

ARTIGO ORIGINAL

# Diminuição da Susceptibilidade à Clorexidina: revisão Sistemática

## Decreased Susceptibility to Chlorhexidine: systematic Review

## Disminución de la susceptibilidad a la clorhexidina: revisión sistemática

Aldemara Ingrid da Silva Barbosa,<sup>1</sup> Bruna Helena Silva Rendall Évora,<sup>1</sup> Emília Sousa de Oliveira,<sup>1</sup>

Jessica da Silva Campos,<sup>1</sup> Jonas Ivan Nobre Oliveira.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.

Recebido em: 22/01/2019

Aceito em: 01/05/2019

Disponível online: 20/06/2019

**Autor correspondente:**

Bruna Helena Silva Rendall Évora

Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Centro de Biociências – Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

Laboratório de Bacteriologia Médica. Caixa Postal 1524 - Campus Universitário Lagoa Nova, Natal/RN, Brasil. CEP: 59078-970.

evorabrana@gmail.com

### RESUMO

**Objetivo:** Explorar a ocorrência adaptativa de espécimes bacterianos ao composto Clorexidina (CLX). Revisão sistemática a partir de artigos publicados no período de 2013 a 2017 e indexados nos bancos de dados Pubmed/MEDLINE, LILACS, ScienceDirect e SciELO, com a utilização dos termos chaves “chlorhexidine”, “antiseptic”, “bacteria”, “microorganisms” e “decreased susceptibility”. Informações referentes aos autores, ano da publicação, país de origem, espécies bacterianas, metodologia relacionada à CLX, resultados e conclusões foram obtidas dos estudos analisados. **Conteúdo:** A revisão incluiu 1.433 espécimes obtidas de 15 estudos. Sendo as espécies clínicas mais reportadas o *Staphylococcus aureus* e o *Acinetobacter baumannii*. Como metodologias adotadas para avaliação da susceptibilidade à CLX, destacam-se os métodos de diluição seriada para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os estudos mostraram evidências significativas de redução de susceptibilidade à CLX na maioria das espécies investigadas. **Conclusão:** Foi constatado a resistência ou redução considerável da susceptibilidade à CLX na literatura explorada pelo método científico empregado. Contudo, há a necessidade de investigações adicionais que possam assessorar a vigilância epidemiológica da adaptação genética bacteriana a esse biocida.

**Descritores:** Revisão sistemática. Biocidas. Antissépticos.

Clorexidina. Susceptibilidade diminuída.

### ABSTRACT

**Objective:** Explore the adaptive occurrence of bacterial specimens to the compound Chlorhexidine (CLX). **Methods:** Systematic review of articles published in the period from 2013 to 2017 and indexed in the Pubmed / MEDLINE, LILACS, ScienceDirect and SciELO databases using the key terms "chlorhexidine", "antiseptic", "bacteria", "microorganisms" and "Decreased susceptibility". Information concerning the authors, year of publication, country of origin, bacterial species, CLX - related methodology, results and conclusions were obtained from the studies analyzed. **Contents:** The review included 1,433 specimens obtained from 15 studies. The most common clinical species are *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. As methodologies adopted to evaluate the susceptibility to CLX, we highlight the serial dilution methods for the determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The studies showed significant evidence of reduced susceptibility to CLX in most of the species investigated. **Conclusion:** Resistance or considerable decrease of susceptibility to CLX was found in the literature explored by the scientific method employed. However, there is a need for additional investigations

that may assist the epidemiological surveillance of bacterial genetic adaptation to this biocide.

**Keywords:** *Systematic review. Biocides. Antiseptics. Chlorhexidine. Decreased susceptibility.*

## RESUMEN

**Objetivo:** Explorar la instancia adaptativa de las muestras bacterianas para el compuesto Clorexidine (CLX). Sistemáticos de artículos publicados en el período de 2013 a 2017 e indexados en los bancos de datos Pubmed / Medline, Lilacs, ScienceDirect y SciELO, utilizando términos clave "clorhexidina", antiséptico, bacterias y microorganismos evaluación "Susceptibilidad". Las informaciones referentes a los autores, año de publicación, país de origen, especies bacterianas, metodología relacionada a la CLX, resultados y conclusiones se obtuvieron a partir de los estudios analizados. **Contenido:** La revisión incluyó 1.433 especímenes obtenidos de 15 estudios. Las especies clínicas más relatadas son *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*. Como metodologías adoptadas para evaluar la susceptibilidad al CLX, destacan métodos de dilución en serie para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la Concentración Bactericida Mínima (MBC). Los estudios mostraron evidencias significativas de susceptibilidad reducida a la CLX en la mayoría de las especies investigadas. **Conclusión:** La resistencia o considerable reducción de la susceptibilidad a la CLX en la literatura explotada por el método científico utilizado fue confirmada. Sin embargo, hay necesidad de investigaciones adicionales que puedan orientar la vigilancia epidemiológica de la adaptación genética bacteriana a ese biocida.

