

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

JÉSSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Klebsiella pneumoniae* EM CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Belo Horizonte
2017

JESSICA KARINE TÁVORA DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Klebsiella pneumoniae* EM CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Simone G. dos Santos

Co-orientadora: Cristina Dutra Vieira

Belo Horizonte
2017

À minha mãe e meu padastro, Rosilene Távora e Célio Pacheco.
Que sempre acreditaram em meus sonhos e me apoiaram.
Meus exemplos de alegria e disposição.
Certamente cada sorriso e momentos juntos estão gravados em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade que Ele me proporciona.

À minha mãe pelo apoio, amor e carinho.

Aos meus queridos amigos, Natália, Mirna, Kairo e Anneleike que se preocupam comigo, pelo cuidado de forma tão atenciosa e especial.

À toda minha família e amigos, por se orgulharem de todas as minhas conquistas.

À professora Simone Gonçalves dos Santos a minha gratidão pela confiança, cuidados, conselhos. Definitivamente sua contribuição nessa jornada é tão valiosa e impossível de esquecer.

À minha querida co-orientadora Cristina Dutra Vieira por sua preocupação, zelo e dedicação inestimável nesse trabalho.

Aos professores Luiz e Paula, por todo apoio e incentivo.

Aos amigos de laboratório, pela alegria, pelo ambiente agradável de cooperação, pela amizade e por toda ajuda.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

(Dalai Lama)

RESUMO

Bactérias da espécie *Klebsiella pneumoniae* são responsáveis por uma série de infecções em pacientes debilitados e imunocomprometidos especialmente aqueles com longos períodos de permanência hospitalar e em uso de dispositivos invasivos. As principais complicações de infecções associadas a cateteres envolvem a colonização pelo micro-organismo e a formação de biofilme. Esta estrutura pode se desprender da superfície abiótica e circular nos fluidos corporais com todas as características de resistência. O uso de cateteres impregnados com antimicrobianos tem sido eficaz na redução de infecções de corrente sanguínea, inibindo a adesão do biofilme. Assim, este estudo buscou avaliar a formação de biofilme de *K. pneumoniae* em cateteres impregnados com antimicrobianos e antisséptico. Os segmentos dos cateteres venoso central, impregnados com N - acetilcisteína / Levofloxacina (NAC/LEV) e Clorerixidina / sulfadiazina de prata (CHX/SS), foram testados em triplicata contra a amostra de referência de *K. pneumoniae* ATCC 13883 e uma amostra clínica de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). Os testes de atividade e durabilidade das substâncias antimicrobianas no cateter foram realizados em três, sete, dez, 15 e 30 dias. Os segmentos foram incubados isoladamente em tubos contendo soro humano, em seguida, removidos e avaliados quanto à presença de zonas de inibição pelo teste de disco-difusão. A formação do biofilme nos segmentos foi avaliada por cultura quantitativa e microscopia eletrônica de varredura. O conhecimento da atividade e durabilidade de antimicrobianos nesses dispositivos permitiu avaliar sua efetividade contra a adesão do micro-organismo à superfície abiótica impregnada. A combinação de NAC/LEV obteve maior durabilidade na superfície do cateter do que aquele com CHX/SS, porém, este teve maior eficácia na inibição do biofilme mas com baixa durabilidade. O surgimento de subpopulações resistentes no cateter impregnado com NAC/LEV foi demonstrado desde o terceiro dia de incubação do segmento no soro para a amostra clínica. Quanto a presença de zonas de inibição, a amostra clínica teve halo de inibição inferior que a amostra de referência. A microscopia eletrônica confirmou os resultados da cultura quantitativa e mostrou algumas características do biofilme de *K. pneumoniae* tais como a matriz

de exopolissacarídeo - EPS, estruturas que promovem a adesão (curli) a superfície, além de sua organização, em ambas amostras. O soro humano contribui na formação dessa comunidade. A formação de biofilme de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase pode ocorrer em cateteres impregnados já no terceiro dia, embora o biofilme seja menos espesso. O surgimento de subpopulações resistentes pode comprometer a atividade do cateter e a terapia, tornando um real problema, principalmente quando se considera seu uso clínico em pacientes imunossuprimidos. O presente estudo contribuiu para demonstrar que cateteres impregnados com substâncias antimicrobianas possuem atividade limitada ao longo do tempo, podendo variar de acordo com o micro-organismo que coloniza o dispositivo médico. Entretanto maiores estudos são necessários para avaliar as características intrínsecas da estrutura, adaptabilidade do biofilme de *K.pneumoniae* _{KPC+} com outros micro-organismos, transferência de genes de resistência e expressão gênica.

PALAVRAS-CHAVE: *Klebsiella pneumoniae*. Cateter. Biofilme. Cateter Impregnado com antimicrobiano

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is responsible for several infections in impaired and immunosuppressed patients, especially those associated with long-term of hospital stay and the use of invasive medical devices. The major implication of this microorganism in catheters - associated infections involve bacterial' colonization and biofilm formation. Biofilm is a complex structure that could detach from the abiotic surface and circulate in body fluids with their resistance profile. The use of catheters impregnated with antimicrobial substances could effectively reduce blood stream infections, inhibiting microbial adherence and consequently the biofilm formation. This study aims to evaluate *in vitro* activity of antimicrobial drugs and the effectivity of the central venous catheter impregnated with antimicrobial and antiseptic regarding the biofilm formation and gene expression involved. Fragments of catheter venous central impregnated with N-acetylcysteine / levofloxacin (NAC / LEV) and Chlorhexidine / silver sulfadiazine (CH/SS) were assayed in triplicate against a standard strain *K. pneumoniae* ATCC 13883 and a clinical isolate of *K. pneumoniae* carbapenemase – producer. The activity and durability of antimicrobial substances on catheter's surface were tested in three, seven, ten, 15 and 30 days. The catheters were separately in tubes containing human serum. After that, they were removed and the sizes of the zones of inhibition evaluated using a modified Kirby-Bauer Disk diffusion test. *In vitro* biofilm colonization was assessed by quantitative culture and scanning electron microscopy. The knowledge of the activity and durability of antimicrobials in these devices allowed to evaluate their effectiveness against the adhesion of the microorganism to the impregnated abiotic surface. The NAC / LEV impregnated catheter obtained longer durability than the CH/SS catheter, but the second catheter was more effective in inhibiting biofilm but with low durability. The emergence of resistant subpopulations in the NAC / LEV impregnated catheter was demonstrated to the clinical isolated from the third day of segment incubation in the serum. As for the presence of zones of inhibition, the clinical isolated had lower inhibition halo than the reference sample. Scanning electron microscopy confirmed the results of the quantitative culture and showed

some features of the *K. pneumoniae* biofilm such as the exopolysaccharide matrix - EPS, structures that promote the adhesion (curli) to the surface, besides its organization, in both samples. Human serum contributed to the formation of this community. Biofilm formation of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* can occur on catheters impregnated as early as third day, although the biofilm is less thick. The emergence of resistant subpopulations can compromise catheter activity and therapy, becoming a real problem, especially when considering its clinical use in immunosuppressed patients. The present study contributed to demonstrate that impregnated catheters have limited antimicrobial activity over time and may vary according to the microorganism that colonizes the medical device. However, more studies are needed to evaluate the intrinsic features of the structure, the mechanism of adaptability *K.pneumoniae* KPC+ biofilm to other microorganisms, transfer of resistance genes and gene expression.

KEYWORDS: *Klebsiella pneumoniae*. Catheter. Biofilm. Catheter impregnated with antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Colônias de <i>K.pneumoniae</i> cultivadas em Agár Mac Conkey.....	22
Figura 02	Teste positivo para <i>K.pneumoniae</i> hipervirulenta	25
Figura 03	Genes que codificam os componentes estruturais e as subunidades envolvidas na montagem da membrana externa.....	27
Figura 04	Foto representativa dos cateteres utilizados.....	40
Figura 05	Avaliação dos halos de inibição induzidos pela atividade de (NAC/LEV), ao longo do tempo, nas amostras de <i>K. pneumoniae</i> de referência e KPC.....	46
Figura 06	Subpopulações resistentes à combinação NAC/LEV no sétimo dia para as amostras de referência e clínica	47
Figura 07	Avaliação dos halos de inibição das soluções antimicrobianas impregnadas (CHX/SS), ao longo do tempo.....	49
Figura 08	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 no lúmen do cateter venoso central (cateter controle)	55
Figura 09	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 extra lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e n-acetilcisteína e levofloxacina.....	56
Figura 10	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase (KPC) extra-lúmen na superfície do cateter venoso central (controle).....	57
Figura 11	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase extra-lúmen na superfície do polímero	58

	impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e Levofloxacina no terceiro dia.....	
Figura 12	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 no lúmen do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia.....	59
Figura 13	Crescimento do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 extra lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e levofloxacina.....	60
Figura 14	Formação do biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapemase no lúmen do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia.....	61
Figura 15	Fibras de adesão (curli) no biofilme de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapemase na superfície do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia.....	61
Figura 16	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> KPC+ extra-lúmen na superfície do cateter venoso central (controle) no décimo quinto dia.....	62
Figura 17	Crescimento do biofilme de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase extra-lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e Levofloxacina.....	63
Gráfico 01	Avaliação da atividade e durabilidade dos antimicrobianos impregnados nos cateteres (NAC/LEV), ao longo do tempo.....	45
Gráfico 02	Avaliação da atividade e durabilidade dos antimicrobianos impregnados nos cateteres (CHX/SS), ao longo do tempo.	48

Gráfico 03	Avaliação da implantação do biofilme da amostra referência <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 (Log UFC), ao longo do tempo.....	50
Gráfico 04	Avaliação da implantação do biofilme em <i>K. pneumoniae</i> KPC+ (Log UFC) ao longo do tempo.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Análise de regressão linear da variável dependente log/UFC, comparando com as variáveis independentes tempo, amostra bacteriana e tipo de cateter.....	53
Tabela 02	Análise de regressão linear da variável dependente tamanho do halo, comparando com as variáveis independentes tempo, amostra bacteriana e tipo de cateter.....	54
Tabela 03	Perfil de susceptibilidade da amostra clínica de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase e subpopulações resistentes a combinação de NAC/LEV....	96
Tabela 04	Tabela 2. Perfil de susceptibilidade da amostra de referência ATCC 13883 <i>K. pneumoniae</i> e subpopulações resistentes a combinação de NAC/LEV.....	98
Tabela 04	Perfil de interação sinérgica das subpopulações de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	100
Tabela 06	Perfil de interação sinérgica das subpopulações de <i>K. pneumoniae</i> KPC+	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADNc	DNA complementar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CHX	Clorhexidine
CPS	Cápsula polissacarídica
CVC	Cateter venoso central
EMB	Eosiona Azul de Metileno
EPS	Exopolissacarídeo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IDSA	Infectious Diseases Society of America
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LEV	Levofloxacina
LPS	Lipossacarídeo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NAC	N-acetilcisteína
PICCs	Cateteres centrais de inserção periférica
SS	Silver sulfadiazine
SHEA	<i>Society for Healthcare Epidemiology of America</i>
VPS	<i>Shunt</i> ventriculoperitoneal
UFC	Unidades formadoras de colônias
ZI	Zona de Inibição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> E A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	21
2.2	FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.1.1	A Cápsula Polissacarídica (CPS).....	23
2.2.2	Mucoviscosidade.....	25
2.2.3	Fímbrias: fatores de adesão e colonização.....	26
2.3	EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR <i>K. pneumoniae</i> RELACIONADAS A DISPOSITIVOS MÉDICOS.....	27
2.4	FORMAÇÃO DO BIOFILME EM <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
2.5.	ATIVIDADE ANTI-BIOFILME BACTERIANO EM CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS.....	33
2.5.1	Uso de clorexidina/sulfadiazina de prata.....	34
2.5.2	Uso de N-acetilcisteína e levofloxacina.....	35
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAS E MÉTODOS.....	39
4.1	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	39
4.1.1	CATETERES E SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS.....	39
4.1.2	PREPARO DOS CATETERES COM NAC E LEVOFLOXACINA.....	40
4.2	TESTE DE DURABILIDADE DAS SUBSTÂNCIAS NO CATETER.....	40
4.3	ANÁLISE DA IMPLANTAÇÃO DO BIOFILME <i>IN VITRO</i> POR CULTURA QUANTITATIVA.....	41
4.4	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	41
4.5	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS BACTERIANAS AVALIADAS E DAS SUBPOPULAÇÕES RESISTENTES A COMBINAÇÃO NAC/LEV	42
4.5.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE N-ACETILCISTEÍNA E LEVOFLOXACINA	43
4.5.2	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS SUBPOPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES À COMBINAÇÃO NAC/LEV	43
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44

5	RESULTADOS.....	45
5.1	DURABILIDADE DA COMBINAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS CATETERES AVALIADOS.....	45
5.1.1	Durabilidade da combinação de N-acetilcisteína e Levofloxacina.....	45
5.1.2	Durabilidade da combinação de Clorexidina e Sulfadiazina de Prata.....	48
5.2	CULTURA QUANTITATIVA E ATIVIDADE ANTI-BIOFILME ENTRE OS CATETERES IMPREGNADOS.....	49
5.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO BIOFILME.....	54
5.4	ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA COMBINAÇÃO TESTADA...	64
5.5	ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS SUBPOPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES À COMBINAÇÃO NAC/LEV.....	64
6	DISCUSSÃO.....	65
6.1	DURABILIDADE DA COMBINAÇÃO DA SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS CATETERES AVALIADOS	65
6.2	CULTURA QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-BIOFILME ENTRE OS CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS	69
7	SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE.....	95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As infecções associadas a dispositivos invasivos, médicos-odontológicos, incluindo cateteres intravenosos e urinários, próteses vasculares, *shunts*, válvulas cardíacas, de diálise peritoneal e implantes dentários representam um grande problema de saúde pública (FRANCESCHI; CUNHA,2010; HENRIQUE,2013; VENTURINI *et al.*,2016). A baixa adesão dos profissionais a protocolos de procedimentos, às técnicas de higienização das mãos, ao uso de barreira de precaução e às medidas de controle de infecções nesses dispositivos dificulta a qualidade assistencial e agrava os riscos para o paciente (VALENCIA *et al.*, 2016).

O uso de cateter venoso central (CVC) contribui substancialmente para complicações em pacientes submetidos a procedimentos de hemodiálise, nutrição parenteral e administração de quimioterápicos. O risco de complicações após a instalação destes dispositivos está associado as rotas de contaminação desse dispositivo com a microbiota da pele no sítio de inserção do cateter; contaminação do hub do cateter pela manipulação; contaminação hematogênica; contaminação com solução de infusão e também à sua remoção, especialmente quando se trata de infecções de corrente sanguínea. Os altos custos para os serviços de saúde e a elevada mortalidade dos pacientes apontam para a necessidade de um gerenciamento clínico cuidadoso e o desenvolvimento de novas estratégias de cuidados com esses dispositivos (NEVES *et al.*, 2010).

O uso do cateter central de inserção periférica(PICC) vem aumentando nos últimos anos como resultado da facilidade de sua implantação, do baixo custo e da habilidade de tratar pacientes fora das instituições de saúde, quando comparado com o CVC. Entretanto o uso de ambos os dispositivos apresenta os mesmos desafios, de prevenir a infecção da corrente sanguínea e de evitar a formação de biofilme (BAXI *et al.*, 2013).

O biofilme é uma comunidade estrutural bacteriana coberta por uma matriz extracelular composta de moléculas orgânicas, com ou sem constituintes do hospedeiro, firmemente aderidos à superfície do cateter. O biofilme pode ser encontrado no ambiente hospitalar, industrial e na natureza associados às superfícies inertes, especialmente

dispositivos médicos de uso interno ou externo (SHPIGEL *et al.*, 2015; PROIA *et al.*, 2016). Estudos recentes identificaram a formação de biofilme, promovendo incrustações em cateteres urinários e implantes urológicos (YU *et al.*, 2016).

Muitos são os aspectos envolvidos na formação do biofilme, um dos principais ocorre quando fragmentos dessa comunidade bacteriana se despreendem da superfície de dispositivos médicos e circulam nos fluidos corporais. Estes fragmentos destacados contêm todas as características de resistência da comunidade parenteral (MENGI *et al.*, 2013). E podem ser capaz pela via hematogênica depositar-se em outro sítio e reiniciar a colonização. No interior do biofilme a susceptibilidade das bactérias aos antimicrobianos é drasticamente diminuída, contribuindo para falhas terapêuticas (BETJES, 2011).

Para que a formação do biofilme ocorra, há necessidade da ativação do sistema bacteriano de *quorum sensing*. Essa via promove a detecção de pequenas moléculas responsáveis por iniciar uma cascata de sinalização e alterar a expressão de genes em resposta a uma população bacteriana. Essencialmente ela promove a comunicação intercelular, a expressão de fatores de virulência e a resistência a antimicrobianos (SIDDIQ, DAROUICHE, 2012).

Infecções relacionadas ao biofilme são de difícil erradicação porque a comunidade de micro-organismos possui maior proteção contra a ação de macrófagos e de resistência a antimicrobianos, do que as células livres (SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Além disso, bactérias multirresistentes podem promover a transferência de genes de resistência no interior do biofilme (MAHESHWARI *et al.*, 2016).

Alguns estudos têm demonstrado que *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escheriachia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp*, *Streptococci haemolytic*, *Staphylococcus coagulase negativo* e *Pseudomonas aeruginosa* são os mais importantes micro-organismos relacionados a infecções associadas a cateter venoso central, sendo que esse perfil varia de acordo com a população estudada (VISCOLI *et al.*, 2005; BICUDO *et al.*, 2011; LAUPLAND, 2013).

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases são responsáveis por uma série de infecções em pacientes debilitados e imunocomprometidos, principalmente quando associados a longos períodos de

permanência hospitalar e à realização de procedimentos invasivos (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Dentre estas amostras, destacam-se espécies de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) que representam um importante desafio clínico, devido à sua capacidade de propagação, bem como a ampla resistência a antimicrobianos, levando a limitadas opções de tratamento (BEIRÃO *et al.*, 2011).

