principalmente entre os identificados como *P. aeruginosa*.

Na literatura, há escassez de dados quantitativos sobre resistência de bactérias a PVP-I. Os dados aqui obtidos mostram MICs de 500 a 600mg/L para *P. aeruginosa*. A linhagem-tipo apresenta 450mg/L, valor não muito abaixo dos isolados testados (Quadro 9). O mesmo se observa em *S. aureus* (Quadro 11), cuja variação de MIC de PVP-I ficou entre 300 e 500mg/L e 450mg/L para a linhagem ATCC 12600.

Em *A. baumannii* (Quadro 10), houve variação de 300 a 500mg/L, em valores de MIC de PVP-I. A linhagem de referência apresentou MIC igual a 150mg/L, o que indica uma resistência pelo menos duas vezes maior nos isolados testados.

O biocida mais usado no hospital em questão foi o PVP-I, apenas para pele de pacientes e do pessoal. Não houve correlação sensível entre o uso de PVP-I e o aparecimento de isolados mais resistentes a este biocida em pele de pacientes. É necessário ressaltar que a seleção de resistentes ocorreu ao longo do tempo, e os pacientes tinham transitoriedade no hospital.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram isoladas de ambiente, de espécimes clínicos e de pele de pacientes do Centro de Terapia Intensiva de um hospital. Das bactérias identificadas, foram selecionadas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Staphylococcus aureus*, para determinar os modelos de resistência aos antimicrobianos usados como quimioterápicos em medicina humana, e os seus perfis de resistência aos biocidas digluconato de clorhexidina e polivinilpirrolidona –iodo, usados principalmente como anti-sépticos. A escolha se deu em razão de essas bactérias estarem relacionadas com episódios de infecção hospitalar e por serem comuns na maioria dos hospitais.

Os modelos de resistência a antimicrobianos foram determinados pelo método de difusão de disco Kirby-Bauer (BAUER et al., 1965).

A resistência a biocidas foi caracterizada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima, utilizando-se a metodologia padronizada no Laboratório de Microbiologia Industrial (MOREIRA, 2002).

Os isolados de *P. aeruginosa*, provenientes da pele de pacientes, apresentaram-se diferentes quanto à resistência a antimicrobianos. Apenas 2 isolados, 14PP e 22PP, foram idênticos e resistentes a todos os antimicrobianos testados. Esses isolados apresentaram mais resistência que os isolados de *P. aeruginosa* de água de equipamentos e dos espécimes clínicos. Comparados à linhagem-tipo, apresentaram-se mais multirresistentes.

O modelo de resistência dos isolados de espécimes clínicos é único, incluindo resistência a cloranfenicol, sulfametoxazol/trimetoprim, fosfomicina, tetraciclina e ceftriaxona, o que indica sua natureza clonal. O modelo em questão foi também identificado no isolado 10H, da água.

Os modelos de resistência dos isolados de *A. baumannii*, do ambiente e de espécimes clínicos, mostram sua natureza extremamente multirresistente. Nota-se que o isolado obtido do aparelho de pressão, 16A, tem o mesmo modelo do 31P, do isolado clínico. Os isolados de *A. baumannii* também apresentaram maior multirresistência quando comparados à linhagem-tipo, e, em todos os casos, o modelo de resistência diferiu do da linhagem-tipo.

Com exceção de 1 isolado de *S. aureus*, todos os outros apresentaram modelos de multirresistência quando comparados à linhagem-tipo. Resistência à oxacilina foi verificada em 7 isolados de *S. aureus*, mas o mesmo não foi observado nos demais  $\beta$ -lactâmicos, uma vez que dois isolados apresentaram resistência à oxacilina e sensibilidade à cefalotina (cefalosporina de primeira geração).

Os dados obtidos de MIC dos anti-sépticos indicam que não há correlação evidente entre resistência aos antimicrobianos e resistência aos anti-sépticos.

Os valores de MIC de clorhexidina foram menores em *S. aureus* do que em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Os MICs de PVP-I tiveram maior semelhança, em sensibilidade, entre *S. aureus* e *A. baumannii*, quando comparados a *P. aeruginosa*.