**Palabras Clave:** *Revisión sistemática. Biocidas. Antisépticos. Clorhexidina.*

## INTRODUÇÃO

Os biocidas, incluindo antissépticos e desinfetantes, são utilizados extensivamente em hospitais e em outros ambientes de cuidados de saúde, para a esterilização de vários dispositivos e superfícies de equipamentos médicos, como também no processo de antissepsia do paciente.<sup>1,2</sup> Os antissépticos conceituam-se como produtos que aniquilam ou inibem o crescimento de microrganismos em tecidos bióticos.<sup>3</sup> Dentre esses compostos, a Clorexidina (CLX) ou Gluconato de clorexidina, é amplamente utilizada em hospitais, clínicas e laboratórios. Dispõe de um mecanismo de ação que se baseia na modificação da integridade da membrana lipídica bacteriana, por ser um cátion que se liga aos grupos fosfatos dos ácidos teicoicos em Gram positivas e aos lipossacarídeos em Gram negativas.<sup>4</sup> Classificada como uma biguanida catiônica, a CLX, possui amplo espectro de atividade bactericida e baixa toxicidade, contudo, existem relatos na literatura de resistência ou diminuição de susceptibilidade a esse composto. Esse evento é mediado, principalmente, pela perda ou redução da expressão de porinas que reduzem a permeabilidade da membrana externa e pela expressão de bombas de efluxo, uma vez que os biocidas são bons substratos para a maioria das bombas.<sup>5</sup> A resistência bacteriana aos biocidas, tal como ocorre em relação aos antibióticos, pode ser classificada como intrínseca, conferida por elementos genéticos inatos da bactéria, ou adquirida, mediada por mutações pontuais ou por plasmídeos ou transposons.<sup>3</sup>

Alguns estudos explicam que esse comportamento fenotípico está associado a evidências genéticas perante exposição a esses compostos, tal como a presença de genes que codificam proteínas de sistemas de bombas de efluxo da família SMR

(*Small Multidrug Resistance*) conferindo susceptibilidade reduzida à CLX, gerando assim uma nova problemática, para além da multirresistência aos antibióticos muito retratada em várias espécies bacterianas.<sup>6-8</sup>

Nesse contexto, a presente revisão sistemática objetivou pesquisar artigos científicos recentes sobre a resistência ou diminuição da susceptibilidade à CLX, visando melhorar a compreensão do assunto.

## MÉTODOS

O estudo retrata uma revisão sistemática de literaturas publicadas entre o período de 2012 a 2017 sobre organismos bacterianos e a possível diminuição da susceptibilidade ou resistência ao antisséptico CLX. Revisões nesta área não foram encontradas na Biblioteca Cochrane (The Cochrane Database of Systematic Reviews).

### Estratégia de Busca

Realizou-se, entre os meses de agosto a setembro de 2017, uma busca eletrônica nos bancos de dados MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*), LILACS (*Latin American and Caribbean Literature in Health Sciences*), SciELO (*Scientific Electronic Library Online*) e ScienceDirect, limitando-se aos artigos originais de estudos empíricos, em inglês, publicados no quinquênio 2013-2017. As palavras-chaves utilizadas foram: "chlorhexidine", "antiseptic", "bacteria", "microorganisms" e "decreased susceptibility".

A fim do cômputo do número total de estudos encontrados, apurou-se, inicialmente, a existência de duplicatas entre os bancos de dados.

### Seleção dos Estudos

A seleção dos estudos foi realizada segundo as diretrizes da declaração PRISMA.<sup>9,10</sup> Os artigos foram submetidos a triagem mediante a leitura inicial dos títulos e dos resumos e, posteriormente, de todo o corpo textual. Foram eliminadas as pesquisas com mais de 5 anos de publicação, artigos de revisões e capítulos de livros. As discordâncias entre os revisores foram resolvidas por consenso.

Os critérios de inclusão para esse estudo foram: [i] pesquisas com microrganismos bacterianos, [ii] que abordaram o biocida CLX e [iii], testaram a susceptibilidade à CLX por Concentração Inibitória Mínima (CIM) e/ou Concentração Bactericida Mínima (CBM). Como critérios de exclusão, publicações: [i] que não analisam a susceptibilidade à CLX, [ii] que investigaram a eficácia da CLX, [iii] que analisaram somente resistência aos antibióticos induzidas por CLX, [iv] cujos temas não apresentaram coerência com título, [v] não disponíveis na íntegra e [vi] com escrita em língua não-inglesa.

### Qualidade dos Estudos

A qualidade das referências foi averiguada por um dos revisores através da avaliação sugerida por Munn *et al.*, 2014.<sup>10</sup> Essa foi composta por dez perguntas com o intuito de garantir a representatividade da amostra, recrutamento adequado, validade dos métodos, interpretação dos dados, como também a aplicabilidade dos resultados. De acordo com o resultado, cada artigo foi classificado nos níveis de qualidade boa, média e baixa.

### Extração dos Dados

As informações selecionadas em cada uma das publicações foram: autores, ano da publicação dos artigos, amostra bacteriana, metodologia relacionada à CLX, resultados e conclusões. Nos casos dos estudos que analisaram outros

biocidas, somente a metodologia e resultados relacionados à CLX foram considerados.

## RESULTADOS

Um total de 894 referências foram identificadas, sendo 317 e 577 provenientes dos bancos de dados Pubmed/MEDLINE e ScienceDirect, respectivamente. As plataformas LILACS e SciELO não revelaram resultados relativos ao tema. Dessas referências, excluíram-se 3 duplicatas, 590 por se tratarem de estudos publicados há mais de 5 anos e 157 por tratarem-se de artigos de revisão e capítulos de livros. Selecionou-se 146 artigos das referências remanescentes após a realização de triagem a partir do título e resumo; desses, 117 foram excluídas por não atenderem aos critérios de inclusão. Após essa avaliação de elegibilidade e a subsequente leitura dos 26 artigos apurados, 2 foram rejeitados por falta de acesso ao texto na íntegra e 9 por apresentarem o foco divergente ao tema. A figura 1 esquematiza o processo de seleção das 15 referências discutidas no corpo dessa revisão.