Entre as carbapenemases descritas na literatura a que possui maior relevância é a enzima *klebsiella pneumoniae* carbapenemase, nome atribuído devido à sua primeira detecção ter sido em *K. pneumoniae*. O gene que codifica esta enzima é o *bla_{KPC}*, localizado em elementos genéticos móveis (transposons), e que conferem uma alta capacidade de disseminação e transmissão, além de estar associado a determinantes de resistência aos antimicrobianos (ARNOLD *et al.*, 2011; CIFUENTES *et al.*, 2012). Ribeiro e colaboradores (2016) identificaram em São Luís, no Maranhão que entre 297 amostras clínicas, 100 foram positivas para o gene *bla_{KPC}*, com elevada positividade em *Klebsiella pneumoniae* e em outros Gram negativos não fermentadores.

Surtos relacionados a este patógeno emergente foram descritos principalmente em unidades de cuidados intensivos (AGODI *et al.*, 2011; TOFTELAND *et al.*, 2013), onde são identificados fatores de riscos que predispõem pacientes vulneráveis à aquisição de infecção no ambiente hospitalar (QURESHI *et al.*, 2012). O grupo de pessoas mais susceptível é composto principalmente por idosos, com múltiplas co-morbidades incluindo diabetes *mellitus* e imunossupressão, com hospitalização prévia ou de longo tempo, em uso de cateteres intravasculares e urinários e, aqueles sob ventilação mecânica (SNITKIN *et al.*, 2012).

A expansão da virulência de linhagens de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) foi mostrado por Andrade e colaboradores (2014) que relacionaram uma importante coexistência de *K. pneumoniae* ST11, um clone de alto risco e fatores de virulência associados a adesão, formação de biofilme, habilidade de colonizar superfícies e mecanismos antifagocitose em hospitais terciários brasileiros.

O uso e manutenção de cateteres representam um desafio no que se refere à prevenção e controle de infecções associadas a esses dispositivos ou ainda de fragmentos que se desprendem de biofilmes aderidos e que podem levar a complicações nos pacientes e à resistência ao tratamento da infecção. Para tanto, alguns estudos

sugerem que os cateteres impregnados com antimicrobianos ou antissépticos podem ser uma medida de controle de colonização (CHEMALY, 2010; CRNICH, MAKI 2004; JENKINSON *et al.*, 2014).

Pesquisas com cateteres cobertos com clorexidina/sulfadiazina de prata têm mostrado redução significativa na incidência de bacteremia, sem nenhum risco substancial relacionado à resistência bacteriana (DAROUCHE *et al.*, 1999; HOCKENHULL *et al.*, 2009; RUPP *et al.*, 2005). Além disso, seu uso e comercialização já foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) ainda em 1990 e recomendado pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2011 para a prevenção de colonização por biofilme (O'GRADY *et al.*, 2011; RAAD *et al.*, 2012).

Nas diretrizes para a “Prevenção de Infecções Relacionadas a Cateteres Intravasculares” o CDC recomenda o uso de cateteres impregnados com antimicrobiano/antisséptico tais como: clorexidina/sulfadiazina de prata ou minociclina/rifampicina em pacientes com cateter venoso central que devem permanecer com o dispositivo por mais de cinco dias. Depois de bem sucedida, a implantação tem por finalidade reduzir o risco de infecções de corrente sanguínea, considerando ainda como estratégia global os seguintes cuidados: capacitar as pessoas responsáveis pela inserção e manutenção de cateteres, utilizar precauções máximas de barreiras estéreis e uma preparação alcoólica de clorexidina > 0,5% para antisepsia da pele durante a inserção do CVC (O'GRADY *et al.*, 2011).

Apesar disso, ainda são constantes os investimentos e desafios para reduzir a colonização de dispositivos de longa permanência. A partir dessa preocupação, Mansouri *et al.* (2013) sugeriram que uma combinação de levofloxacina com N-acetilcisteína poderia ser eficaz no controle da colonização por *K. pneumoniae* em cateteres.

A levofloxacina é um antibacteriano da classe das fluoroquinolonas, que em altas doses e regime de curta duração maximiza a sua atividade bactericida, dose e concentração dependente (ANDERSON; PERRY, 2008). Um estudo sobre o efeito comparativo entre a atividade antimicrobiana da ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina em *K. pneumoniae* demonstrou que 75% das amostras testadas foram susceptíveis a ciprofloxacina e levofloxacina (GRILLON *et al.*, 2016).

Por outro lado, a n-acetilcisteína (NAC) embora não seja um antibiótico, possui propriedades antibacterianas, trata-se de um agente mucolítico que destrói ligações de dissulfeto no muco, reduzindo a viscosidade das secreções. Estudos descreveram sua capacidade de reduzir a formação de biofilme de diversas bactérias e ainda promover o rompimento do biofilme maduro (ASLAM,2007; ASLAM; DAROUICHE,2011; MOHSEN *et al.*, 2015).

Fundamentado pela literatura, o presente estudo propõe avaliar os efeitos da combinação N-acetilcisteína e levofloxacina em cateteres impregnados quanto à formação de biofilme por uma amostra de referência, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, e por uma amostra clínica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) na superfície do dispositivo, assim como analisar a atividade da associação antimicrobiana no controle da colonização. O mesmo se aplica ao cateter coberto com clorexidina/sulfadiazina de prata.

Buscar-se-á ainda, observar a durabilidade da ação antimicrobiana dessas substâncias nos dispositivos ao longo do tempo e estudar a dinâmica da colonização da superfície dos dispositivos pelas duas amostras bacterianas.

A escolha deste micro-organismo deveu-se à sua relevância clínica e epidemiológica e ainda à necessidade de mais trabalhos que abordem a formação do biofilme por *Klebsiella pneumoniae* em dispositivos revestidos por substâncias com atividade antimicrobiana, especialmente em amostras KPC.

Os resultados obtidos poderão contribuir para uma melhor compreensão a respeito do comportamento de amostras de *K. pneumoniae* no processo de formação do biofilme em cateteres impregnados ou não com substâncias com atividade antimicrobiana. Informação relevante diante de um cenário de resistência bacteriana emergente, dos desafios do tratamento de pacientes em uso de CVC, principalmente durante internação prolongada, seguida por doenças infecciosas relacionadas ao seu uso.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae* E A RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram negativo pertencente à família das Enterobacteriaceae, anaeróbio facultativo, não-esporulado, imóvel e capsulado. Como características bioquímicas, são fermentadores de lactose, produzem a enzima urease (algumas linhagens hidrolisam a ureia lentamente), não produzem indol (propriedade que a distingue da espécie *K. oxytoca* que é indol positivo) e não são capazes de produzir sulfeto de hidrogênio (CABRAL, 2011). Embora seja encontrado no ambiente, incluindo solo e em dispositivos médicos, o micro-organismo coloniza a mucosa humana, incluindo o trato intestinal e a orofaringe (DESTA *et al.*,2016; MARTIN *et al.*,2016).

O bacilo foi primeiramente descrito por Friedlander em 1882, que acreditava que esse micro-organismo era responsável por grande parte dos casos de pneumonia bacteriana (KO *et al.*, 2002; MONTGOMERIE,1979;). Inicialmente, nomeado de bacilo de Friedlander, o gênero *Klebsiella* spp., assim classificado somente em 1885, por Trevisan em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs, que em 1887, também descreveu a espécie *Klebsiella pneumoniae* (MARTÍNEZ *et al.*, 2004; SHON *et al.*, 2013).

Três espécies relativamente próximas, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella rhinoscleromatis* são definidas como *pathovars* (refere-se a linhagens que possuem características similares, mas que são diferentes quanto a subespécie e perfis bioquímicos) porque causam diferentes doenças no trato respiratório. Casos de infecções por *K. ozaenae* são mais raros e são descritos em doenças crônicas do trato respiratório, especialmente rinite atrófica (ozena). Podem também serem isolados do escarro, da urina e, excepcionalmente, do sangue. *K. rhinoscleromatis* causa rinoscleroma ou escleroma respiratório (um tumor do nariz) (CAPUTO *et al.*,2015).

O isolamento dessas bactérias *in vitro* é realizado em meios de cultura sólidos, como ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e ágar MacConkey, incubados em condições aeróbias, apresentando colônias grandes de consistência mucoide (Figura 01).



Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2017

Figura 01 - Colônias de *Klebsiella pneumoniae* cultivadas em Agár Mac Conkey

A patogenicidade de *K. pneumoniae* pode ser aumentada devido a diferentes fatores de virulência tais como: cápsula polissacarídica que confere proteção contra fagocitose; produção de adesinas fimbriais e não fimbriais que facilitam a aderência bacteriana a estruturas de tecidos e superfícies abióticas, tais como dispositivos invasivos de uso médico (SHON; RUSSO *et al.*, 2012). Existem mais de 70 sorotipos de *K. pneumoniae* descritos, entre esses sorotipos capsulares, os mais estudados são o K1 e K2. Além deles, são conhecidos por serem hipervirulentos, os sorotipos K5, K16, K20, K54, e K57 capazes de colonizar e causar infecções em humanos (KO, 2016).

A cápsula confere, ainda o fenótipo de hipermucoviscosidade à *K. pneumoniae* que constitui um dos seus principais fatores de virulência. O aspecto apresentado pelas colônias se deve à grande produção de cápsula polissacarídica constituída pelo antígeno K (MARTINS, 2014). Os genes associados à expressão de cápsula (*wabG*, *uge* e *ycfM*) são comumente encontrados em *K. pneumoniae* e promovem resistência à fagocitose aumentando a sua patogenicidade (CANDAN *et al.*, 2015).

K. pneumoniae tem emergido como uma importante espécie causadora de infecções adquiridas nos serviços de saúde, especialmente entre pacientes internados em unidades neonatais de cuidados intensivos, a incidências de mortalidade pode chegar a 70% (GRAY *et al.*,2012; SALEEM *et al.*,2013). Ao longo das duas últimas décadas, a incidência de infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes a antimicrobianos tem aumentado, principalmente em pacientes imunocomprometidos, debilitados, com longa permanência hospitalar e com uso de dispositivos invasivos (BEN-DAVID *et al.*, 2010, 2011 e 2012).

As enzimas β -lactamases foram primeiramente descritas em amostras de *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens* na Europa em 1983 e nos Estados Unidos em 1986 (KNOTHE *et al.*, 1983 QUINN *et al.*,1989). As β -lactamases de espectro estendido são enzimas mediadas por plasmídeos que hidrolisam os oximino- β -lactâmicos. Estes plasmídeos também carregam genes de resistência a outros antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclina. As bactérias Gram negativas que possuem esses elementos móveis são multirresistentes e capazes de transmissão plasmidial entre diferentes espécies (GUPTA *et al.*,2003).

O aumento na incidência e disseminação global de linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC) estimulou novos estudos para o tratamento e o diagnóstico. Essas amostras foram fenotipicamente identificadas como suscetíveis aos carbapenêmicos, principalmente ao inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Além disso, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por linhagens produtoras de carbapenemases, são basicamente restritas à tigeciclina e à polimixina (ARNOLD *et al.*, 2011; BEIRÃO *et al.*, 2011; DIENSTMANN *et al.*, 2010).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1 A Cápsula Polissacarídica (CPS)

O termo cápsula é usado para descrever uma camada de superfície elaborada por polissacarídeos associados, cuja composição é muito dependente do organismo, podendo ser espessa ou delgada, rígida ou flexível de acordo com sua natureza química.

Pode associar-se de maneira compacta ou frouxa, à parte externa da parede celular, onde o material capsular frouxamente associado também pode ser chamado de glicocálice (DZUL *et al.*,2011).

A cápsula (CPS) desempenha um papel crítico na proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, além de inibir a ativação ou absorção dos componentes do sistema complemento C3b, inibindo também a capacidade funcional dos macrófagos. Quase todos os membros da família *Enterobacteriae* produzem cápsula, possuindo propriedades que têm sido fortemente associadas a infecções extraintestinais, como sepse, meningite e infecções urinárias (REGUEIRO *et al.*, 2006 ; SCHEMBRI *et al.*, 2005).

A análise dos mecanismos patogênicos de uma bactéria requer o entendimento da composição da superfície celular bacteriana. Clements *et al.* (2008) descreveram a habilidade da *K. pneumoniae*, mediada pela cápsula e o LPS (lipossacarídeo), em se proteger contra os mecanismos do sistema imune. A cápsula impede a associação da célula eucariótica com o micro-organismo e o LPS aumenta essa associação, porém, de uma forma não específica. Isto ressalta a importância de se considerar não só a adesina específica ligante estudada em ensaios de aderência, mas também as interações não específicas iniciais mediadas pelas forças eletrostáticas.

A cápsula que é classificada em diferentes subunidades, possui 77 tipos sorológicos designados antígenos K, que são essenciais para a virulência de *Klebsiella* spp. Como mencionado, o material capsular protege a bactéria de fagocitose e evita sua morte por fatores séricos bactericidas (VUOTTO *et al.*, 2014).

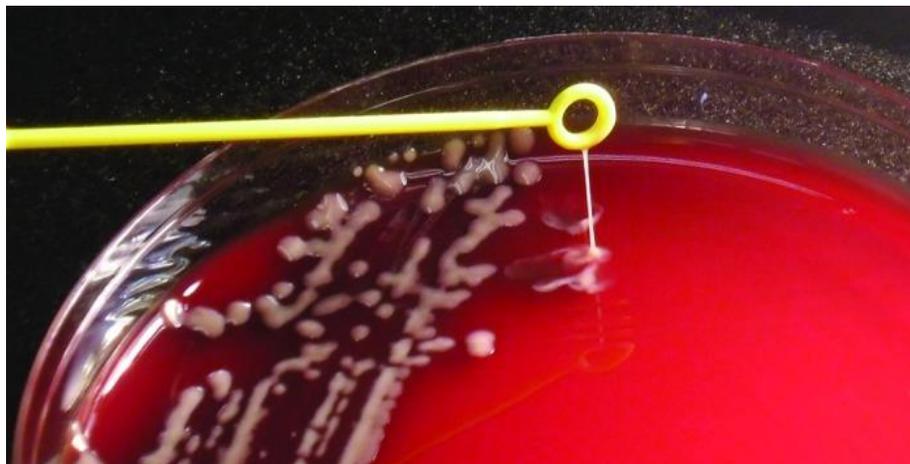
Nos tratos urinário e intestinal, a adesão dessas bactérias às células do hospedeiro é aumentada, representando um importante fator de virulência. A produção de anticorpos opsonizantes é um importante aspecto da imunidade para *K. pneumoniae*. Struve *et al.* (2003) e Domenico *et al.* (1994) afirmaram que a cápsula polissacarídea mediava resistência à opsonização na fagocitose. Nesse estudo, tanto as células livres de cápsula quanto as células associadas a ela possuíam propriedades antifagocíticas.

2.2.2 Mucoviscosidade

Um nova linhagem de *K. pneumoniae* que possui um gene associado com a mucoviscosidade surgiu em 1998, em Taiwan (YU *et al.*, 2008). O gene A relacionado com esse fenótipo (*magA*) foi primeiramente detectado em abscesso hepático e estava relacionado com hipermucoviscosidade, resistência ao soro humano e a fagocitose (LEE *et al.*, 2010; ZAMANI *et al.*, 2013).

O gene *magA* codifica uma proteína de membrana externa que é essencial para a formação de uma cadeia exopolissacarídica protetora, relacionada com a virulência bacteriana e a mucoviscosidade do sorotipo K1. A enzima codificada pelo gene *magA* funciona como uma polimerase envolvida na síntese da capsula (NAMIKAWA *et al.*, 2016).

O fenótipo de hipermucoviscosidade é caracterizado pela formação de cordas viscosas e mucoides superiores a 5 mm de comprimento (Figura 02), quando a alça bacteriológica passa pela colônia (LIN *et al.*, 2012; WU, *et al.*, 2011).



Fonte: Shon *et al.* (2013, p.108)

Figura 02 - Teste positivo para *K. pneumoniae* hipervirulenta

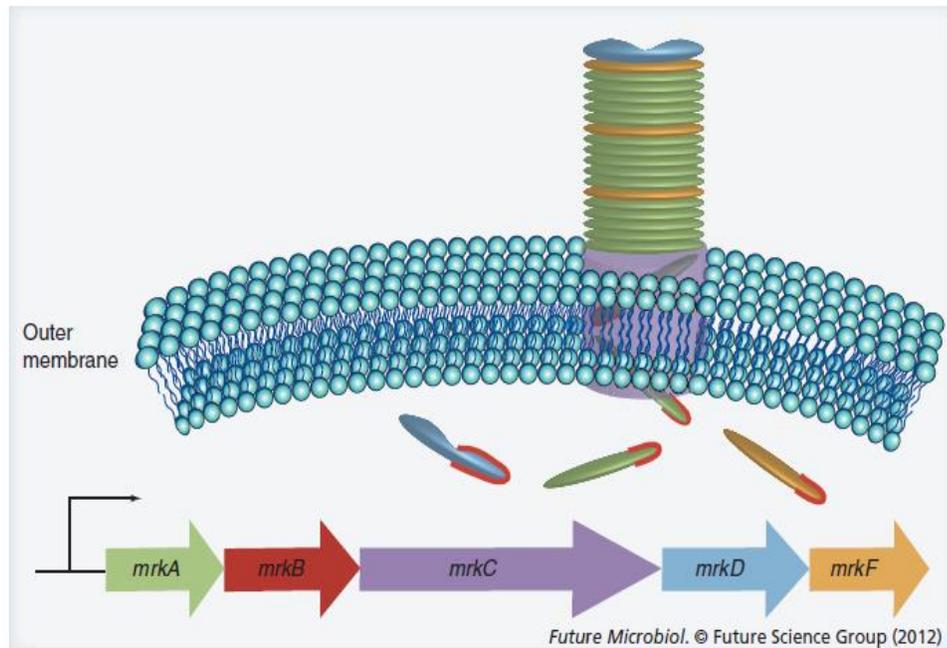
2.2.3 Fímbrias: fatores de adesão e colonização

A maioria das bactérias Gram negativas possui fímbrias, que são estruturas filamentosas proteicas, menores e mais numerosos que o flagelo não formando ondas regulares. Tais apêndices permitem a aderência a superfícies ou à célula do hospedeiro, importante principalmente no seu ambiente natural ao permitir a fixação bacteriana aos tecidos, como também à formação do biofilme (PROFT *et al.*, 2009).