Comparado à linhagem-tipo, *A. baumannii* apresentou MIC de PVP-I pelo menos duas vezes maior. Ao contrário, *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram MICs de PVP-I não muito acima dos das respectivas linhagens-tipo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Epidemiologia para o controle de infecção hospitalar: ANVISA, 2000.**
- BARRY, A.L., FUCHS, P.C., BROWN, S.D. Lack of effect of antibiotic resistance on susceptibility of microorganisms to chlorhexidine gluconate or povidone iodine. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, p. 920-921, 1999.
- BAUER, A.W., KIRBY, V.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n. 4, p. 493-496, 1965.
- BLOCK, C., FURMAN, M. Association between intensity of chlorhexidine use and microorganisms of reduced susceptibility in a hospital environment. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, n. 3, p. 201-206, 2002.
- CHAPMAN, J.S. Characterizing bacterial resistance to preservative and disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 241-245, 1998.
- CHUANCHUEN, R., BEINLICH, K., HOANG, T.T., BECHER, A., SCHWEIZER, H.P. Cross resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-Oprj. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 428-432, 2001.
- CHOPRA, I. Research and development of antibacterial agents. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 495-501, 1998.

- COX, R.A., CONQUEST, C., MALLAGHAN, C., MARPLES, R.R. A major outbreak of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* caused by a new phage type (EMRSA-16). **Journal of Hospital Infection**, v. 29, p. 87-106, 1995.
- DAVIES, J.E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **Ciba Found Control**, v. 207, p.15-27, 1997.
- DANCE, D.A.B., PEARSON, A.D., SEAL, D.V., LOWES, J.A. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine and antibiotic resistant *Proteus mirabillis*. **Journal of Hospital Infection**, v. 10, p. 10-16, 1987.
- DANCER, S.J. Mapping up hospital infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 85-100, 1999.
- DENYER, S.P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, p. 227-245, 1995.
- DENYER, S.P. STEWART, G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 261-268, 1998.
- DENYER, S.P., MAILLARD, J.Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotic in Gram-negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, p. 35-45, 2002 (suppl., 92).
- EL-FALAHA, B.M.A., ROGERS, D.T., RUSSEL, A.D., FURR, J.R. Effect to some antibacterial agents on the hydrophobicity of wild type and envelope mutant of *Escherichia coli*. **Current Microbiology**, v. 12, p. 187-190, 1985.
- FITZGERALD, K.A., DAVIES, A., RUSSELL, A.D. Effect to clorhexidine and phenoxyethanol on cell surface hydrophobicity of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 14, p. 91-95, 1992.
- GILLESPIE T.A., JOHNSON P.R.E., NOTMAN A.W. et al. Eradication of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain after a cluster of infection in a hematology and oncology unit. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, p.125-130, 2000.
- GILBERT, P., PEMBERTON, D., WILKINSON, D.E. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 585-592, 1990.
- GOTTARDI, N. Iodine and iodophors in: McDONNELL, G., RUSSELL, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1991.

- GRAVEN, D.E., MOODY, B., CONNOLLY, M.G., KOLLISCH, N.R., STOTTMEIER, K.D., McCABE, W.R. Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacea*. **New England Journal of Medicine**, v. 305, p. 621-623, 1981.
- HEIR, E., SUNDHEIM, G., HOLCK, A.C. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 378-388, 1999.
- HEROLD, B.C., IMMERGLUCK, L.C., MARANAN, M.C. et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children no identified predisposing risk. **Journal of American Medical Association**, v. 279, p. 593-598, 1998.
- HOSEIN, I.K., HILL, D.W., JENKINS, L.E., MAGEE, J.T. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 90-97, 2002 (suppl. 92).
- IRIZARRY, L., MERLIN, T., RUPP, J. et al. Reduced susceptibility of methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine. **Chemotherapy**, v. 42, p. 248-252, 1996.
- KÖLJALG S., LYYTIKAINEN O., VOUPIO-VARKILA et al. Distribution of *Acinetobacter baumannii* in a neurointensive care unit. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. V. 31, p. 145-150, 1999.
- KÖLJALG, S., NAABER; M. MIKELSAAR. Antibiotic resistance as an indicator of bacterial chlorhexidine susceptibility. **Journal of Hospital Infection**, v. 51, p. 106-113, 2002.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., WILLIAM, M.J., SCHERCTENBERGER, P.C., WINNI Jr., W.C. **Diagnostic Microbiology- Color Atlas and Textbook of** Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 4<sup>a</sup> ed. 1154p., 1992.
- LEVY, C. E. **Métodos clássicos e de biologia molecular aplicados ao controle de infecção hospitalar**. In: Infecção Hospitalar e Suas Interfaces na Área da Saúde. São Paulo , SP: Atheneu, p. 1600-1602, 2000.
- LEVY, S.B. Antibiotic and antiseptic resistance: impact on public health. **Pediatric Infectious Disease Journal**, p.120-122, 2000 (suppl., 19).
- LEELAPORN, A., PAULSEN, I.T., TENNENT, J.M., LITTLEJOHN, T. G., SKURRAY, R.A. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**. v. 40, p. 214-220, 1994.
- LITTLEJOHN, T.G., PAULSEN, I.T. GILLESPIE, M.T. et al. Substrate specificity and energetic of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 95, p. 259-266, 1992.