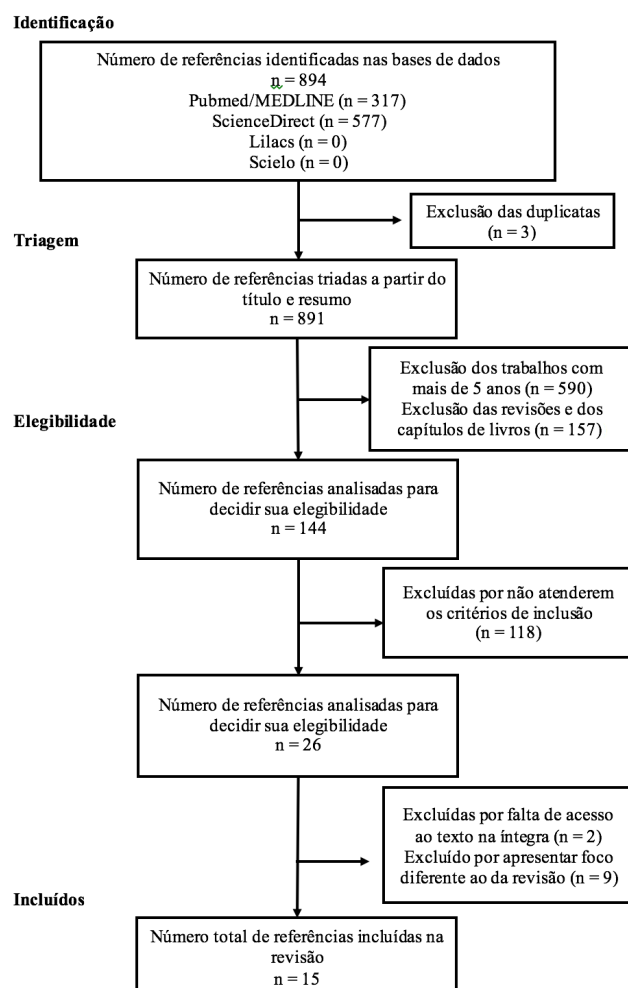
Esses estudos avaliaram um total de 1.433 espécimes bacterianos, com predominância das espécies *Staphylococcus aureus* (986/1433; 68%) e *Acinetobacter baumannii* (217/1433; 15%). Referente a essas cepas, um total de 45% dos isolados foram caracterizados como resistentes ou multirresistentes a antibióticos, com destaque ao *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA) e ao *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (CRAB), ambos recentemente classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como organismos que representam grande ameaça à saúde humana.<sup>11</sup>

Uma parcela considerável dos estudos (7/15; 46%) empregou metodologias de avaliação da susceptibilidade à CLX baseadas em técnicas de diluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) - *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) - ou ainda ensaios de Concentração Bactericida Mínima (CBM) - *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC). Esses dois procedimentos baseiam-se em parâmetros de avaliação *in vitro* que podem ser aplicados para classificar o microrganismo como sensível, intermediário ou resistente a um determinado composto farmacológico, permitindo monitorar o desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na clínica.<sup>12</sup>

Os principais métodos de diluição aplicados na estipulação da CIM/CBM foram a microdiluição em caldo (9/15; 60%) e a diluição em meio sólido (3/15; 20%). A maioria dos estudos fez uso de técnicas da biologia molecular, como a Reação da Cadeia de Polimerase (PCR) (9/15; 60%), a fim de comprovar a nível genético a aquisição de genes da resistência

nos isolados. E uma minoria aplicou a técnica da Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) para análise da expressão dos genes relacionados com a resistência (3/15; 20%). No caso, os principais genes identificados, especificamente *qac's* (8/15; 53%) e *smr* (4/15; 26%), localizam-se em elementos genéticos móveis e sua presença em plasmídeos de resistência a antibióticos tem apontado para uma resistência cruzada entre biocidas e antibióticos.<sup>13,14</sup>

A síntese dos estudos identificados quanto à autoria, país de origem, metodologia aplicada, resultados obtidos e inferências estipuladas pode ser observada na figura 1.