As fímbrias consistem em múltiplas subunidades não covalentemente unidas uma a outra ou a enzimas, podendo ser removida da superfície bacteriana por cisalhamento ou por meio da dissociação dos ligantes não covalentes. A família de fímbrias mais estudada nas bactérias Gram negativas é aquela formada pelas chaperonas, incluindo a Pap e a tipo 1 de *E. coli*. O número de fímbrias parece ser determinado pela disponibilidade de proteína na ponta, já que a mesma serve como iniciador para a formação de uma nova estrutura (SCOTT, *et al.*, 2006).

As adesinas fimbriais são responsáveis por reconhecer uma série de receptores direcionando a bactéria ao tecido específico no hospedeiro. *Klebsiella spp.* apresentam dois principais tipos de fímbrias: o tipo 1 e o tipo 3 (Mrk). A primeira é delgada, com forma de fio, podendo se estender para além da matriz capsular, sendo encontrada virtualmente em todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, além de ser capaz de mediar a adesão de D-manose à célula epitelial hospedeira. O tipo 1 possui propriedade adesiva devido à presença da adesina FimH localizada na ponta da fímbrias. A fímbria tipo 3 possui de 3 a 4 µm de comprimento e é composta da proteína MrkA e da adesina MrkD. Além dos genes que codificam a subunidade fimbrial mrkA e aderência mrkD, os genes *MrkB*, *mrkC*, *mrkE* parecem estar envolvidos na montagem do filamento fimbrial e na regulação da expressão da fímbria tipo 3. O produto do gene *mrkF* é necessário para manter a estabilidade do filamento fimbrial na superfície da célula (ALLEN *et al.*, 1991; BURMØLLE, M. *et al.*, 2008; SCHEMBRI *et al.*, 2005).

As fímbrias são codificadas pelo gene *MRK cluster* (ABCDF MRK) que é constituído por cinco genes (Figura 03) que codificam a estrutura e montagem dos componentes dos apêndices (MURPHY ; CLEGG , 2012).



Fonte: Murphy e Clegg (2012,p.994)

Figura 03 - Genes que codificam os componentes estruturais e as subunidades envolvidas na montagem da membrana externa

K. pneumoniae expressam tanto a fímbria tipo 1 quanto a do tipo 3, sendo a última mais amplamente identificada como apêndice que intermedia a formação do biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Ainda que esses fatores sejam pouco conhecidos, estudos recentes demonstraram que a expressão do gene é regulada por níveis intracelulares de GMP cíclico (MURPHY; CLEGG, 2012).

2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR *K. pneumoniae* RELACIONADAS A DISPOSITIVOS MÉDICOS

K. pneumoniae é considerado um importante patógeno oportunista em pacientes hospitalizados, podendo causar infecções extra intestinais, tais como infecções urinárias (ALKHATEEB *et al.*; JEAN *et al.*,2016), bacteremias (HUANG *et al.* 2016, infecções relacionadas a dispositivos médicos (AL-MOUSA *et al.*,2016; JAHANI-SHERAFAT *et al.*,2015; SAHLI *et al.*,2016), pneumonia associada a ventiladores mecânicos (GUO *et al.*, 2016) e pneumonia adquirida na comunidade (CAMPOS *et al.*, 2016; HAYDEN *et al.*, 2014).

Geralmente essas infecções são difíceis de serem tratadas devido à maioria das amostras clínicas de *K. pneumoniae* exibir resistência a vários antimicrobianos. As enterobactérias em particular, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* são os principais micro-organismos relacionados a infecções associadas a cateteres urinários, bacteriúria e bexiga neurogênica (FLORES-MIRELES, *et al.*, 2015; HOOTON *et al.*, 2010).

A bacteriúria associada à presença de cateter é a mais comum infecção relacionada a cuidados de saúde em todo mundo, resultado da utilização generalizada de sondagem vesical e de forma inadequada em hospitais. Os cuidados que vão desde a inserção até a manutenção desse dispositivo são muitas vezes negligenciados, conduzindo a casos recorrentes de infecção e resistência antimicrobiana (HOOTON *et al.*, 2010).

Ghafourian *et al.* (2012) avaliaram 288 amostras clínicas de *K. pneumoniae* procedentes de pacientes com infecção urinária de três hospitais iranianos, os resultados demonstraram que quase 50% dos isolados eram produtores de beta-lactamase de espectro estendido exibindo uma elevada resistência às cefalosporinas de terceira geração.

Acredita-se que o fenótipo de hiper mucoviscosidade esteja correlacionado com a presença do gene de virulência *rmpA* em amostras mais patogênicas na comunidade (WH *et al.*, 2010). Geralmente amostras bacterianas isoladas de infecções urinárias da comunidade causam grande preocupação, principalmente quando pertencentes ao grupo resistente a celalosporinas (CTX-ESBLs). A presença dessa enzima pode levar a falhas no tratamento empírico e complicações da infecção de trato urinário, já instalada (MARTINEZ *et al.*, 2012). Além das beta-lactamases de espectro estendido, vários fatores de virulência de *K. pneumoniae* estão envolvidos em sua patogênese, principalmente a cápsula, sideróforos e adesinas (RANJBAR *et al.*, 2016).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado de infecção aguda de trato urinário pode evitar a disseminação da infecção por bactérias Gram-negativas, particularmente as enterobactérias, evitando complicações tais como a formação de abscessos hepáticos invasivos ou abscessos prostáticos (LIAO *et al.*, 2016).

A síndrome do abscesso hepático invasivo é causada por subtipos hipervirulentos de *K. pneumoniae*. Essa síndrome está associada com o fenótipo de hipermucoviscosidade de linhagens de *K. pneumoniae*, principalmente as que possuem os gene A (*magA*) e um plasmídeo regulador do fenótipo mucoide A *rmpA* (MCCABE *et al.*,2010; NADASY *et al.*,2007).

O uso clínico de cateteres tem se tornado uma rotina na prática hospitalar, seja para monitoramento hemodinâmico do paciente, terapia de substituição renal, suporte nutricional ou na administração de medicação e, o seu uso tem tempo de permanência variável (FRASCA *et al.*,2010; MOREAU *et al.*,2013).

Em consequência ao aumento do uso e manutenção desse dispositivo, estima-se 80.000 infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter venoso central (ICSRC) na unidade de terapia intensiva ocorreram nos Estados Unidos (MERMEL,2009). Apesar da diminuição de 46% dos casos entre 2008 e 2013, atualmente ocorrem 30.100 casos/ano de ICSRC no país segundo relatório do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC,2015).

Quando a infecção relacionada ao uso de cateteres é identificada, o tratamento requer a remoção do dispositivo, além de um regime adequado de terapia antimicrobiana sistêmica. Em casos graves, a infecção pode progredir para eventos sépticos e mortalidade. A responsabilidade na troca e manutenção desses dispositivos vai além do cuidado com a pele, duração de uso, preferência de sítios de inserção e da escolha do cateter ideal para a necessidade de cada paciente (SCHIAVONE *et al.*, 2010).

O uso de cateteres centrais de inserção periférica (PICCs) tem aumentado recentemente, principalmente na unidade de terapia intensiva pediátrica e em pacientes dentro e fora das instalações intensivas de cuidado. Convencionalmente, os PICCs têm sido usados na quimioterapia, terapia antimicrobiana intravenosa, nutrição parenteral e administração de medicamentos. Assim como o cateter venoso central, muitos são os protocolos e cuidados para avaliar e prevenir infecções relacionadas ao dispositivo, tais como programa de educação em saúde e avaliação clínica (ADVANI *et al.*, 2011; BAXI *et al.*, 2013; FRASCA *et al.*, 2010).

Um estudo de coorte multicêntrico realizado por Milstone e colaboradores (2013) com um total de 4.797 PICCs posicionados em 3.967 neonatos, mostrou que 149 dos

pacientes que faziam uso desses, apresentaram infecção de corrente sanguínea. O risco de aquisição aumentava duas semanas após a inserção do dispositivo, permanecendo elevada até a sua remoção. O estudo de Siqueira e colaboradores (2011) identificou como fator de risco o sítio de inserção no cateterismo venoso central.

A descrição de espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases era incomum nos Estados Unidos até 1992, no entanto essas bactérias vêm sendo comumente associadas a casos de infecções, principalmente as do trato urinário, respiratórias e bacteremias. Desde o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC+) no País em 2001, linhagens desta espécie têm se propagado globalmente nos serviços de saúde (DI CARLO *et al.*, 2011; MARRA *et al.*, 2006).

A possibilidade de co-infecção com outras bactérias, principalmente em pacientes idosos e imunocomprometidos, além daqueles que usam dispositivos intravenosos, acarreta maior risco. O primeiro caso de bacteremia simultânea por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e *E. coli* em um paciente brasileiro foi descrito por Leão e colaboradores, em 2010. Embora amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC+) tenham sido relacionadas a casos de infecções sistêmicas e nosocomiais nos últimos anos, quando se avalia as infecções associadas ao uso de dispositivos intravenosos, esse número aumenta (CHUN-MING *et al.*, 2012; CLANCY *et al.*, 2013).

O estudo de Zarkotou e seus colaboradores (2011) identificou as fontes prováveis de bacteremia por *K. pneumoniae* KPC positivas em pacientes hospitalizados. A maioria foi associada ao uso de cateter venoso central (30), infecções do trato respiratório (12), do trato urinário (7), pele (6), tecido mole (4), sistema nervoso central (1), sendo que grande parte desses pacientes (71,7%) encontravam-se hospitalizados na unidade de terapia intensiva.

2.4. FORMAÇÃO DO BIOFILME EM *Klebsiella pneumoniae*

A estrutura do biofilme confere uma vantagem de sobrevivência aos micro-organismos associados nessa estrutura, que incluem a resistência às forças de cisalhamento, a resistência à fagocitose e a agentes antimicrobianos. Estudo realizado

por Trautner e Darouiche (2004) avaliando a formação do biofilme em cateteres urinários, identificou produtos extracelulares e componentes do hospedeiro depositados, contribuindo para a adesão dos micro-organismos ao dispositivo.

Após a inserção do cateter venoso central, a superfície torna-se coberta por proteínas plasmáticas, particularmente fibrinas. Bactérias da microbiota da pele migram ao longo do trajeto do cateter e incorporam-se às proteínas plasmáticas, colonizando o dispositivo. O mesmo se aplica aos cateteres centrais de inserção periférica que podem permanecer dias ou até semanas, determinando um risco de complicações infecciosas e não infecciosas (FLETCHER *et al.*, 2005).

A colonização e adesão das superfícies internas e externas do lúmen desses dispositivos intravasculares por micro-organismos, geralmente está associada à presença de proteínas sanguíneas, fibrinogênicas e fluidos relacionados à terapia, que favorecem a formação do biofilme. Murga *et al.* (2001) demonstraram em um estudo controlado em laboratório o efeito dos componentes sanguíneos na extensão do biofilme formado por bactérias Gram-negativas e, ainda sugeriram que a mesma via de acesso utilizada para administração de medicamento e usada para retirada de sangue pode aumentar o crescimento de bactérias Gram negativas na porta do acesso.

No estágio inicial do biofilme, os micro-organismos estão irreversivelmente aderidos à superfície abiótica pela produção de polímeros extracelulares e pela formação de microcolônias. Além de consistir em uma organização celular complexa, o biofilme é regulado por *quorum sensing*, processo que promove a comunicação intercelular e troca de sinais entre bactérias, e está associado ao aumento da resistência a antimicrobianos (BALABAN *et al.*, 2003; MERRITT *et al.*, 2011).

É sabido que alterações na biossíntese da cápsula modificam o fenótipo celular de *K. pneumoniae*. A complexa interação entre essa biossíntese, a formação do biofilme e a expressão das fímbrias vem sendo descritas como fatores de virulência que permitem colonizar facilmente dispositivos médicos (BODDICKER *et al.*, 2006. Em estudo realizado por Huang *et al.* (2014), foi observado que a ausência da cápsula aumentou a formação do biofilme, um provável efeito decorrente do operon *pga*, enquanto linhagens testadas com diferentes deleções na biossíntese da cápsula produziram menos biofilme.

Diferentemente, Balestrino *et al.* (2008) e Wu e seus colaboradores (2011) demonstraram, por análises microscópicas e de interrupção de genes, que a cápsula é necessária para a cobertura inicial do substrato e a construção arquitetural do biofilme maduro, assim como também o LPS está envolvido na adesão inicial. Estes resultados deram uma nova visão sobre os fatores bacterianos sequencialmente associados com a capacidade de colonizar uma superfície abiótica, como dispositivos médicos e revelaram os papéis desempenhados por exopolissacarídeos de superfície durante a formação de biofilme por *K. pneumoniae*.

Em ordem de combinação de fatores para a formação dessa complexa matriz, as fímbrias dos tipos 1 e 3 desempenham importante papel na adesão a superfícies. Em *K. pneumoniae* as fímbrias tipo 3 foram encontradas como fortes promotoras da formação do biofilme, mediando a adesão intercelular no interior do biofilme especialmente em superfícies inertes sendo assim, um importante fator de virulência em infecções do trato urinário (SCHROLL *et al.*, 2010).

Stahlhut *et al.* (2010) identificaram nove clones relacionados com o aumento na formação do biofilme. Cinco desses clones continham genes *cluters* de fímbria tipo 3 exibindo um aumento de quatro vezes na espessura do biofilme formado em cateteres.

O estudo de Hennequin e colaboradores (2012) encontrou amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, altamente resistentes à cefotaxima que, mesmo em concentrações sub-inibitórias, aumentava a formação do biofilme. Os autores ressaltaram a habilidade dessa bactéria em transferir plasmídeos, principalmente quando inserida em biofilme, demonstrando a capacidade da espécie em sobreviver em ambiente hospitalar.

A persistência da infecção associada ao biofilme é primariamente devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos exibidas pelas células do biofilme. Existem vários fatores que atuam em conjunto para proporcionar um aumento no nível geral de resistência no biofilme, incluindo a capacidade dos antimicrobianos de atingir as células ou a função individual de cada gene expresso no biofilme. Assim, as células no interior do biofilme respondem a todas as mudanças ambientais que possam encontrar (MAH, 2012).

2.5. ATIVIDADE ANTI-BIOFILME BACTERIANO EM CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Devido à formação do biofilme em dispositivos invasivos e a predisposição às infecções associadas ao seu uso, muitas tecnologias têm sido criadas na tentativa de diminuir a incidência dessas. Uma delas consiste na associação de antimicrobianos (ex. minociclina e rifampicina) ou antissépticos (ex. clorexidina e sulfadiazina de prata) na superfície de cateteres intravasculares (WASSIL *et al.*, 2007).

Em um ensaio clínico com 356 cateteres divididos em dois grupos (cobertos e não cobertos com antimicrobianos), Hanna *et al.* (2004), identificaram 17 cateteres relacionados à infecção da corrente sanguínea, sendo três associados a cateteres impregnados com rifampicina e minociclina e 14 associados a cateteres não impregnados. Dairouiche e colaboradores (1999) realizaram um ensaio similar com 865 cateteres, também demonstrando menor incidência de infecções quando o dispositivo estava impregnado com antimicrobianos. Entre 382 cateteres impregnados com clorexidina e sulfadiazina de prata e 356 cateteres impregnados com rifampicina e minociclina somente 87 (22,8%) e 28 (7,9%) respectivamente, foram colonizados.

O estudo de Parker *et al.* (2015) avaliou infecções associadas a *shunt* do líquido cefalorraquidiano, considerado uma das maiores causas de morbidade e mortalidade no tratamento da hidrocefalia. Os pesquisadores realizaram uma revisão retrospectiva a partir dos registros médicos de 287 hospitais nos Estados Unidos a fim de identificar a incidência de infecções de *shunt* cerebral, associadas ao uso de cateteres impregnados com antimicrobianos e aos cateteres padrão. Os autores concluíram que os cateteres associados com antimicrobianos apresentaram uma significativa redução da infecção tanto para adultos (2,2% contra 3,6%) quanto para pacientes pediátricos (2,6% contra 7,1%) resultando em uma economia de custo de US\$ 42.125 e US\$ 230.390, respectivamente. Valor equivalente à aquisição de 100 novos *shunts* pediátricos e adultos.

Do mesmo modo, na Inglaterra, a infecção associada ao *shunt* ventrículo peritoneal (VPS) foi a causa de aproximadamente 8% dos casos primários de hidrocefalia. Avaliando o uso na rotina médica, Jenkinson *et al.* (2014) realizaram um

estudo randomizado com 1.200 pacientes de 17 clínicas neurológicas. Os autores compararam o uso de cateteres impregnados com rifampicina e clindamicina e aqueles impregnados com prata, além da resistência aos antimicrobianos. O estudo foi o primeiro a determinar que o uso de *shunt* ventriculoperitoneal impregnado com antimicrobianos e prata, reduzia precocemente as infecções nesse dispositivo, sendo potencialmente benéfica ao paciente e a prática neurocirúrgica atual.

Assim como todos os dispositivos invasivos, o uso de cateter urinário não está livre de riscos. A colonização por bactérias uropatogênicas em cateteres urinários resulta na formação de biofilme e eleva a infecção do tecido circundante. Muitas vezes há necessidade de remoção do cateter, além disto, as infecções associadas ao biofilme são de difícil tratamento, uma vez que a resistência aos antimicrobianos é cerca de 1.000 vezes maior. Burton *et al.* (2006) desenvolveram compostos com atividade anti-biofilme contra as amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, determinando a atividade inibitória *in vitro* contra *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Ao cobrir cateteres de silicone, os autores demonstraram que o inibidor N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato acetiltransferase (GlmU) utilizado e sulfato de protamina foram promissores para revestimentos de dispositivos médicos.

2.5.1 Uso de clorexidina/sulfadiazina de prata

A clorexidina é um antiséptico catiônico e desinfetante descrito em 1950, ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus envelopados e fungos. Em concentrações maiores que 100µg/mL a clorexidina é bactericida, promove a desnaturação das proteínas citoplasmática levando a morte celular, enquanto que em concentrações inferiores, é bacteriostática ao inibir as enzimas na membrana bacteriana e ao interromper as interações entre lipídios e proteínas, levando ao aumento da permeabilidade e ao extravasamento dos componentes celulares (GUPTA *et al.*, 2012).