- LYYTIKAINEN O., KÖLJALG S., HARMÄ M. et al. Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burn unit: emergence of resistance to imipenem. **Journal of Hospital Infection**, v. 31, p. 41-54, 1995.
- MAILLARD, J.Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology**, p. 16-27, 2002. (suppl., 92).
- MASUDA, N., GOTOH, N., ISHII, C., SAKAGAWA, E., OHYA, S., NISHINO, T. Interplay between chromosomal  $\beta$ -lactamase and the MexAB-oprM efflux system in intrinsic resistance to  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 400-402, 1999.
- MERCK. **Manual Merck**. Darmstadt, Germany, 405p., 1996.
- McDONNELL, G., RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.
- MOREIRA, M.A.S. **Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e em *Enterobacter cloacae***. Viçosa, MG: UFV, 2002. 109p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- MUNOZ-BELLIDO, J.L., ALONSO MANZANARES, M.A., MARTINEZ ANDRÉS, J.A., et al. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *griA* and *norA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 354-356, 1999.
- NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS: performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eleventh informational supplement, v. 21, n. 1, M 100-S11, 2001.
- NIKAIDO, H. Multiple antibiotic resistance and efflux. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 516-523, 1998.
- NIKAIDO, H., VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiology Reviews**, v. 49, p. 1-32, 1985.
- PAULSEN, I.T., BROWN, M.H., SKURRAY, R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Review Microbiology**, v. 60, p. 575-608, 1996.
- POOLE, K., KREBES, K., McNALLY, C., NESHAT, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of efflux operon. **Journal of Microbiology**, v. 175, p. 7363-7372, 1993.
- POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of Applied Microbiology**, p. 55-64, 2002 (suppl., 92).

- ROUCH, D.A., GRAM, D.S., DI BERADINO, D., LITTLEJOHN, T.G., SKURRAY, R.A. Efflux-mediated antiseptic gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 2051-2062, 1990.
- RUSSELL, A.D. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides. **Progress in Medicinal Chemistry**. v. 35, p. 133-197, 1998.
- RUSSELL, A.D., CHOPRA, I. Understanding antibacterial action and resistance. **Progress in Medicinal Chemistry**, p. 20-28, 1996.
- RUSSELL, A.D., TATTAWASART, U., MAILLARD, J.Y., FURR, J.R. possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 2151, 1998.
- SUELLER, M.T., RUSSELL, A.D. Antibiotic and biocide resistance in methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin - resistant *Enterococcus*. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 281-291, 1999.
- TATTAWASART, U., MAILLARD, J.Y., FURR, J.R., RUSSELL, A.D. Development of resistance to clorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. **Journal of Hospital Infection**, v. 42, p. 219-229, 1999.
- TALON D. The role of the hospital environment in the epidemiology of multi-resistant bacteria. **Journal of Hospital Infection**, v. 43, p. 13-17, 1999.
- THOMAS, L., MAILLARD, J.Y., LAMBERT, R.J.W., RUSSELL, A.D. Development of resistance to clorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of "residual" concentration. **Journal of Hospital Infection**, v. 46, p. 297-303, 2000.
- TRIAS, J., BENZ, J. Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. **Molecular Microbiology**, v. 14, p. 283-290, 1994.
- VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington, D.C. APHA, 1992.
- WILSON, I.E., HOGG, E.M., BARR, J.G. Microbial quality of ice in hospitals and community. **Journal of Hospital Infection**, v. 36, p. 171-180, 1997.
- WHITE, G.D., McDERMOTT, P. Biocides, drug resistance and microbial evolution. **Elsevier Science**, v. 4, p. 315-317, 2001.
- WOODCOCK, P.M. Biguanides as industrial biocides. **Crit. Rep. Appl. Chem**, v. 23, p. 19-36, 1988.



- YAMAMOTO, T., TAMURA, Y., YOKOTA, T. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 932-935, 1988.
- ZHENG, Y., YOUNG, D.B. Molecular mechanism of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. **Trends in Microbiology**. v. 1, p. 109-113, 1993.
- ZIHA-ZARIFI, I., LLANES, C., KOHLER, T., PECHERE, J.C., PLESIAT, P. In vivo emergence of multidrug-resistance mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexAB-MexB-oprM. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 287-291, 1999.