**Figura 1.** Fluxograma representando o processo de seleção dos estudos incluídos na revisão sistemática.

**Tabela 1.** Sumarização dos estudos incluídos na revisão.

| Autor, ano, país (ref.)                                   | Espécimes bacterianos                                        | Metodologias                                                                                                                             | Resultados                                                                                                                                                                                                                                                                 | Inferências                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mombeshora; Mukanganyama, 2017. <sup>16</sup><br>Zimbabwe | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> | CIM <sup>a</sup> por microdiluição em caldo determinados com e sem os inibidores da bomba de efluxo ABC (CCCP <sup>b</sup> e reserpine). | Redução do CIM da CLX <sup>c</sup> de 6.3 µg/ml para 3.2 µg/ml na presença do reserpine.                                                                                                                                                                                   | Participação significativa de bombas de efluxo na expulsão da CLX em <i>P. aeruginosa</i> .                                                                                                         |
| Marolf et al., 2017. <sup>24</sup><br>EUA                 | <i>S. aureus</i>                                             | CIM por microdiluição em caldo e pesquisa dos genes <i>qac</i> pela técnica da PCR. <sup>d</sup>                                         | Elevado CIM de CLX (2 µg/mL) em 7/104 isolados; Ausência dos genes <i>qacA/B</i> em todos os isolados. Elevado CIM em 54.5% dos isolados; presença dos genes dos <i>qacE</i> e <i>qacΔE1</i> em 45.5% e 68% dos isolados respectivamente, e ausência do gene <i>cepA</i> . | CLX pode ser amplamente utilizado em pacientes hospitalizados sem selecionar <i>S. aureus</i> resistente à CLX.                                                                                     |
| Gomaa et al., 2017. <sup>14</sup><br>EUA                  | <i>Acinetobacter baumannii</i> multirresistentes             | CIM por microdiluição em caldo e pesquisa dos genes de <i>qac</i> e <i>cepA</i> pela técnica da PCR.                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                            | Restrição do uso de biocidas é necessária, visto que houve redução de susceptibilidade à CLX; podendo contribuir para a permanência no ambiente hospitalar e desencadeamento de IRAS <sup>e</sup> . |

|                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gadea et al., 2017. <sup>29</sup><br>Espanha           | <i>Chrysoeobacterium</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Patocia</i> sp., <i>Salmonella</i> sp. | CIM e CBM <sup>†</sup> por microdiluição em caldo e pesquisa dos genes <i>qac</i> pela técnica da PCR.                                                                                    | Tolerância aumentada à clorexidina em 92% dos isolados após a exposição gradual a CLX e presença do gene <i>qacH</i> em 2 isolados do gênero <i>Enterococcus</i> .                     | Exposição repetitiva à CLX e cetrímid, diminui a susceptibilidade aos antibióticos e a outros biocidas nas bactérias.                                                               |
| Prag et al., 2014. <sup>27</sup><br>Suécia             | <i>S. epidermidis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                            | CIM por diluição em meio sólido e pesquisa e análise da expressão dos genes <i>qac</i> pelas técnicas da PCR e PCR-RT, respectivamente.                                                   | Elevado CIM da CLX em 13 isolados e 8 com susceptibilidade reduzida. Presença dos genes <i>qacA/B</i> em 43% (62/143) dos isolados e <i>smr</i> 6% (8/143) e <i>qacH</i> em 1 isolado. | <i>S. epidermidis</i> isolados de infecções clínicas apresentam diminuição da susceptibilidade à CLX em comparação com as estirpes comensais.                                       |
| McNeil et al., 2016. <sup>20</sup><br>EUA              | <i>S. aureus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CIM e CBM de CLX por macrodiluição em caldo, pesquisa dos genes de resistência <i>qac</i> e <i>smr</i> .                                                                                  | Presença de um ou ambos os genes em 44.9% (111/147) dos isolados; diferenças significativas no CBM90 <sup>h</sup> entre os isolados com ambos os genes (> 256 µg/mL).                  | A tolerância genotípica aos antissépticos é comum entre as IRAS, e o impacto sinérgico no CIM/CBM da CLX deve-se a presença de genes de resistência.                                |
| Ferna; Vila; Marti, 2015. <sup>5</sup><br>Espanha      | <i>A. baumannii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                              | CIM e CBM de CLX por microdiluição em caldo; análise da expressão de genes de bombas de efluxo (AdeB, AdeJ, AbeM, AbeS e AmvA) e porinas (OmpA, CarO, OprD e Omp) pela técnica da RT-PCR. | Valores variáveis do CIM da CLX e aumento na expressão gênica de <i>adeB</i> , <i>abeS</i> e <i>amvA</i> e diminuição na expressão do gene <i>ompA</i> .                               | <i>A. baumannii</i> mostra susceptibilidade reduzida à CLX e parece induzir co-resistência a alguns agentes antimicrobianos.                                                        |
| Liu et al., 2015. <sup>22</sup><br>China               | MRSA <sup>†</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                | CIM e CBM por microdiluição em caldo; pesquisa e análise da expressão de genes <i>qac</i> e <i>smr</i> pelas técnicas da PCR e RT-PCR, respectivamente.                                   | Susceptibilidade reduzida à CLX, em 83% (44/53). Presença dos genes <i>smr</i> e <i>qac</i> em 77% e 83% dos isolados, respectivamente.                                                | A tolerância a biocidas pode contribuir para a persistência de MRSA no hospital e tornar a desinfecção uma tarefa difícil no controle de IRAS.                                      |
| Kim et al., 2015. <sup>28</sup><br>EUA                 | BCC <sup>‡</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CIM e CBM por microdiluição em caldo.                                                                                                                                                     | BCC em água pode permanecer viável com baixa susceptibilidade aos antissépticos, como a clorexidina, por 14 dias.                                                                      | BCC sobrevive em soluções antissépticas, CLX inclusive e há necessidade de mais investigações sobre estratégias de sobrevivência quando expostas a diversas soluções antissépticas. |
| Mendoza-Olazarán et al., 2014. <sup>18</sup><br>México | <i>A. baumannii</i>                                                                                                                                                                                                                                                                              | CIM por diluição em meio sólido.                                                                                                                                                          | De outubro a dezembro os valores de CIM50 <sup>k</sup> diminuíram de 128 mg/L para 8 mg/mL e de 256 mg/L para 16 mg/mL para valores de CIM90.                                          | Diminuição significativa nas CIMs após exposição dos pacientes a banhos com CLX a 2%.                                                                                               |
| McNeil et al., 2014. <sup>21</sup><br>EUA              | <i>S. aureus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CIM e CBM por macrodiluição em caldo e pesquisa do gene <i>smr</i> pela técnica da PCR.                                                                                                   | Presença do gene <i>smr</i> em 14% (56/200) das amostras. Os isolados que apresentaram o gene tiveram o CIM e CBM mais elevado quando comparado com as cepas sem o gene.               | Prevalência elevada de <i>smr</i> -positivo não foi clara, mas pode refletir a disseminação de cepas resistentes a drogas na comunidade e no ambiente de cuidados da saúde.         |
| Muñoz-Gallego et al., 2016. <sup>23</sup><br>Espanha   | MRSA                                                                                                                                                                                                                                                                                             | CIM e CBM por microdiluição de caldo e pesquisa dos genes <i>qac</i> pela técnica da PCR.                                                                                                 | Os valores CIM50 e CIM90 foram de 1 mg/L e os valores CBM50 e CBM90 foram 1 e 2 mg/L, respectivamente.                                                                                 | Não houve prevalência de MRSA com susceptibilidade reduzida à CLX no hospital. CLX tem maior potencial para prevenir a infecção causada pelo MRSA.                                  |
| Lepointeur et al., 2013. <sup>26</sup><br>França       | SCN <sup>†</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                 | CIM por microdiluição de caldo e pesquisa dos genes <i>qac</i> pela técnica da PCR.                                                                                                       | Diminuição da susceptibilidade à CLX em 12% (6/51) dos isolados e presença do gene <i>qacA/B</i> em 63% (32/53).                                                                       | Identificados níveis preocupantes de perda fenotípica de susceptibilidade a biocidas e genes de resistência em SCN isolados de recém-nascidos expostos a biocidas.                  |
| Tuon et al., 2017. <sup>30</sup><br>Brasil             | MRSA, CRAB <sup>m</sup> , CESP <sup>n</sup> , CRPA <sup>o</sup> , MSSA <sup>p</sup> , CSAB <sup>q</sup> , CSPA <sup>r</sup> , KPCs, <i>Proteus</i> sp., <i>Stenotrophomonas</i> e <i>Klebsiella</i> sp.                                                                                          | CIM e CBM por microdiluição de caldo.                                                                                                                                                     | CIM e CBM para clorexidina <0,039 mg/mL.                                                                                                                                               | Não houve redução da susceptibilidade dentre todos os isolados.                                                                                                                     |
| Hughes; Ferguson, 2017. <sup>24</sup><br>Austrália     | <i>S. aureus</i> .                                                                                                                                                                                                                                                                               | CIM por diluição em meio sólido para CLX <sup>1</sup> e Triclosan.                                                                                                                        | Elevados valores do CIM em 10% (19/198) para a CLX.                                                                                                                                    | Os valores elevados do CIM para CLX e Triclosan foram iguais ou inferiores a outros países                                                                                          |