As soluções com clorexidina são amplamente utilizadas em procedimentos clínicos como os pré-operatórios, introdução de cateteres, uso tópico em feridas e tratamentos odontológicos como no controle de agentes causadores da placa dental e na

prevenção de gengivites (ALMEIDA *et al.*,2010; KIKLIS *et al.*,2014; MAZZO *et al.*,2012; PEDROLO *et al.*,2014).

O CDC recomenda o uso de clorexidina a 2% diariamente na antisepsia da pele a fim de reduzir infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres. No uso tópico, a clorexidina se liga covalentemente à pele e às proteínas da mucosa resultando em um efeito antimicrobiano com absorção sistêmica limitada. O uso de cateteres impregnados com antissépticos e/ou antimicrobianos, tais como clorexidina/sulfadiazina de prata e minociclina/rifampicina é recomendado desde 2011 em paciente com indicação do uso deste por mais de cinco dias (CALOGIURI *et al.*,2013; O'GRADY *et al.*,2011).

Allan *et al.* (2012) realizaram um estudo comparativo em modelo *in vivo* entre cateter cobertos com cloredixina e não cobertos, os dispositivos cobertos com o antisséptico foram capazes de reduzir significativamente a colonização e prevenir a migração de *Staphylococcus aureus* quando comparado com o cateter padrão sem cobertura.

Em outro estudo Raad e colaboradores (2012), visando aumentar o espectro de ação antimicrobiano de cateteres cobertos com minociclina/rifampicina, adicionaram clorexidina e avaliaram o efeito dessa combinação contra amostras clínicas de MRSA, *E. faecium* resistente à vancomicina (VRE), *P. aeruginosa*, *Candida albicans* e *C. glabrata*. Os autores observaram inibição completa da formação de biofilme dos micro-organismos testados com o efeito prolongado superior a três semanas e atividade antimicrobiana mais eficaz.

2.5.2 Uso de N-acetilcisteína e levofloxacina

Embora ainda não sejam comercializados, os cateteres impregnados com a combinação de N-acelticisteína e levofloxacina possuem excelente atividade antimicrobiana e anti-biofilme. Mansouri *et al.* (2013) demonstraram maiores zonas de inibição contra *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina (MRSE), *S.aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, e *E. coli*, reduzindo a colonização por todos os micro-

organismos testados contudo, a durabilidade do efeito antimicrobiano diminuiu acentuadamente de acordo com o tempo de permanência do cateter.

A levofloxacina é uma quinolona de segunda geração (fluoroquinolona) ativa contra bactérias Gram-negativas e Gram positivas. O mecanismo de ação das fluoroquinolonas é expresso através de sua interação com topoisomerases tipo II, a DNA-girase e a topoisomerase IV, enzimas essenciais para a replicação do cromossomo e para a transcrição e reparação do DNA. A inibição da topoisomerase bacteriana pela levofloxacina determina a fragmentação do cromossomo bacteriano sendo responsável por sua atividade bactericida (LUZZARO, 2008).

Embora as fluoroquinolonas sejam uma das maiores classes de agentes antimicrobianos utilizados, muitos estudos descrevem resistência mediada por plasmídeos principalmente em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* ssp. e outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ROBICSEK *et al.*, 2006; RODRÍGUEZ, 2005). Os mecanismos de resistência incluem a produção das proteínas das famílias Qrn (QnrA, QnrB e QnrS), mutações nos genes do cromossomo da enzima topoisomerase IV, que é essencial para o crescimento bacteriano e na DNA-girase, desta forma reduzindo a permeabilidade da membrana ou aumentando a expressão das bombas de efluxo (QepA) (BAMBEKE *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008).

Vários são os estudos que tentam demonstrar a potencial efetividade da combinação de antimicrobianos com outras substâncias (ASLAM, 2007; ASLAM e DAROUICHE, 2011). A N-acetilcisteína (NAC) tem aumentado a atividade terapêutica de vários antimicrobianos e atuado em importantes processos na formação do biofilme em aço inoxidável de dispositivos médicos e cateteres, incluindo a capacidade de degradar o polissacarídeo extracelular da matriz e romper biofilmes maduros, assim agindo como uma substância antibiofilme (MOHSEN *et al.*, 2015).

Efrati *et al.* (2007) demonstraram que a NAC foi capaz de atuar na matriz do biofilme ao promover o aumento da eficácia terapêutica da vancomicina, que sozinha não teve nenhum efeito significativo sobre as células embebidas em biofilmes. Esta atividade da NAC pode resultar no desprendimento de células, individualmente ou em grupos, fazendo com que o biofilme e células bacterianas isoladas sejam mais susceptíveis à ação de outros agentes antimicrobianos e à ação das células do sistema imunológico.

Assim, o papel da NAC como um mucolítico na segmentação da matriz e desprendimento de células pode ser uma ajuda importante para a erradicação de infecções associadas aos biofilmes.

Mohsen *et al.* (2015) mostraram a atividade antibacteriana e antibiofilme da N-acetilcisteína em associação com fármacos anti-inflamatórias não esteroidais na aderência de *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* à superfície de cateteres. Essa combinação foi capaz de inibir a aderência das linhagens testadas com um alto efeito no desprendimento do biofilme maduro.

Embora não seja um antimicrobiano, mas um agente mucolítico usado no tratamento médico de pacientes com bronquite crônica, a NAC tem mostrado grandes resultados ao diminuir a formação do biofilme. No estudo de Olofsson *et al.* (2003) a NAC foi eficaz em reduzir e prevenir a formação do biofilme na superfície de aço inoxidável em fábricas de papel, diminuindo o crescimento de monoculturas e comunidades bacterianas múltiplas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de antimicrobianos e de antissépticos utilizados no revestimento de cateteres quanto à formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o tempo de permanência e atividade da combinação de antimicrobiano e antissépticos na superfície dos segmentos de cateteres colonizados pela amostra de referência *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e uma clínica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases (KPC);
- Determinar a concentração inibitória mínima e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras testadas;
- Avaliar a implantação do biofilme por cultura quantitativa pelas amostras de referência e KPC nos cateteres impregnados ou não com as substâncias com atividade antimicrobiana;
- Pesquisar as características morfológicas dos biofilmes, formados pelas amostras de referência e KPC, nos cateteres impregnados ou não com as substâncias com atividade antimicrobiana, por microscopia eletrônica.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram avaliadas quanto à formação de biofilme em três diferentes tipos de cateter venoso central duas amostras de *Klebsiella pneumoniae*: uma de referência, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e uma amostra clínica de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC).

A amostra clínica *K. pneumoniae* produtora de KPC - 2 pertencente à coleção bacteriana do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, cedida pela professora Mara Corrêa Lelles Nogueira.

4.1.1 CATETERES E SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS

Os experimentos foram realizados em cateter venoso central, triplo lúmen 7 Fr, 20 cm, composto de poliuretano (Trilucath), como cateter controle.

O mesmo tipo de cateter foi impregnado com uma de combinação de N-acetilcisteína (NAC) e Levofloxacina (LEV), baseado no método de Mansouri *et al.* (2013) (Figura 04). Além disso, o cateter impregnado com cloredixina/sulfadiazina (CHX/SS) (Arrowgard Blue Plus; Arrow International, Inc., Reading, PA), composto de poliuretano, duplo lúmen, 7Fr, com 20 cm disponível comercialmente, também foi testado (Figura 04).



Fonte: Arquivo pessoal do autor,2017

Figura 04 - Foto representativa do kit de inserção (Cateter,dilatador de veia,guia metálico com ponta em J,agulha de punção,seringa de 05mL e redutor de sutura).

4.1.2 PREPARO DOS CATETERES COM NAC E LEVOFLOXACINA

Segmentos de um centímetro foram imersos em solução contendo 100 mg/mL de NAC e 100 mg/mL de Levofloxacina com concentrações previamente descritas por Mansouri *et al.* (2013); Aslam e Darouiche (2011), seguida de secagem *overnight* e lavagem com água destilada estéril para remoção de resíduos não aderidos.

4.2 TESTE DE DURABILIDADE DAS SUBSTÂNCIAS NO CATETER

Segmentos com um centímetro de cada um dos três tipos de cateteres, impregnado com NAC/LEV, com CHX/SS e o controle (sem impregnação), foram testados em triplicata para avaliação da formação e/ou da inibição do biofilme pelas amostras de *K. pneumoniae* mencionadas acima.

Cada segmento foi colocado individualmente em tubos contendo 1mL soro controle de origem humana liofilizado (Qualiset) e incubados a 24h por 37°C para aumentar a formação e ligação de proteínas sanguíneas, com troca semanal do soro.

O segmento do cateter parcialmente embebido foi colocado no centro da placa de ágar Mueller-Hinton (Becton Dickinson®, USA) com suspensão bacteriana 10^8 CFU/mL espalhada uniformemente e previamente incubada a 37°C, após isso incubado por 24h adicionais. Assim, foi possível observar a zona de inibição do crescimento

bacteriano demonstrando a atividade e durabilidade da combinação de Levofloxacina e N-acetilcisteína e do segmento com clorexidina/sulfadiazina de prata. Os testes foram processados em três, sete, dez, quinze e trinta dias que correspondem aproximadamente ao período que o cateter venoso central pode permanecer inserido *in vivo*.

O parâmetro adotado para avaliar a zona de inibição e definição dos dias avaliados foi baseado em estudos anteriores descritos por Mansouri *et al.* (2007) e (2013), em que os tamanhos das zonas de inibição eram avaliados medindo a distância perpendicular ao eixo longo do segmento de cateter.

4.3 ANÁLISE DA IMPLANTAÇÃO DO BIOFILME *IN VITRO* POR CULTURA QUANTITATIVA

O modelo de Stahlhut modificado (2012) foi adotado para colonização de biofilme no cateter. O segmento anteriormente embebido em soro humano e submetido ao teste de atividade antimicrobiana foi transferido para caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) contendo $2,0 \times 10^5$ células do micro-organismo previamente crescidas a 37°C por 24h e assim incubados por mais 24 horas adicionais com o segmento. O inóculo, em seguida, foi descartado e o segmento lavado por duas vezes com 1ml e submetido ao agitador com controle de temperatura por 30 minutos com 5 mL de salina estéril, sendo removido com o auxílio de uma pinça estéril e adicionado 5 mL de salina a 0,9% em um tubo Falcon para sonicação por 5 minutos a 40 KhZ. Após a sonicação, foi retirada uma alíquota de 100µl de cada amostra da solução para a diluição seriada, que foram semeadas em ágar Mac Conkey (OXOID®, Basingstoke, ENGLAND) e ágar *Trypticase Soy Agar* (OXOID®, Basingstoke, ENGLAND), para a contagem de colônias.

4.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para avaliar a formação do biofilme e os efeitos da combinação NAC/LEV e da CLX/SP por microscopia eletrônica, foram usados dois segmentos de 1 cm, correspondendo ao cateter coberto com antimicrobianos ou antisséptico e o cateter controle. Os segmentos foram separados assepticamente com o auxílio de uma pinça

estéril e incubados individualmente em tubos contendo 2×10^5 UFC/mL de suspensão ajustados em densidade ótica (OD), de acordo com o item 4.2.

Em seguida, os fragmentos dos cateteres foram brevemente lavados com solução fisiológica estéril a 0,9%, transferidos para frascos vazios para a fixação primária com solução tampão (5% glutaraldeído em 0,1M), sendo posteriormente desidratadas em consonância com o protocolo do Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG.

A fixação química inicial responde pela integridade da amostra e também por torná-la condutora garantindo a manutenção da forma e da resistência do biofilme. Os fragmentos de cateteres contendo o biofilme foram devidamente fixados, desidratados com acetona ou etanol até o ponto crítico no aparelho de Ponto Crítico Balzer CPD030 e, posteriormente substituído por gás carbônico liquefeito CO₂ na câmara de secagem. A despressurização lenta dessa câmara até a pressão atmosférica garante que o espécime seja removido seco e sem alterações. O espécime foi então montado no suporte porta amostras do microscópio (*stub*) e cobertos com uma camada condutora de platina a fim de produzir um potencial elétrico que posteriormente será necessário para produção de elétrons e formação da imagem.

A estrutura do biofilme foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura Quanta FEG 3D FEI no Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG. A amostra foi inclinada sob o feixe eletrônico a fim de se observar as dimensões do efeito antimicrobiano, o grau de colonização e aderência dos micro-organismos aos cateteres, entre os segmentos impregnados e o controle e as características do biofilme formado.

4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS BACTERIANAS AVALIADAS E DAS SUBPOPULAÇÕES RESISTENTES A COMBINAÇÃO NAC e LEV

4.5.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE N-ACETILCISTEÍNA E LEVOFLOXACINA

As amostras de *K. pneumoniae* (referência e clínica), foram submetidas à avaliação da interação sinérgica entre a levofloxacina e a N-acetilcisteína pelo teste de

microdiluição *checkboard* usando caldo Mueller Hilton (BBL™) em microplacas com 96 poços e de fundo chato, avaliada depois de 20h de incubação a 37°C. Os controles de crescimento e esterilidade foram testados em todas as placas. Os agentes antimicrobianos foram diluídos a partir da solução estoque e deixados em concentrações quatro vezes superiores a concentração final da placa, em seguida foram realizadas diluições seriadas de N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich®) e Levofloxacina (Sigma-Aldrich®) para criar diferentes concentrações da combinação em cada poço NAC (8 µg/mL a 512µg/mL) e LEV (0,015 µg/mL a 8 µg/mL).

A concentração bacteriana final adicionada em cada poço foi de 10⁵ UFC/mL. O cálculo do índice de concentração inibitória fracional (FICI) realizado foi baseado no modelo descrito por (SOPIRALA, M.M. *et al.* 2010). A interpretação do FICI corresponde ao (CIM do fármaco A em combinação) / (CIM do fármaco A sozinho) + [(CIM do fármaco B em combinação) / (CIM do fármaco B sozinho)]. O sinergismo foi definido como FICI de < 0,5; aditivo, FICI de >0.5 a < 1; nenhuma interação (indiferente), FICI entre >1 e < 4; antagonismo, FICI > 4. (PHITAKTIM S.*et al.*, 2016).

4.5.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS SUBPOPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES À COMBINAÇÃO NAC E LEV

As subpopulações bacterianas obtidas no terceiro, sétimo e décimo quinto dia de incubação no teste de durabilidade das substâncias NAC e LEV, foram submetidas avaliadas quanto aos perfis de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos utilizados na prática clínica.

Essa análise foi feita pelo sistema automatizado VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy l'Etoile, FRANCE), utilizando-se o cartão para bactérias Gram negativas, AST-N239. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com o CLSI, 2015.

As amostras de *K. pneumoniae* ATCC 13883 e aquela produtora de KPC foram utilizadas como controle dos testes.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

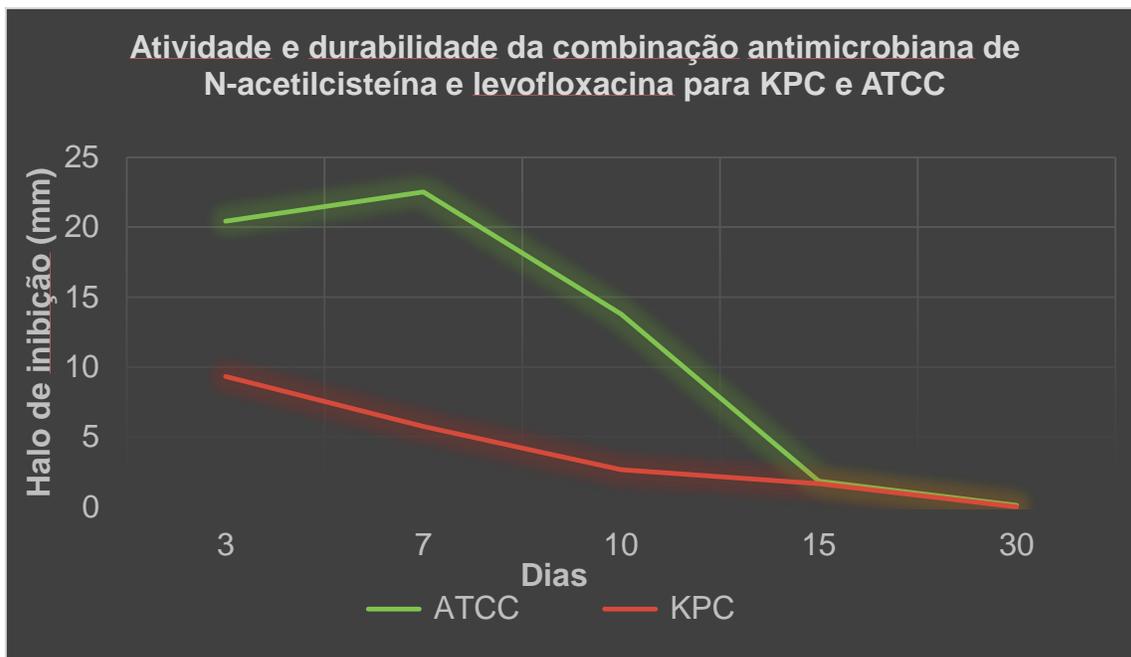
O programa Stata versão 12.0 (STATA Corp., TX, USA) foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Foram consideradas duas variáveis respostas ou variáveis dependentes, o número de células bacterianas recuperadas (em Log 10 UFC) e a medição dos halos de inibição (em milímetros). Escolheu-se a análise de regressão linear para comparar as duas variáveis resposta com as variáveis independentes: tempo (três, sete, dez, 15 e 30 dias), tipo de cateter (controle, sem drogas; impregnado com N-acetilcisteína e levofloxacina; e impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata).

5 RESULTADOS

5.1 DURABILIDADE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS CATETERES AVALIADOS

5.1.1 Durabilidade da atividade de N-acetilcisteína e levofloxacina

Os resultados obtidos nesta avaliação mostram o declínio da atividade da antimicrobiana do cateter impregnado com (NAC/LEV) ao longo do tempo como demonstrado no Gráfico 01.