<sup>a</sup>CIM – Concentração Inibitória Mínima; <sup>b</sup>CCCP – Carbonyl Cyanide M-Chlorophenylhydrazone; <sup>c</sup>CLX – Clorexidina; <sup>d</sup>PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; <sup>e</sup>IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde; <sup>f</sup>CBM – Concentração Bactericida Mínima; <sup>g</sup>RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real; <sup>h</sup>CIM90 – Concentração Inibitória Mínima letal para 90% dos isolados; <sup>i</sup>MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Metilina; <sup>j</sup>BCC – Complexo Burkholderia Cepacia; <sup>k</sup>CIM50 – Concentração Inibitória Mínima letal para 50% dos isolados; <sup>l</sup>SCN – *Staphylococcus Coagulase-Negativos*; <sup>m</sup>CRAB – *Acinetobacter baumannii* Resistente a Carbapenêmicos; <sup>n</sup>CESP – *Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia*; <sup>o</sup>CRPA – *Pseudomonas aeruginosa* Resistente a Carbapenêmicos; <sup>p</sup>MSSA – *Staphylococcus aureus* Suscetível à Metilina; <sup>q</sup>CSAB – *Acinetobacter baumannii* Sensível à Carbapenêmico; <sup>r</sup>CSPA – *Pseudomonas aeruginosa* Sensível à Carbapenêmicos; <sup>s</sup>KPC – *Klebsiella pneumoniae* Produtora de Carbapenemases.

## DISCUSSÃO

CLX é considerada um biocida padrão ouro, usada tanto como antisséptico como desinfetante. É uma substância fundamental para prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), amplamente empregado em hospitais na desinfecção de equipamentos e na limpeza de superfícies bióticas, já que pode agir como bacteriostático ou bactericida, dependendo da concentração usada. Somando-se a isso, tem a capacidade de agir em bactérias Gram negativas e Gram positivas.<sup>15,16</sup>

Em relação aos principais microrganismos responsáveis por causar IRAS, destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>17</sup> O uso incorreto de biocidas nos cuidados pessoais e na medicina humana tem levado, junto com outros fatores, à seleção de cepas menos susceptíveis, posto que há o aumento adaptativo de mecanismos de resistência a múltiplas drogas, e até mesmo aos biocidas.<sup>16,18</sup>

A fim de determinar a CIM capaz de inibir o crescimento dos microrganismos, os estudos utilizaram as técnicas de microdiluição em caldo e em meio sólido. Em adição, muitos também mensuraram CBM, que corresponde a concentração capaz de eliminar totalmente o crescimento do microrganismo.

Para aferição da susceptibilidade (CLX) de cepas das espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa*, Mombeshora e Mukan-ganyama (2017) empregaram a metodologia da microdiluição em caldo, contudo a CIM foi determinada com e sem os inibidores da bomba de efluxo da superfamília ABC ("ATP-binding cassette"), especificamente *Carbonyl Cyanide M-Chlorophenylhydrazone* (CCCP) e *reserpine*. No caso, os autores observaram uma redução da CIM à CLX de 6.3 µg/ml para 3.2 µg/ml na presença de *reserpine*, porém nenhuma alteração significativa para o *S. aureus* com a utilização do CCCP.

Acredita-se que a alteração/indução da expressão de bombas de efluxo é um evento inicial no surgimento da resistência aos antibióticos e à CLX.<sup>16</sup> A *reserpina*, o verapamil, o carbonil cianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) e a clorpromazina são exemplos de inibidores de bombas de efluxo capazes de aumentar a retenção intracelular e, consequentemente, a eficácia dos biocidas. A *reserpina*, por exemplo, age alterando a geração da força motriz de prótons necessária para o funcionamento de bombas de efluxo multidrogas. Já o CCCP afeta os níveis de energia da membrana bacteriana, abolindo o efluxo de uma ampla gama de moléculas.<sup>19</sup>

Mcneil et al. (2015) investigou a ocorrência de genes de resistência {*qacA* ou *qacB* (*qac A/B*) e *smr*} em espécies bacterianas de *S. aureus* que mostraram redução da susceptibilidade à CLX. Entre as duas mil e oitenta amostras coletadas no Hospital Infantil do Texas durante o período de 2007-2013, 247 demonstraram resistência à CLX com um CIM ≥ 512 µg/mL, usando o método da microdiluição em caldo. Nesses isolados foi verificada a presença de um ou ambos os genes em 111 cepas (44.9%), também como evidenciou diferenças significativas no CBM90s entre os isolados com ambos os genes (> 256 µg/mL).<sup>20</sup> Dessa forma, pode-se inferir que a tolerância genotípica aos antissépticos é comum entre *S. aureus* de proveniências hospitalar, e que o impacto sinérgico no CIM/CBM da CLX se deve à presença dos genes de resistência pesquisados.

Em um trabalho anterior, Mcneil et al. (2014), explorando esse mesmo microrganismo Gram positivo, *S. aureus*, encontrou resultados que agregam aos achados descritos a cima. Neste determinou a CIM e CBM por microdiluição em caldo e a pesquisa do gene *smr* pela técnica da PCR, e constatou a presença do gene *smr* em 14% (56/200) dos isolados, além disso as amostras que apresentaram o gene apresentaram o CIM e CBM

mais elevado quando comparado os isolados sem o gene.<sup>21</sup>

Colaborando com os resultados desses estudos, Liu et al. (2015) coletou e estudou 53 isolados de MRSA em seis hospitais Universitários na China durante o período de 3 anos. Eles efetuaram a pesquisa da CIM e CBM, por microdiluição em caldo, como também a pesquisa e análise da expressão de genes de bombas de efluxo pelas técnicas da PCR e PCR-RT. Preocupantemente, os autores observaram níveis de susceptibilidade à CLX em 83% (44/53) dos isolados com CIM ≥ 2 µg/ml, e sensibilidade em apenas 5 amostras (5/53; 9.4%).<sup>22</sup> *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MuH MRSA Isso demonstra mais um fato para se cientificar que tolerância a biocidas tem um grande papel para a persistência de MRSA no hospital, somando-se ao fato de tornar a eliminação de MRSA uma tarefa mais difícil no controle de IRAS.

Durante o período de 2012 e 2014, Muñoz-Gallego et al. (2016) investigaram MRSA em instalações de 1300 leitos do Hospital Universitario 12 de Octubre/Madri-Espanha. Nesse estudo observacional, os autores não encontraram resultados significativos em relação a prevalência de MRSA com susceptibilidade reduzida à CLX: CIM50 e CIM90 de 1 mg/L e CBM50 e CBM90 de 1 e 2 mg/L, respectivamente.<sup>23</sup> Dessa forma, foi demonstrado que cepas com resistência à CLX ainda não se encontram nesse hospital, consequentemente o biocida tem maior potencial preventivo contra o MRSA.

Hughes e Ferguson (2017) relataram que os valores elevados do CIM para CLX e triclosan na Austrália é igual ou inferior à encontrada em outros países. Para isso, avaliaram a CIM de 198 isolados *S. aureus* resistentes e sensíveis à metilina (161 MRSA e 37 MSSA) obtidos de 1.244 isolados clínicos de hemoculturas, *swabs*, aspirados, tecidos, suturas e urinas de enfermos hospitalizados em hospitais regionais. A partir do método de diluição em ágar e incorporando os antissépticos em concentrações de 0,06 mg/L até 256 mg/L, verificaram que 10% (19/198) apresentaram uma CIM aumentada (CIM ≥ 4 mg/mL) para à CLX.<sup>24</sup>