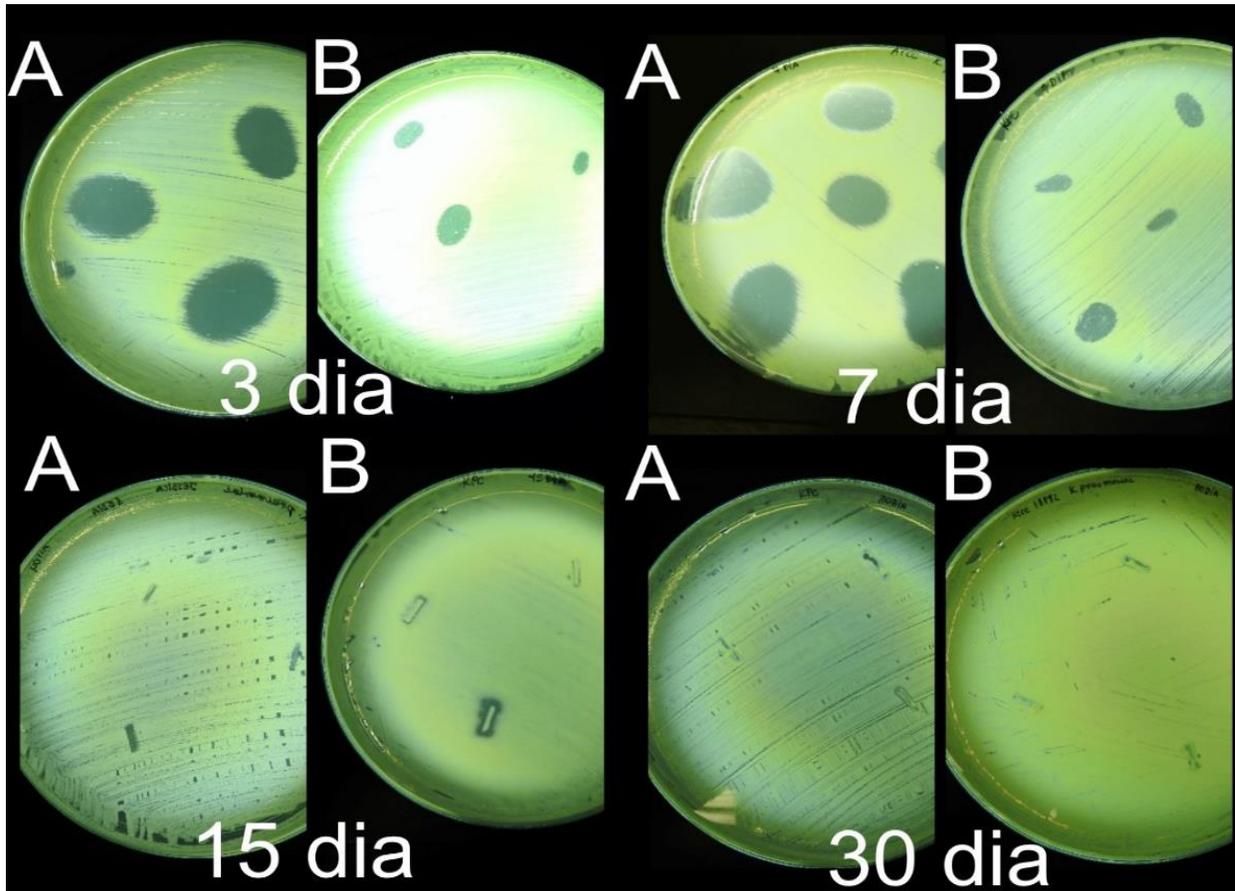


Fonte: Elaborada pelo autor, 2017

Gráfico 01 - Avaliação da atividade e durabilidade dos antimicrobianos impregnados nos cateteres (NAC/LEV), ao longo do tempo.

Inicialmente a combinação de NAC + LEV no cateter promoveu o tamanho médio de 20,4 mm do halo inibição do crescimento contra a amostra referência enquanto a amostra clínica apresentou um tamanho médio de 9 mm. A durabilidade da combinação com atividade antimicrobiana no cateter permaneceu até o 30º dia, entretanto a partir do

sétimo dia já pode ser observado um declínio significativo da atividade das substâncias químicas, entre as amostras testadas. O declínio da atividade da substância antimicrobiana no cateter foi acompanhado do surgimento de subpopulações resistentes nas zonas dos halos de inibição (Figura 05).

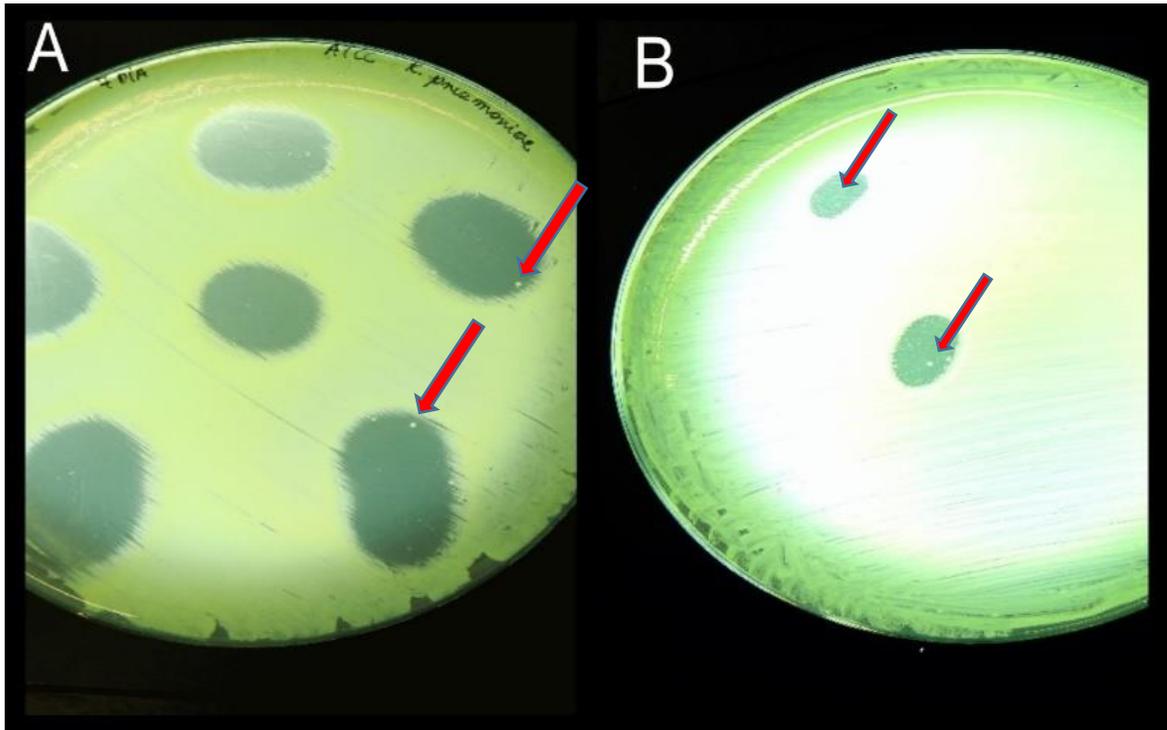


Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2017.

A - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; B - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

Figura 05 - Avaliação dos halos de inibição induzidos pela atividade de (NAC+LEV), ao longo do tempo, nas amostras de *K. pneumoniae* de referência e KPC.

A presença de subpopulações resistentes à combinação testada iniciou precocemente (3º dia) para amostra de KCP, enquanto a amostra de referência apresentou somente no sétimo dia (Figura 06).



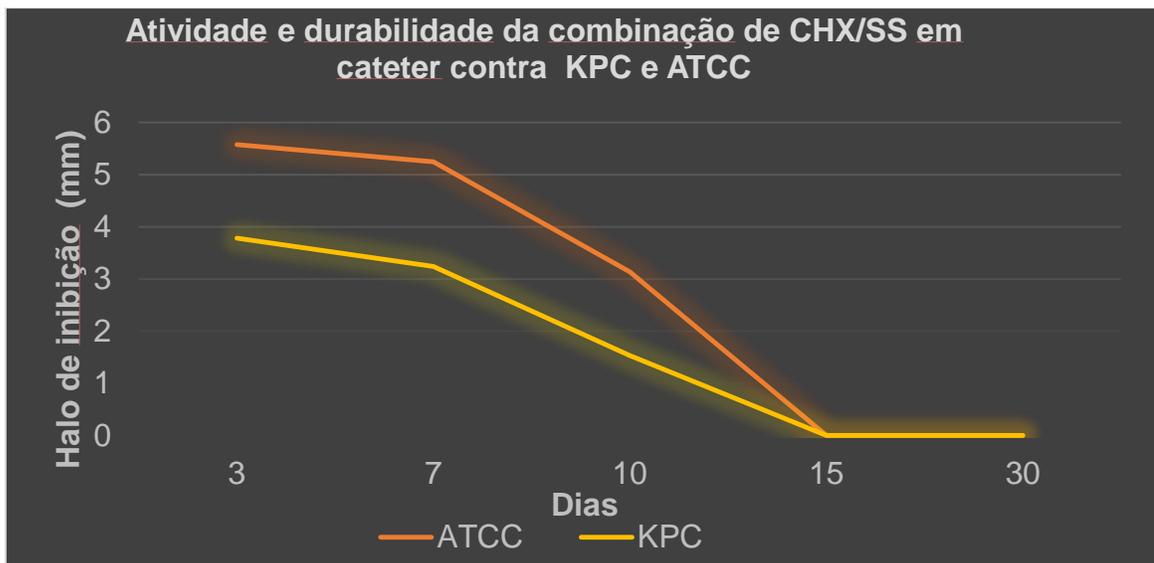
Fonte: Arquivo pessoal do autor,2017.

A - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; B - *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

Figura 06 - Subpopulações resistentes à combinação NAC+LEV no sétimo dia para as amostras de referência e clínica.

5.1.2 Durabilidade da combinação de Clorexidina e Sulfadiazina de Prata

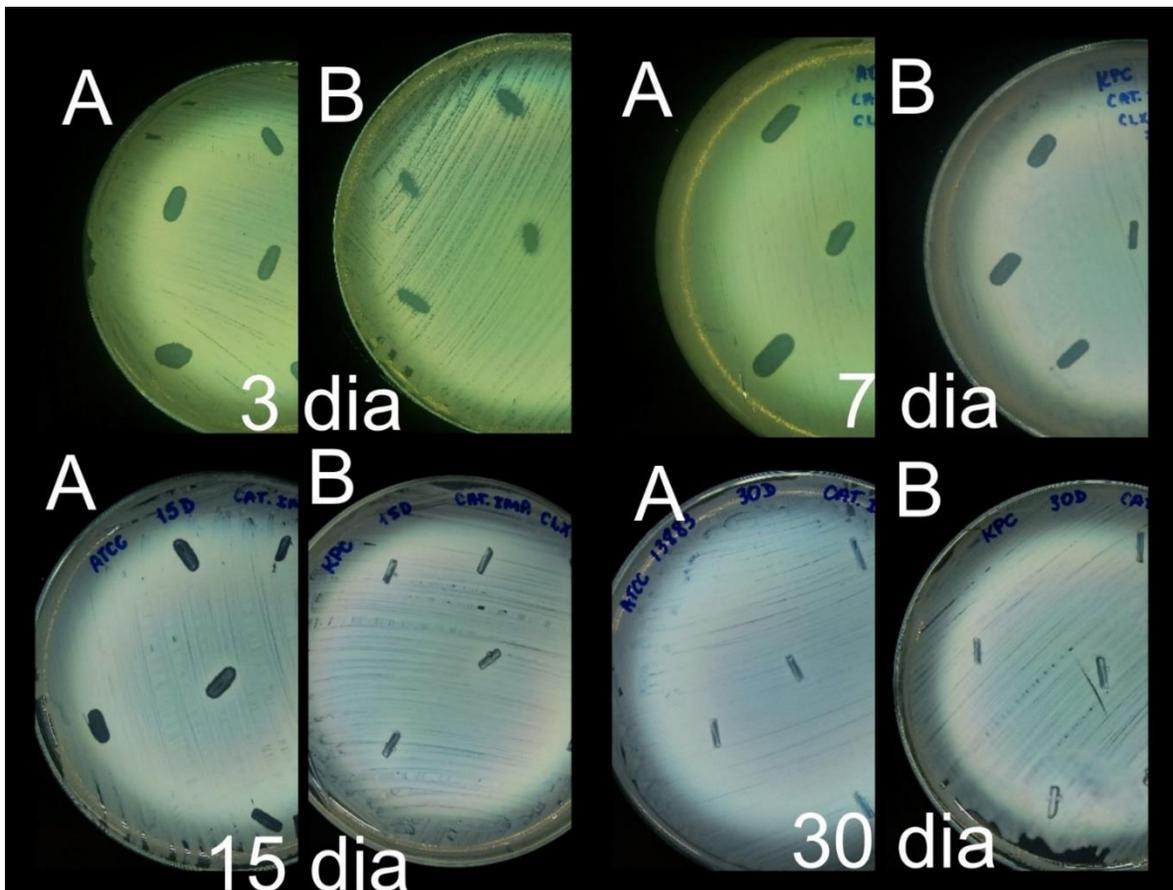
A durabilidade da combinação entre CLX +SP permaneceu até o 15º dia (Gráfico 02). No terceiro dia, o tamanho médio dos halos de inibição contra a amostra clínica foi de 3,8mm enquanto que para a amostra de referência o tamanho médio foi de 5,6mm. A partir do sétimo dia percebe-se o declínio no tamanho dos halos de inibição.



Fonte: Elaborada pelo autor

Gráfico 02 - Avaliação da atividade e durabilidade dos antimicrobianos impregnados nos cateteres (CLX+SP), ao longo do tempo.

A redução dos tamanhos foi detectada até o trigésimo dia, em que a combinação presente nos segmentos já não possuía atividade para inibir o crescimento microbiano (Figura 07).



Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2017.

A - *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; B – *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC

Figura 07 - Avaliação dos halos de inibição das soluções antimicrobianas impregnadas (CLX+SP), ao longo do tempo

Apesar da evidente atividade contra a colonização do cateter, nos tempos iniciais, e da inibição precoce da formação do biofilme, os experimentos realizados comprovam que seu benefício, ao longo do tempo, é bastante limitado.

5.2 CULTURA QUANTITATIVA E ATIVIDADE ANTI-BIOFILME ENTRE OS CATETERES IMPREGNADOS

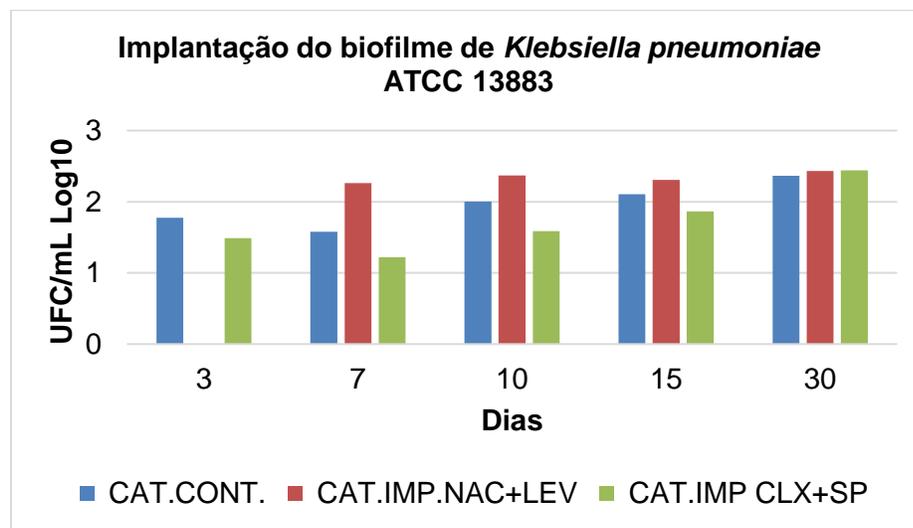
A cultura quantitativa das células do biofilme, após a sonicação do segmento do cateter, mostrou que a formação de biofilme ocorreu diferentemente nos três tipos de

cateter: cateter controle, cateter impregnado com (NAC/LEV) e o cateter impregnado com (CHX/SS).

Apesar das diferenças iniciais, a partir do décimo quinto dia, o número de células obtidas do biofilme tendem a permanecer iguais, correspondendo ao período em que os cateteres impregnados perdem sua atividade antimicrobiana e/ou antisséptica e passam a ser equivalentes ao controle.

Não foi observada a formação de biofilme pela amostra de referência, *K. pneumoniae* ATCC 13883, em fragmentos de cateteres impregnados com (NAC/LEV) no terceiro dia de incubação, por meio de cultura quantitativa. No entanto, a partir do sétimo dia houve crescimento microbiano, com números de células superiores ao cateter controle, permanecendo assim até o trigésimo dia.

No trigésimo dia de avaliação todos os cateteres testados apresentaram formação de biofilme. Nesse período, notou-se que, independentemente dos cateteres estarem impregnados ou não eles já não possuíam atividade antimicrobiana demonstrando a limitação das soluções impregnadas.



Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2017.

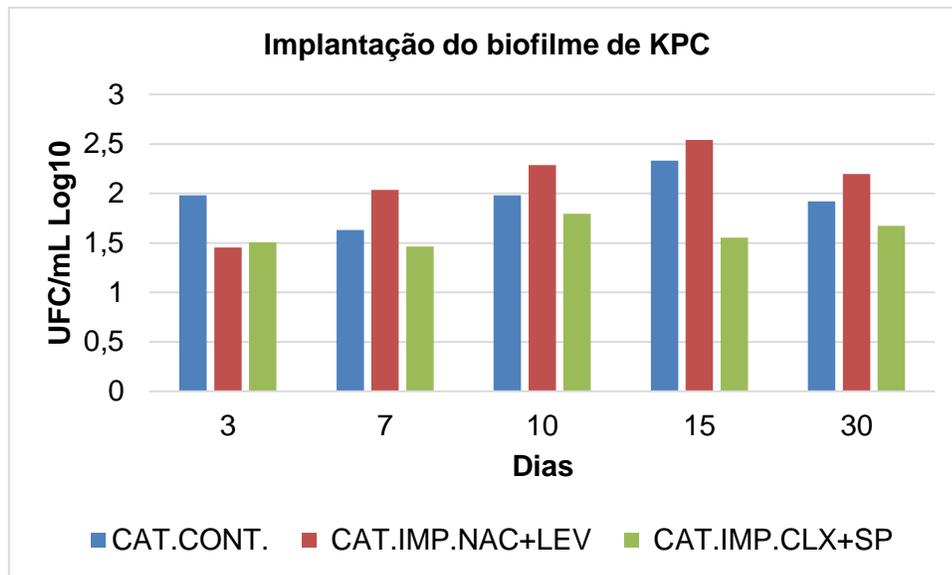
Gráfico 03 - Avaliação da implantação do biofilme da amostra referência *K. pneumoniae* ATCC 13883 (Log UFC), ao longo do tempo.