Em um Hospital Médico de Nebraska, Marolf et al. (2017) verificaram que a CLX pode ser amplamente utilizado em pacientes hospitalizados sem selecionar *S. aureus* resistente à CLX. No caso, observaram CIM elevada (CLX ≥ 2 µg/mL) em 7/104 isolados, o que representa menos de 8% das amostras. Além disso também relataram a ausência dos genes *qacA/B* em todos os isolados.<sup>25</sup>

Somando-se a esses achados, Lepainteur et al. (2013), fizeram um estudo fenotípico e molecular avaliando a prevalência de cocos Gram positivos e coagulase negativa, resistentes ao antisséptico CLX e mupirocina em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de referência francesa. Cinquenta e um (51) estafilococos coagulase negativa (SCN) - *S. epidermidis* (n=25), *S. capitis* (N=18), *S. haemolyticus* (N= 2) e outras espécies (N=6) - isolados de infecções sanguíneas associadas a cateter em neonatos prematuros tiveram a CIM determinada por microdiluição em caldo Müller-Hinton em triplicata. Desse total, 12% das amostras (6/51) apresentaram susceptibilidade reduzida (CIM ≥ 2mg/mL).<sup>26</sup> Embora a susceptibilidade à CLX ainda seja prevalente entre *Staphylococcus* sp., é preocupante a identificação de perda fenotípica de susceptibilidade a agentes tópicos e genes de resistência em SCN isolados de recém-nascidos expostos a concentrações mais baixas de agentes tópicos.

Também utilizando o método de diluição em ágar Müller-Hinton com CLX (0.0025, 0.005, 0.01, 0.04 e 0.08 µg/ml), Prag et al. (2014) avaliaram a expressão dos genes de resistência *qacA/B*, *smr*, *qacG*, *qacH* e *qacJ* em 143 isolados *S. epidermidis* através das técnicas da PCR e PCR-RT. A diminuição da susceptibilidade à CLX foi constatada com mais frequência em cepas que carregavam os genes *qacA/B* quando comparados

aos que não possuíam. Por fim, ao realçarem a concordância dos resultados obtidos pelos métodos fenotípicos e genotípicos aplicados, os autores concluíram que a presença de genes que codificam bombas de efluxo (especificamente *qac A/B* e *smr*) diminui a susceptibilidade à CLX.<sup>27</sup>

A respeito do coco-bacilo Gram-negativo não fermentador *Acinetobacter baumannii*, os trabalhos desenvolvidos por Goma et al. (2017), Ferna; Vila; Marti (2015) e Mendoza-Olazarán et al. (2014) aludiram a respeito da existência de susceptibilidade reduzida à CLX.<sup>5,14,18</sup>

Goma et al. (2017) analisaram a CIM da CLX de 56 isolados de *A. baumannii* por microdiluição em caldo, como também os genes de resistência *qacE*, *qacΔE1* e *cepA* pela técnica da PCR. Os genes *qacE* e *qacΔE1* foram detectados em 54,5% e 45,5% dos isolados respectivamente; além da ausência do gene *cepA* em 68% das amostras. Além disso 77% dos isolados tiveram redução da susceptibilidade à CLX.<sup>14</sup> Ferna; Vila; Marti, (2015), aferiram valores da CIM à CLX no intervalo de 2.4–39 mg/L, como também um aumento (diminuição) na expressão gênica de *adeB*, *abeS* e *amvA* (*ompA*). Ambos os trabalhos corroboram com o senso de que a susceptibilidade reduzida à CLX parece induzir co-resistência a alguns agentes antimicrobianos.<sup>5</sup> Apenas Mendoza-Olazarán et al., (2014) apresentou discordância com os achados anteriormente mencionados. No caso, os autores verificaram a diminuição significativa nas CIMs à CLX após exposição de 146 pacientes contaminados com *A. baumannii* a banhos de CLX-2%, o qual estava associado ao aumento da produção de biofilme.<sup>18</sup>

Analisando outro Gram negativo não fermentador - *Burkholderia Cepacia* (BCC) - KIM et al. (2015) investigaram a sobrevivência do BCC expostas a diversas soluções antisépticas; dentre elas a CLX. No primeiro dia de exposição, o BCC apresentou uma susceptibilidade duas vezes maior que as verificadas nos 40 dias subsequentes.<sup>28</sup>

Expondo a análise de várias espécies bacterianas - *Chrysoeobacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus* sp., *Enterobacter* sp. e *Patocia* sp., *Salmonella* sp. - isoladas a partir de alimentos classificados como orgânicos, Gadea et al. (2017) demonstraram um aumento de tolerância à CLX em 92% dos isolados (n=70) após a exposição gradual.<sup>29</sup>

Recentemente, Tuon et al. (2017) estudaram a incidência de espécimes patogênicas associadas à pneumonia por ventilação mecânica e à cobertura da placa dental de 16 pacientes internados em UTIs tratados com CLX. Para isso, avaliaram as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas a esse antiséptico. Dentre as espécies bacterianas isoladas, destacam-se a *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Providencia* sp., *Proteus* sp. e *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas*, *S. aureus* susceptível e resistente à meticilina, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* susceptíveis e resistentes à carbapenêmico. Concentrações inibitórias e bactericidas baixas para CLX (<0,039 mg/mL) foram encontradas em todas as amostras, o que demonstra que não houve redução da susceptibilidade nos dos isolados.<sup>30</sup> Apesar da quantidade de tipos diferentes de bactérias encontradas (n=117), a pequena amostragem de pacientes é um viés a ser considerado na validação das inferências apresentadas pelos autores.