No terceiro dia de incubação em soro humano observou-se que, devido à atividade da combinação antimicrobiana/antisséptica nos segmentos de cateter, a

amostra clínica (KPC) apresentou notável diferença em UFC/mL Log₁₀, conseqüentemente com menor formação de biofilme, quando comparada com o controle (cateter sem antimicrobiano). Os cateteres impregnados (NAC/LEV) e (CHX+SS) obtiveram 1,45 UFC/ml Log₁₀ e 1,50 UFC/ml Log₁₀ nesse dia, com uma discreta diferença entre os cateteres (Gráfico 4).

Diferentemente do tempo inicial, no sétimo dia de incubação do cateter impregnado com (NAC/LEV), observou-se a formação de biofilme com número superior de células, quando comparado ao cateter impregnado com (CHX/SS) e ao controle. A contagem de células a partir do biofilme permaneceu elevada até o trigésimo dia de incubação. Detectou-se, também, o surgimento de subpopulações resistentes nas zonas dos halos de inibição e que permaneceu até o décimo quinto dia, período em que o cateter impregnado está quase perdendo sua atividade.

Por outro lado, o cateter comercialmente disponível (CHX/SS) apresentou episódios discretos de declínio e ascensão de sua atividade antimicrobiana entre o sétimo e o trigésimo dia, contudo observou-se uma excelente atividade quando comparado com o controle. A formação de biofilme atingiu o ápice no décimo quinto dia para os cateteres controle e para aqueles impregnados com (NAC/LEV) e no décimo dia para o cateter impregnado com clorexidina + sulfadiazina de prata (Gráfico 4).



Fonte: Arquivo pessoal do autor, 2017.

Gráfico 04 - Avaliação da implantação do biofilme em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (Log UFC) ao longo do tempo.

A tabela 01 mostra a comparação entre as variáveis Log/UFC com o tempo, as amostras bacterianas e os cateteres utilizados. A constante obtida (_cons) representa a amostra 0 (*K. pneumoniae* ATCC), no tempo 0 (três dias), para o cateter controle, tendo o valor de 1,776 log UFC.

Quando se compara a constante com os demais resultados obtidos, é possível afirmar que o cateter de número 2 (CLX+SP) foi o mais eficiente quando comparado com o 1 (NAC+LEV), pois promoveu uma redução de 0,3 Log, sendo estatisticamente significativo o valor de p ($p=0,007$).

Nos tempos 2 (dez dias), 3 (15 dias) e 4 (30 dias) foi observado um aumento gradual no número de células recuperadas, com os valores de $p < 0,05$, sendo, portanto, estatisticamente significativos. Quando se comparou as duas amostras e os valores de Log UFC ao longo do tempo, não se observou diferenças estatisticamente significativas ($p= 0,269$), sendo a diferença entre as amostras de 0,0984 log/UFC.

Tabela 01 - Análise de regressão linear da variável dependente log/UFC, comparando com as variáveis independentes tempo, amostra bacteriana e tipo de cateter.

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	29
Model	2.70967574	7	.387096534	F(7, 21)	=	7.18
Residual	1.13244114	21	.053925769	Prob > F	=	0.0002
				R-squared	=	0.7053
				Adj R-squared	=	0.6070
Total	3.84211688	28	.13721846	Root MSE	=	.23222

LogUFC	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tempo					
1	.0004545	.1414846	0.00	0.997	-.2937788 .2946879
2	.3037878	.1414846	2.15	0.044	.0095545 .5980212
3	.4187878	.1414846	2.96	0.007	.1245544 .7130212
4	.4704545	.1414846	3.33	0.003	.1762211 .7646879
Amostra	-.0984849	.0867002	-1.14	0.269	-.2787878 .0818181
Cateter					
1	.2207273	.1073336	2.06	0.052	-.0024852 .4439398
2	-.309	.1038516	-2.98	0.007	-.5249712 -.0930288
_cons	1.776545	.1281517	13.86	0.000	1.510039 2.043051

Fonte: Arquivo pessoal do autor,2017.

A tabela 02 mostra a comparação das variáveis tamanho do halo com o tempo, a amostra bacteriana e o cateter utilizado. A constante obtida (_cons) representa a amostra 0 (*K. pneumoniae* ATCC 13883), o tempo 0 (três dias) e o cateter 1, tendo o valor de 17,29 mm de diâmetro. Quando se compara a constante com os resultados obtidos, é possível afirmar que o cateter de número 1 (NAC+LEV) foi o mais eficiente quando comparado com o 2 (CLX+SP), pois o tamanho médio do halo formado pelas substâncias impregnadas no último cateter mencionado foi de 8,63mm, sendo estatisticamente significativo o valor de p ($p=0,007$).

Nos tempos 1 (sete dias), 2 (dez dias) não foi observado diferença estatística no tamanho dos halos, mas nos tempos 3 (15 dias) e 4 (30 dias) a redução do halo foi estatisticamente significativa, quando comparados com o tempo 0 (3 dias) sendo os valores de p encontrados de $p=0,012$ e $0,008$, respectivamente.

Tabela 02: Análise de regressão linear da variável dependente tamanho do halo, comparando com as variáveis independentes tempo, amostra bacteriana e tipo de cateter

Source	SS	df	MS	Number of obs	=	15
Model	530.304439	6	88.3840731	F(6, 8)	=	5.09
Residual	138.95216	8	17.36902	Prob > F	=	0.0194
Total	669.256599	14	47.8040428	R-squared	=	0.7924
				Adj R-squared	=	0.6367
				Root MSE	=	4.1676

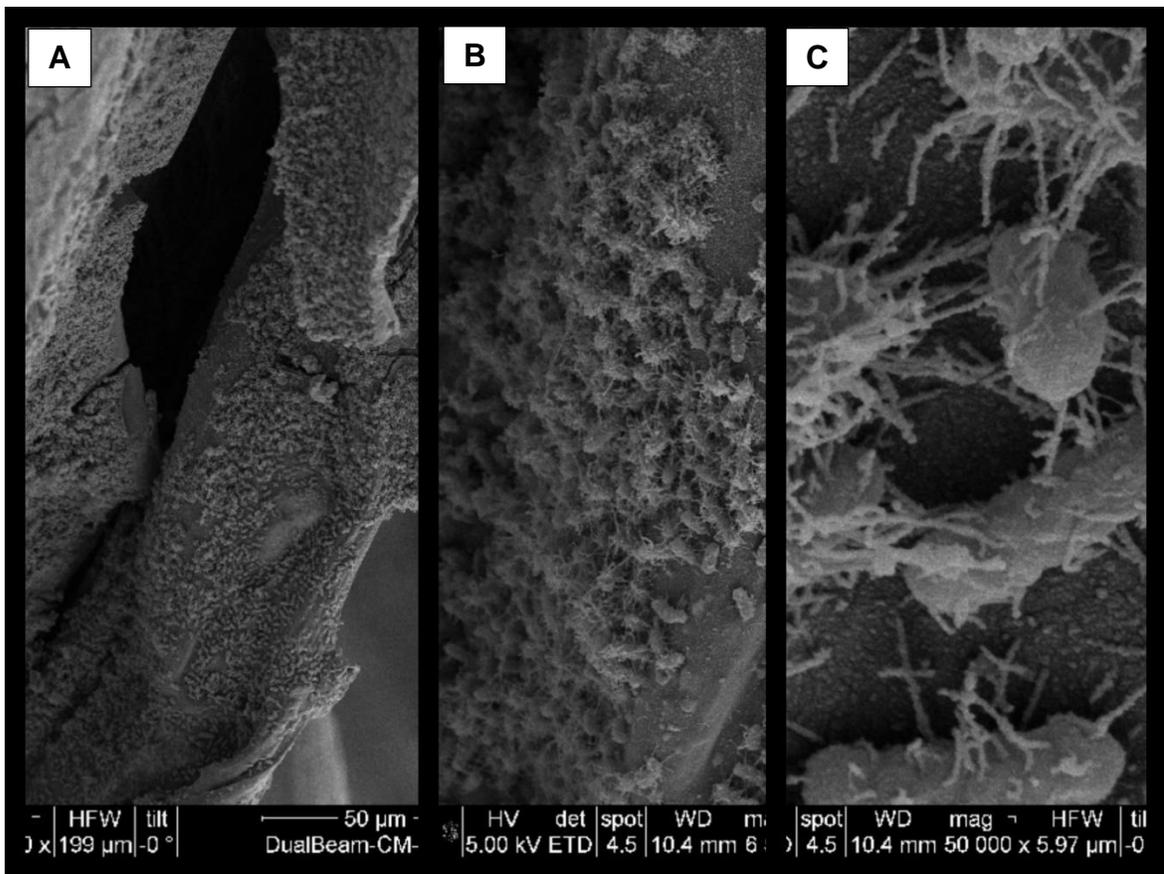
Tamhalo	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
Tempo					
1	-.5824999	2.946949	-0.20	0.848	-7.378177 6.213177
2	-4.4975	2.946949	-1.53	0.165	-11.29318 2.298177
3	-12.36	3.804495	-3.25	0.012	-21.13318 -3.586818
4	-17.18	4.939569	-3.48	0.008	-28.57067 -5.789335
2.Cateter	-8.66	2.406174	-3.60	0.007	-14.20865 -3.111353
Amostra	-6.37	2.227684	-2.86	0.021	-11.50705 -1.232951
_cons	17.29	2.651475	6.52	0.000	11.17569 23.40431

Fonte: Stata versão 12.0.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO BIOFILME

Conforme os resultados da cultura quantitativa, a microscopia foi realizada no terceiro dia e no décimo quinto dia de incubação no soro, que possivelmente corresponderia ao período de formação do biofilme jovem e do biofilme maduro, respectivamente, nos diferentes tipos de cateter.

No terceiro dia de incubação no soro, o cateter controle com a amostra referência apresentou a formação de uma tênue camada de biofilme intra e extra lúmen. Contudo, pode-se observar que o EPS têm papel fundamental nessa adesão (Figura 08).



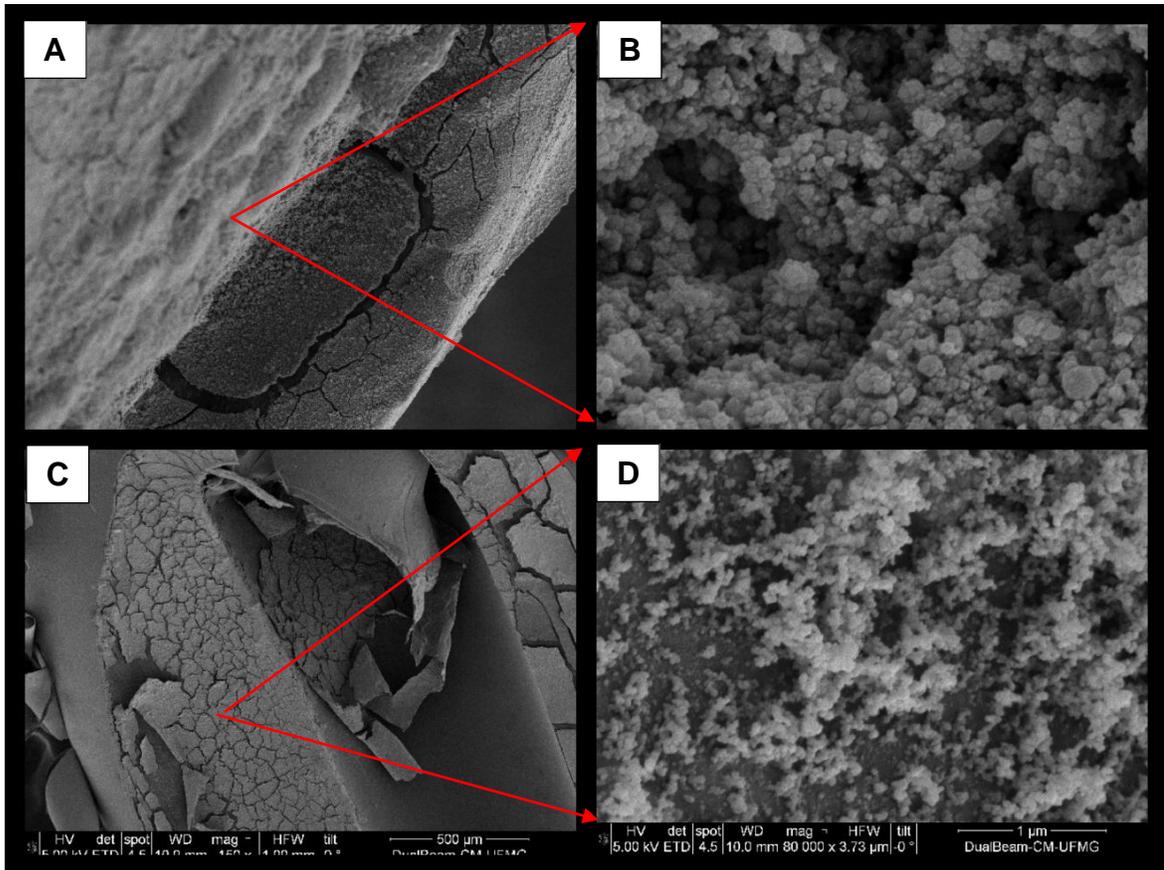
Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI (a-1.500x; b-6.500x; c-50.000x)
 A - Superfície do lúmen do cateter controle com 1.500x de aumento; B- Superfície do lúmen do cateter com 6.500x de aumento; C - Superfície do lúmen do cateter com 50.000x de aumento.

Figura 08 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 no lúmen do cateter venoso central (cateter controle) no terceiro dia.

Os cateteres impregnados com CLX+SP / NAC+LEV foram testados contra a amostra de referência na cultura quantitativa. A combinação de CLX+SP apresentou formação de biofilme inferior ao do controle enquanto a combinação de NAC+LEV não apresentou formação de biofilme.

Esse perfil foi observado na imagem da microscopia eletrônica (Figura 09), cateter impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata a formação do biofilme assume uma conformação similar ao padrão (cateter controle) embora inferior em número de células, com características de conformação e deposição na superfície do cateter de micro colônias diferentes, no cateter impregnado com N-acetilcisteína e levofloxacina, o

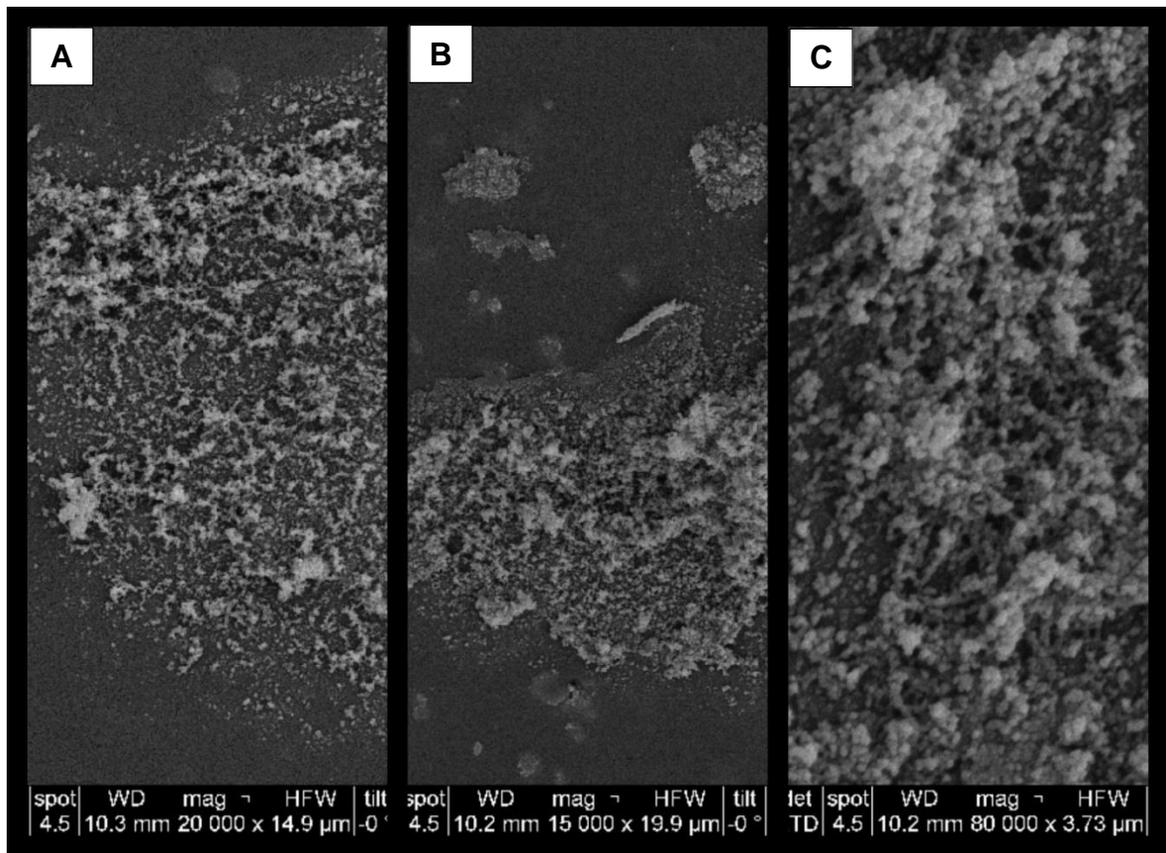
biofilme aparece mais delgado em algumas áreas e em outras sem formação. O que corrobora o resultado da cultura quantitativa no primeiro dia de incubação.



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI (a-1.500x; b-80.000x; c-150x; d-80.000x). A e B (superfícies cobertas com cloredixidina sulfadiazina de prata) C e D (superfícies cobertas com N-acetilcisteína e levofloxacina)

Figura 09 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 extra lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e Levofloxacina no terceiro dia.