A utilização da clorexidina é parte essencial das práticas atuais de controle de infecção no ambiente hospitalar, em especial, quando se objetiva limitar a disseminação de clones bacterianos multirresistentes. Assim, a redução da susceptibilidade a este composto aflige a capacidade médica de prevenir infecções durante cirurgias de rotina e emergência, e durante a internação em hospitais.

## CONCLUSÃO

Torna-se imprescindível vigiar a evolução dos perfis de susceptibilidade bacteriana aos biocidas, em particular à CLX, para que medidas preventivas sejam executadas com tempo hábil; evitando, pois, o surgimento de um problema global de saúde pública. Nessa perspectiva, a revisão sistemática de literatura se destaca como uma ótima ferramenta para o monitoramento (da susceptibilidade) nos diversos centros de saúde, bem como os possíveis fatores associados a expressão do fenótipo resistente.

## REFERÊNCIAS

1. 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; 1975–1983.
2. Babaei MR, Sulong A, Hamat RA, Nordin SA, Neela VK. Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015;1–5.
3. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147–179.
4. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003;14:58–62.
5. Ferna F, Vila J, Marti L. Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. 2015;1–8.
6. Srinivasan VB, Rajamohan G, Gebreyes WA. Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5312–5316.
7. Rajamohan G, Srinivasan VB, Gebreyes WA. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2010;1919–1925.
8. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A. Functional Characterization of AbeD, an RND-Type Membrane Transporter in Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter baumannii*. 2015;1–17.
9. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JPA et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *Bmj* 2009;339:b2700–b2700.
10. Munn Z, Moola S, Riitano D, Lisy K. The development of a critical appraisal tool for use in systematic reviews addressing questions of prevalence. *Int J Heal Policy Manag* 2014;3:123–128.
11. WHO CD of. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017.<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/> (accessed 7 Jun2017).
12. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances

- 2008;3:163–175.
13. Liu WJ, Fu L, Huang M, Zhang JP, Wu Y, Zhou YS et al. Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 2017;66:13–17.
14. Goma FAM, Helal ZH, Khan MI. and *qacE Δ 1* Genes and Their Association with Decreased Susceptibility to Antibiotics and Common Hospital Biocides in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. 2017;1–15.
15. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;453:254–267.
16. Mombeshora M, Mukanganyama S. Development of an accumulation assay and evaluation of the effects of efflux pump inhibitors on the retention of chlorhexidine digluconate in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Res Notes* 2017;10:328.
17. Pfeifer Y, Trifonova A, Pietsch M, Brunner M, Todorova I, Gergova I et al. Clonal Transmission of Gram-Negative Bacteria with Carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a Bulgarian Hospital. *Microb Drug Resist* 2016;00:mdr.2016.0059.
18. Mendoza-olazarán S, Camacho-ortiz A, Martínez-reséndez MF, Martín J, Msp L, Pérez-rodríguez E et al. American Journal of Infection Control Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* isolates. *Am J Infect Control* 2014;42:874–878.
19. Askoura M, Mottawea W, Abujamel T, Taher I. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med* 2011;6:1–8.
20. McNeil JC, Kok EY, Vallejo JG, Campbell JR, Hulten KG, Mason EO et al. Clinical and molecular features of decreased chlorhexidine susceptibility among nosocomial *Staphylococcus aureus* isolates at Texas Children's Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:1121–1128.
21. McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. Decreased susceptibilities to retapamulin, mupirocin, and chlorhexidine among *staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in otherwise healthy children. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2878–2883.
22. Liu Q, Zhao H, Han L, Shu W, Wu Q, Ni Y. Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MuH MRSA). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;82:278–283.
23. Muñoz-Gallego I, Infesta L, Viedma E, Perez-Montarelo D, Chaves F. Chlorhexidine and mupirocin susceptibilities in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bacteraemia and nasal colonisation. *J Glob Antimicrob Resist* 2016;4:65–69.
24. Hughes C, Ferguson J. Phenotypic chlorhexidine and triclosan susceptibility in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Australia. *Pathology* 2017;49:633–637.
25. Marolf CT, Alter R, Lyden E, Fey PD, Rupp ME. Susceptibility of Nosocomial *Staphylococcus aureus* to Chlorhexidine After Implementation of a Hospital-wide Antiseptic Bathing Regimen. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2017;1–3.
26. Lepointeur M, Royer G, Bourrel AS, Romain O, Duport C, Doucet-Populaire F et al. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: The creeping threat? *J Hosp Infect* 2013;83:333–336.
27. Prag G, Falk-Brynhildsen K, Jacobsson S, Hellmark B, Unemo M, Söderquist B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS* 2014;122:961–967.
28. Kim JM, Ahn Y, LiPuma JJ, Hussong D, Cerniglia CE. Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2015;42:905–913.
29. Gadea R, Glibota N, Pérez Pulido R, Gálvez A, Ortega E. Adaptation to Biocides Cetrimide and Chlorhexidine in Bacteria from Organic Foods: Association with Tolerance to Other Antimicrobials and Physical Stresses. *J Agric Food Chem* 2017;65:1758–1770.
30. Tuon FF, Gavrillo O, Almeida S de, Sumi ER, Alberto T, Rocha JL et al. Prospective, randomised, controlled study evaluating early modification of oral microbiota following admission to the intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine. *J Glob Antimicrob Resist* 2017;8:159–163.