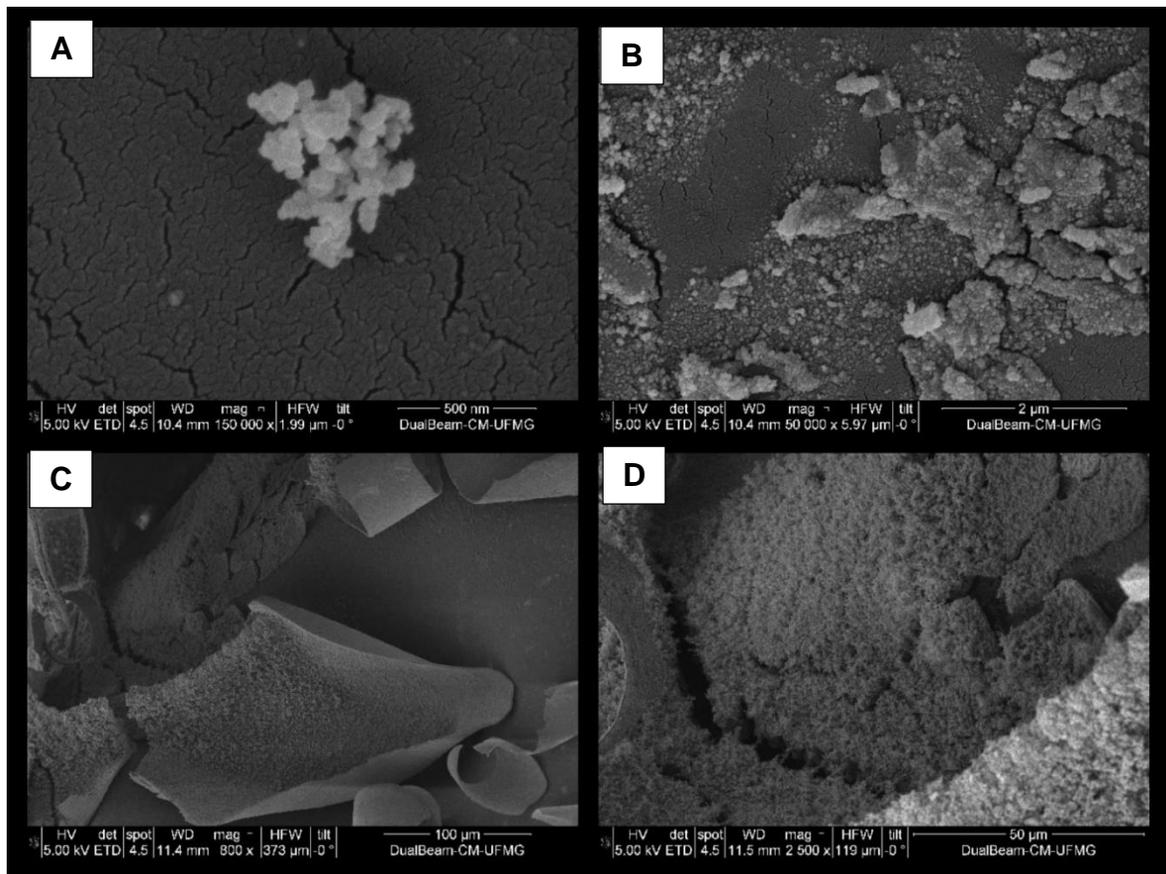
A amostra clínica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase apresentou uma espessa camada de biofilme, como se fosse um muco endurecido (Figura 10). Apesar de mais delgado, o biofilme estava presente também nas superfícies dos cateteres impregnados com antimicrobianos.



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI - (a-20.000 x; b-15.000x; c-80.000x).
 A - Superfície extra lúmen do cateter controle com 20.000 x de aumento; B- Superfície extra lúmen do cateter com 15.000x de aumento; C - Superfície extra lúmen do cateter com 80.000x de aumento.

Figura 10. Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) extra-lúmen na superfície do cateter venoso central (controle) no terceiro dia.

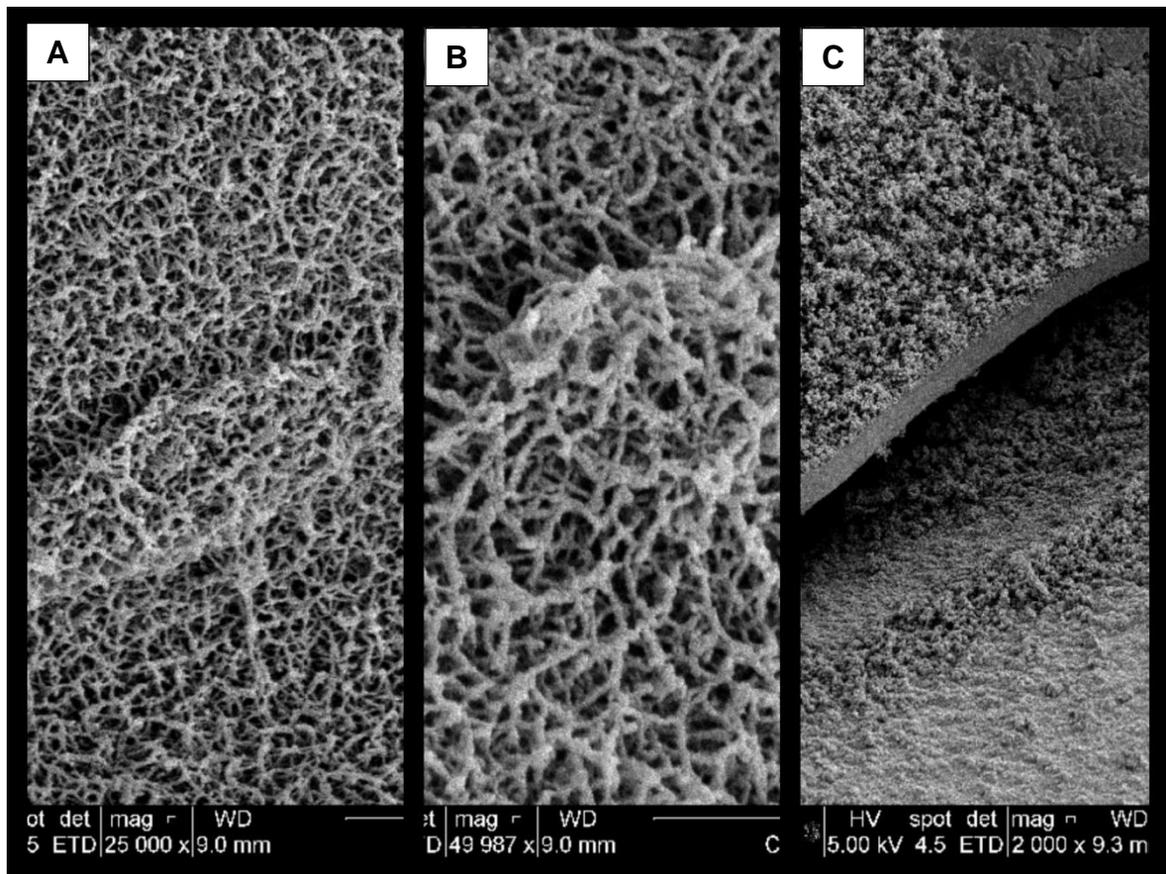
Em algumas áreas, observou-se a presença de uma superfície espessa de biofilme, com agregados de células e em outras regiões como estruturas mais contínuas, como se fosse um “tapete” de células (Figura 11).



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI - (a-150.000 x; b-50.000x; c-800x; d-2.500x). A e B (superfícies cobertas com cloredixidina sulfadiazina de prata) C e D (superfícies cobertas com N-aceticisteína e levofloxacina)

Figura 11. Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase extra-lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e levofloxacina no terceiro dia.

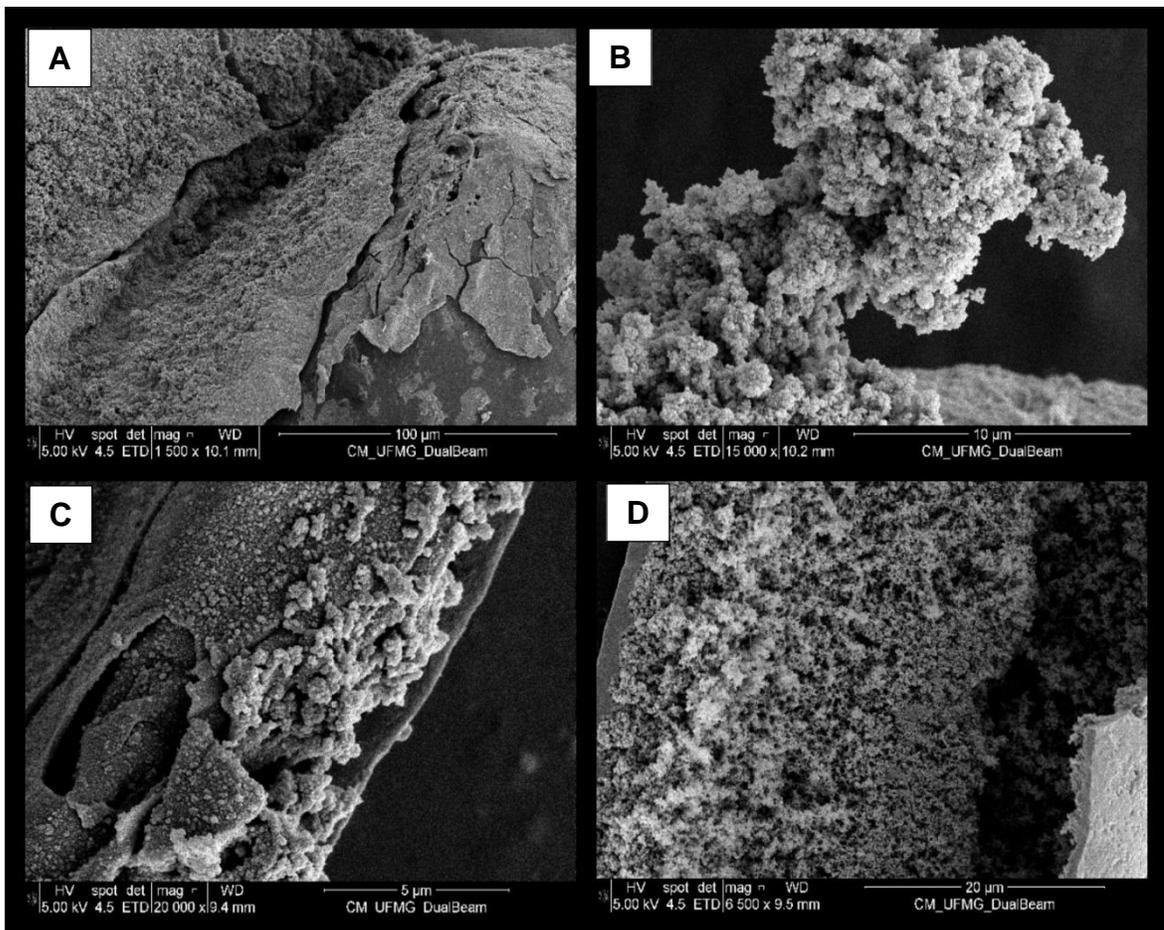
O biofilme da amostra de referência no décimo quinto dia é espesso com um aspecto de “teia de aranha”, observa-se um emaranhado de células que dificilmente podem ser distinguidas. O biofilme maduro é visualizado como uma estrutura bem organizada (Figura 12).



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI - (a-25.000 x; b-49.987 x; c-2.000 x).
 A - Superfície do lúmen do cateter controle com 25.000 x de aumento; B- Superfície do lúmen do cateter com 49.987x de aumento; C - Superfície do lúmen do cateter com 2.000x de aumento;

Figura 12 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 no lúmen do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia.

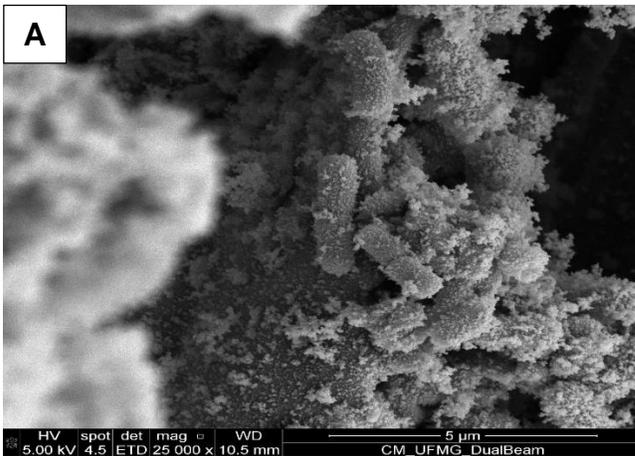
No décimo quinto dia o biofilme formado pela amostra de referência ocupa praticamente toda a superfície extra lúmen dos cateteres avaliados, impregnados e controle. Além disso, pode ser observada a estrutura das camadas de células depositadas e a presença de corrosões nas superfícies do dispositivo médico (Figura 13).



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI (a-1.500x; b-15.000x; c-20.000x; d- 6.500x). A e B (superfícies cobertas com cloredixidina sulfadiazina de prata) C e D (superfícies cobertas com N-acelticisteína e levofloxacina).

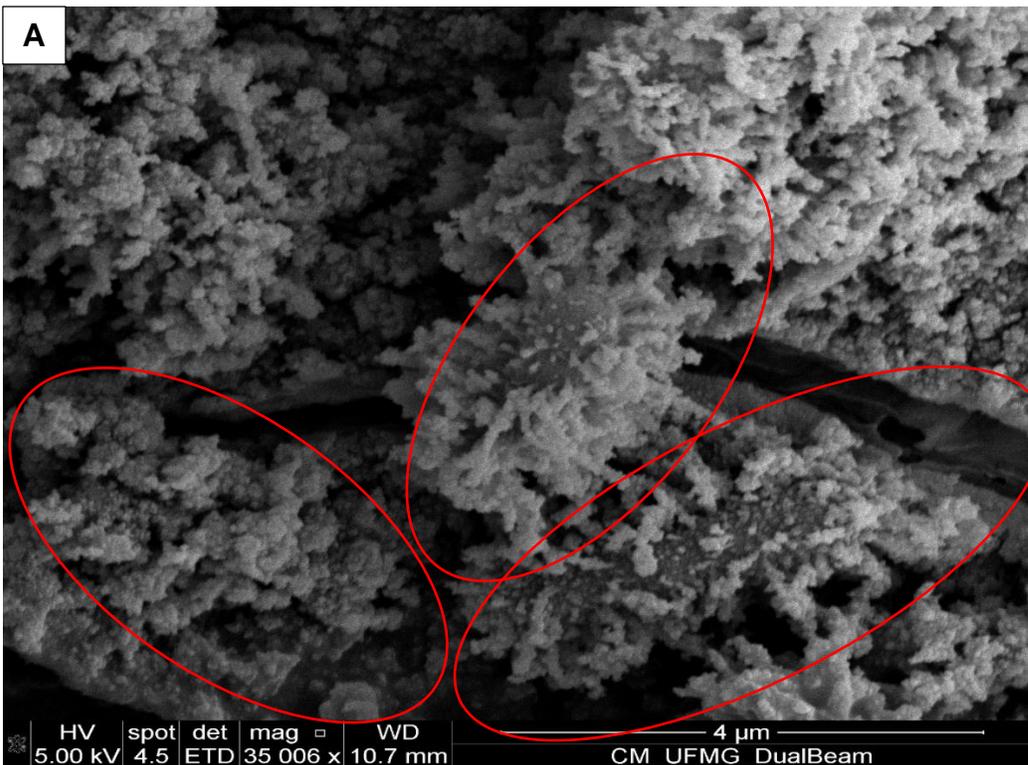
Figura 13 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 extra lúmen na superfície do polímero impregnado com cloredixidina e sulfadiazina de prata e n-acetilcisteína e levofloxacina no décimo quinto dia.

Estruturas de adesão (curli) no biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase podem ser observadas tanto no cateter controle (Figura 14) quanto nos cateteres impregnados com antimicrobianos (Figura 15).



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI (a- 25.000x)
 A – Superfície do cateter controle com 25.000x de aumento.

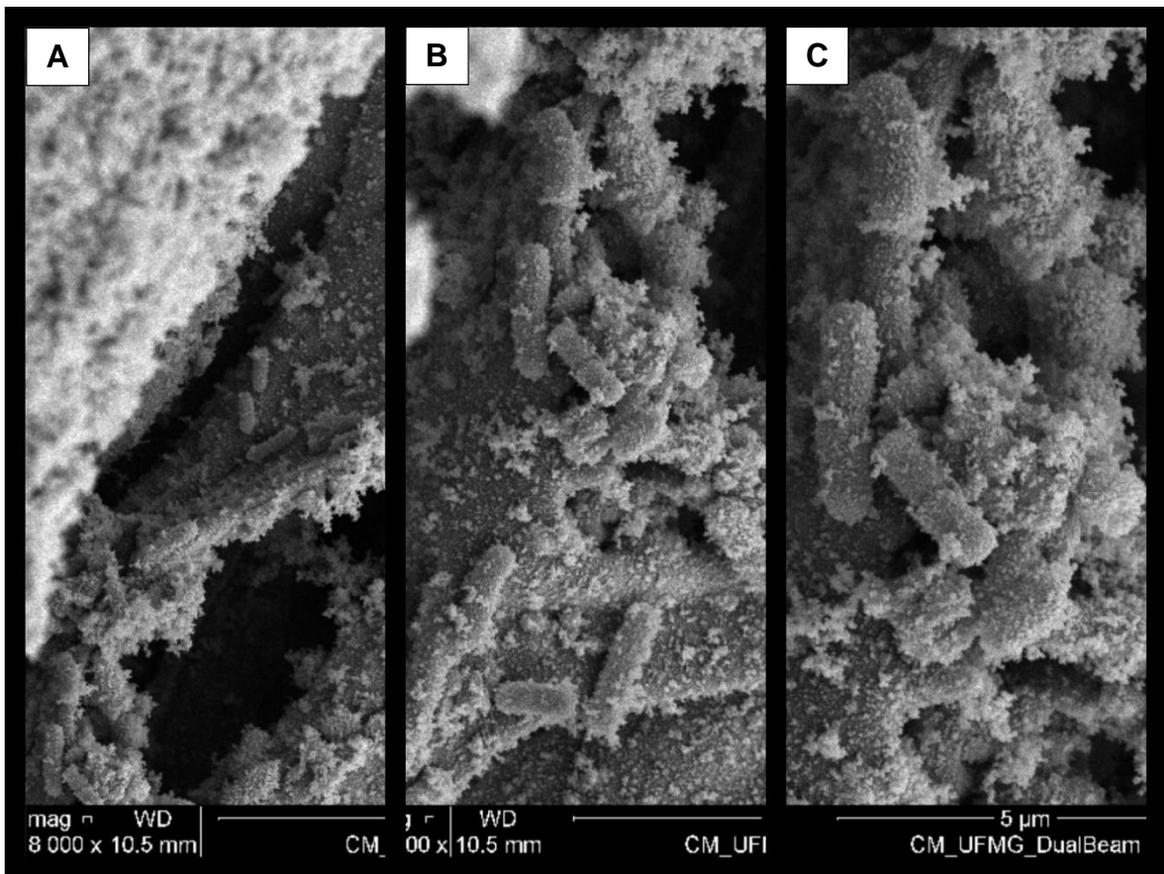
Figura 14 - Formação do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapemase no lúmen do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia.



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI (a-35.006x).

A – Fibras de adesão (curli) em torno do bacilo de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

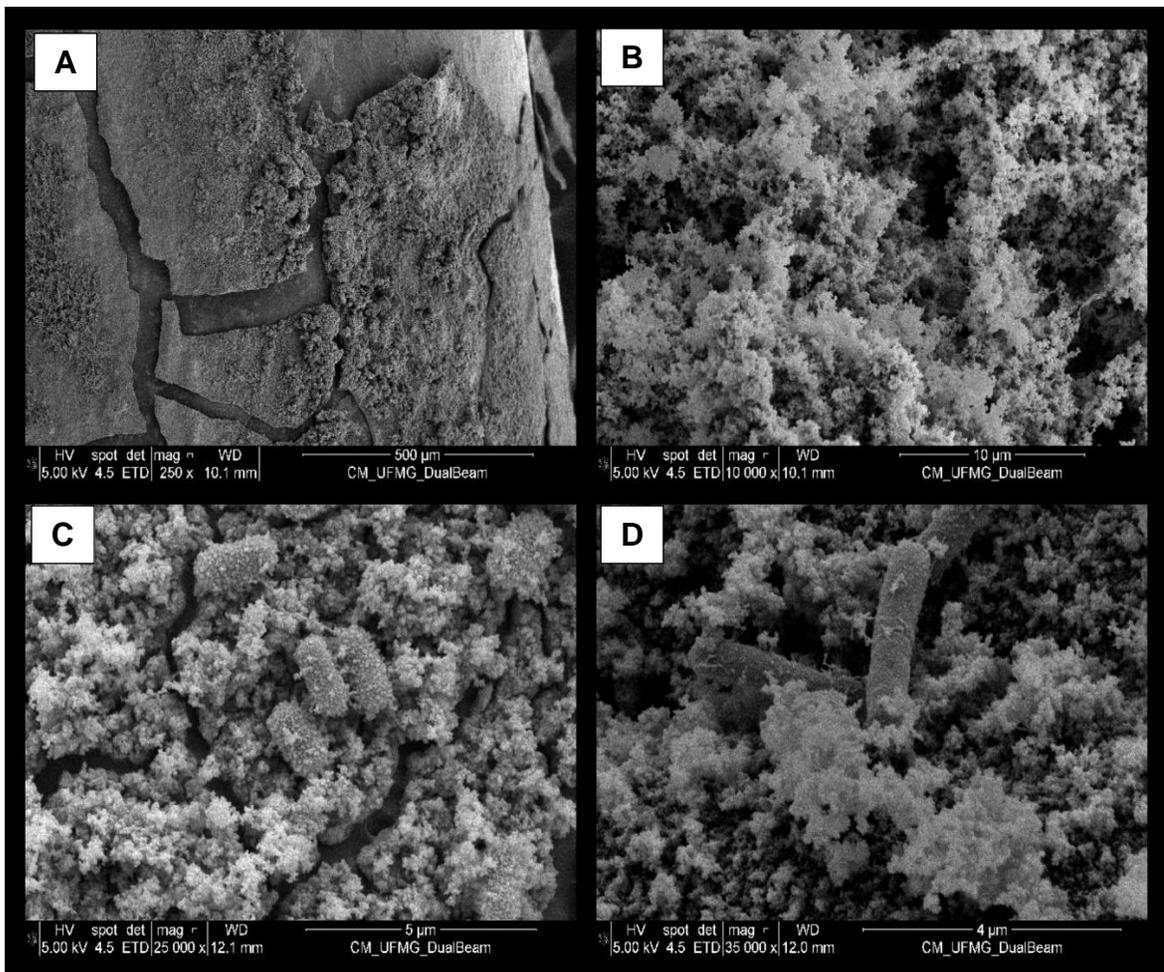
Figura 15. Fibras de adesão (curli) no biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapemase na superfície do cateter venoso central (cateter controle) no décimo quinto dia



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI - (a-8.000 x; b-6.500 x; c-50.000 x)
 A - Superfície extra lúmen do cateter controle com 8.000 x de aumento; B- Superfície extra lúmen do cateter com 6.500 x de aumento; C - Superfície extra lúmen do cateter com 50.000x de aumento.

Figura 16 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) extra-lúmen na superfície do cateter venoso central (controle) no décimo quinto dia.

No décimo quinto dia, a amostra clínica apresentou um biofilme maduro com características de dispersão (Figura 16 A). Além disso, aparentemente, apresenta uma super- expressão das estruturas de adesão (curli) nos cateteres impregnados com antimicrobianos (Figura 17) quando comparado com o cateter controle (Figura 16). O resultado é a formação de uma camada com aspecto endurecido, com produção de polímeros extracelulares.



Nota: Microscopia Eletrônica de Varredura Quanta FEG 3D FEI - (a-5.000x; b-10.000x; c-25.000x.; d-35.000x). A e B (superfícies cobertas com cloredixidina sulfadiazina de prata) C e D (superfícies cobertas com N-acetilcisteína e levofloxacina)

Figura 17 - Crescimento do biofilme de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase extra-lúmen na superfície do polímero impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e N-acetilcisteína e levofloxacina no décimo quinto dia.

5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA COMBINAÇÃO TESTADA

A tabela 03 e 04 (APÊNDICE) mostra o perfil de susceptibilidade das amostras recuperadas nos halos de inibição (subpopulações obtidas nos testes dos cateteres impregnados com NAC+LEV) e testadas contra antimicrobianos recomendados na literatura e de relevância clínica. Os testes foram realizados com as subpopulações obtidas e com a amostra clínica antes de ser submetida à exposição da combinação de antimicrobianos. Foi observado um aumento da CIM para ceftriaxona de 2 µg/mL para 4 µg/mL e então para 64 µg/mL, no terceiro dia de incubação, sétimo e décimo quinto dia, respectivamente. O imipenem, com CIM inicial de 14 µg/ml, teve um decréscimo no terceiro e sétimo dia para 4 µg/mL e voltou à concentração inicialmente obtida no décimo quinto dia.

5.5 ANÁLISE DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DAS SUBPOPULAÇÕES BACTERIANAS RESISTENTES À COMBINAÇÃO NAC E LEV.

Os resultados demonstraram que não houve interação sinérgica (indiferente) significativa entre as combinações testadas de N-acetilcisteína (8 µg/mL a 512µg/mL) e Levofloxacina NAC (0,015 µg/mL 8 µg/mL) -Tabela 05 e 06 (APENDICE). Todas as subpopulações resistentes da amostra referência e KPC tiveram um aumento da CIM para Levofloxacina, enquanto as concentrações testadas de NAC não foram eficientes na inibição do crescimento bacteriano sozinha.

6. DISCUSSÃO

6.1 DURABILIDADE DA COMBINAÇÃO DA SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NOS CATETERES AVALIADOS

Um relatório publicado em 2011 pela Sociedade de Medicina em Cuidados Intensivos em colaboração com outras sociedades, como a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (IDSA), Sociedade de Epidemiologia e Assistência em Saúde Americana (SHEA) e Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomendou o uso de cateteres impregnados com antisséptico ou antimicrobiano-em pacientes adultos com risco de infecção da corrente sanguínea associadas ao uso de cateter venoso central e que necessitassem permanecer com o dispositivo por mais de cinco dias (O'GRADY *et al.*, 2011). Algumas evidências sugerem que os CVCs impregnados com antimicrobianos são capazes de diminuir a colonização do dispositivo e a incidência de infecções de corrente sanguínea associada ao seu uso (LAI *et al.*, 2013).

O estudo multicêntrico de Bicudo e colaboradores (2011) em unidades de terapia intensiva no Brasil, mostrou que o risco para infecção relacionada ao uso de CVC aumentava após 13 dias de permanência, com prevalência de infecções causadas por micro-organismos Gram-negativos.

Quando identificada a infecção relacionada ao uso de cateteres, o tratamento requer a remoção do dispositivo, além de um regime adequado de terapia sistêmica (SHAH, *et al.*, 2013). Em casos graves, a infecção pode progredir para eventos sépticos chegando a óbito (GAHLOT *et al.*, 2014; TIMSIT *et al.*, 2014). A responsabilidade do profissional na troca e manutenção desse dispositivo vai além do cuidado com a pele, a duração de uso, a preferência de sítios de inserção e a escolha do cateter ideal para a necessidade de cada paciente (SCHIAVONE *et al.*, 2010).

A infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter (ICSRC) é definida quando o cateter venoso central é utilizado por um período de 48 horas antes do desenvolvimento da infecção da corrente sanguínea, sendo este processo não relacionado a outros sítios. Se o intervalo de tempo entre o início da infecção e o uso de cateter for superior a 48 horas, há uma forte evidência de que a infecção seja associada

ao dispositivo. Por outro lado, se o início da infecção ocorrer até 48 horas após a retirada do CVC, a mesma é considerada associada ao dispositivo (O'GRADY, 2011).

Geralmente a infecção pode ser proveniente do sítio de inserção, do *hub*, ou de ambos (MERMEL *et al.*,2009). Os principais fatores de riscos incluem aqueles inerentes ao paciente, ao tipo de cateter, aos aspectos relacionados ao profissional da assistência à saúde, à integridade da pele comprometida, ao número de lúmens do dispositivo, dentre outros (SHAH *et al.*,2013). Particularmente em cateteres de longa permanência (cateteres tunelizados) o *hub* do cateter é a principal fonte de colonização (O'GRADY *et al.*, 2011). O *hub* refere-se à extremidade do CVC que se conecta as linhas de sangue (LOCKMAN *et al.*,2016).

Embora alguns estudos *in vitro* e estudos clínicos tenham demonstrado que os dispositivos impregnados com antimicrobianos são eficazes (RAAD *et al.*,2012; TALIBI *et al.*,2016) pouco se conhece da eficácia frente a vários micro-organismos e a durabilidade das substâncias impregnadas, relacionada especialmente àqueles micro-organismos que são multirresistentes e potencialmente formadores de biofilme (NAPARSTEK *et al.*,2014).

O aumento da resistência aos antimicrobianos e o desafio que o biofilme de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase representa tem conduzido estudos sobre a interação *in vitro* de antimicrobianos e outras substâncias com propriedades coadjuvantes. A atividade antimicrobiana e anti-biofilme de peptídeos sintéticos foram capazes de induzir significante a morte celular do biofilme (RIBEIRO, *et al.*,2015)

O efeito da N-acetilcisteína em biofilme foi demonstrado em uma revisão que aborda infecções respiratórias crônicas e agudas. O agente mucolítico apresenta eficácia na inibição da formação do biofilme e na desorganização do biofilme pré-formado, desta forma modificando a viabilidade celular (BLASI *et al.*,2016).

No presente estudo, as zonas de inibição (ZI) ou halos formados decorrentes dos segmentos impregnados com N- acetilcisteína e levofloxacina foram maiores (ZI>15mm) contra a amostra de referência logo no terceiro dia de incubação no soro e que contra a amostra clínica (ZI 9 mm). Os segmentos impregnados com essa combinação tiveram maior atividade e, durabilidade da substância antimicrobiana na superfície do cateter até o 30º dia. Resultados semelhantes foram encontrados por Mansouri *et al.* (2013). A combinação de N-acetilcisteína com levofloxacina mostrou-se superior a outras

combinações tais como: N-acetilcisteína com gentamicina e N-acetilcisteína com neomicina contra diferentes tipos de micro-organismos.

Apesar de poucos estudos clínicos com a N-acetilcisteína, sua atividade foi demonstrada no tratamento de otite externa canina devido à sua ação antimicrobiana e eficácia contra a formação de biofilme para vários micro-organismos (MAY. *et al.*,2016). Recentes estudos mostraram que esse mucolítico rompe as ligações de dissulfetos que ligam as glicoproteínas no biofilme (MAKIPOUR *et al.*,2011) e reduzem a formação do biofilme e a toxicidade aos leucócitos (AIASSA *et al.*,2016)

A combinação de ciprofloxacina e levofloxacina promoveu a inibição e erradicação da formação do biofilme maduro em isolados clínicos de pacientes com sonda uretral (EL-FEKY *et al.*,2009). Apesar de algumas revisões indicarem a n-acetilcisteína como molécula adjuvante no tratamento do biofilme, com excelente segurança e eficácia, (EDINICOLA *et al.*,2014) poucos estudos *in vivo* foram realizados para relacionar esses resultados.

A durabilidade da combinação de N-acetilcisteína e levofloxacina, no nosso estudo mostrou que, apesar da efetiva ação inicial, principalmente contra a amostra referência, a combinação tende a ser limitada pelo tempo de uso. A amostra clínica, que no terceiro dia possuía uma zona de inibição superior a 9 mm para a referida combinação, no décimo dia tem sua atividade inferior a 5 mm de diâmetro.

Outra característica observada foi que a resistência à combinação testada foi mais precoce para amostra clínica do que para a amostra de referência. As subpopulações resistentes foram obtidas logo no terceiro dia do experimento, para o segmento impregnado por estes antimicrobianos, contra a *K. pneumoniae* produtora carbapenemase. Até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo que demonstre o surgimento de subpopulações resistentes a essa combinação.

Os cateteres impregnados com clorexidina e sulfadiazina de prata são disponíveis comercialmente. Em estudos prospectivos, esse cateter apresentou uma média de atividade e durabilidade de 11 dias, com incidência reduzida de infecção relacionada a instalação de CVC (LORENTE *et al.*,2016). No presente estudo, para as amostras testadas *Klebsiella pneumoniae* e KPC, não foi observada nenhuma atividade da combinação comercial já no décimo quinto dia. Por outro lado, um estudo randomizado

não identificou diferenças estatísticas entre esse tipo de cateter e o cateter padrão na redução da colonização em pacientes da terapia intensiva (CAMARGO *et al.*, 2009).

De fato, os micro-organismos que colonizam o cateter podem ser sensíveis ao cateter impregnado. A colonização é reduzida mas por um período limitado pelo tempo de uso. O cateter impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata obteve uma zona de inibição inferior ao do cateter com (NAC/LEV) e com menor durabilidade no segmento contra as amostras testadas. Raad *et al.* (2012) encontraram a durabilidade do cateter impregnado com (CHX/SS), inferior a 3 semanas contra amostras de *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Diferentemente dos resultados achados do presente estudo e de outros apresentados acima, Aslam e colaboradores (2013) demonstraram que as zonas de inibição se mantiveram estáveis após vinte um dias de exposição aos antimicrobianos minociclina e rifampicina contra *Staphylococcus aureus*. Os cateteres comercialmente impregnados, podem ser colonizados pela microbiota da pele, mesmo com atividade antimicrobiana adicional limitada (WASSIL *et al.*, 2007). Igualmente, Mansouri *et al.* (2013) observaram que o benefício adicional do antimicrobiano era limitado pelo tempo de uso do cateter contra diferentes micro-organismos

Mesmo os cateteres comercialmente disponíveis de segunda geração que possuem maior eficácia, não possuem atividade prolongada, dependendo do micro-organismo, reduzindo a colonização do cateter por pouco tempo. Assim, são necessários mais estudos que avaliem as taxas de sepse, mortalidade e efeitos adversos associados ao uso destes dispositivos (STOCCO *et al.*, 2016).

No presente estudo, foi observado obtivemos esse efeito prolongado, porém com o surgimento de subpopulações resistentes à combinação testada em laboratório (NAC/LEV). O mesmo fato não foi observado no cateter impregnado com clorexidina e sulfaziana ou ainda em outros estudos publicados.

Apesar terem sido desenvolvidos a fim de minimizar as infecções relacionadas ao uso de CVC, sua atividade não é somente limitada pelo tempo de uso, mas pelo tipo de micro-organismo que está colonizando e que poderia causar infecção associada ao dispositivo. Uma meta-análise investigou a possível relação entre a vulnerabilidade da atividade dos antimicrobianos em CVC, e identificou que o cateter impregnado com

CHX/SS pode reduzir a colonização por espécies de *Acinetobacter* e difteróides (NOVIKOV *et al.*,2012).

Por outro lado, outro modelo de cateter disponível comercialmente, impregnado com minocilicina e rifampicina reduziu a colonização por *Staphylococcus* coagulase negativo, entretanto houve um aumento na proporção de colonizados por *Candida albicans* (FALAGAS *et al.*, 2007; NOVIKOV *et al.*, 2012).

Embora os cateteres impregnados com (NAC/LEV) e (CHX/SS) tenham efetividade inicial com uma média de 7 a 15 dias, sua atividade e benefício são limitados pelo tempo de uso, desta forma sua eficácia não é duradoura equiparando-se ao cateter padrão em determinado tempo. Assim, a formação do biofilme torna-se inevitável mesmo naqueles cateteres.

6.2 CULTURA QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-BIOFILME ENTRE OS CATETERES IMPREGNADOS COM SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS

Os micro-organismos da microbiota da pele podem ser introduzidos nos tecidos a partir do sítio de inserção de dispositivos médicos invasivos no paciente; ou ainda por contaminação do *hub* e, conseqüentemente da corrente sanguínea, podendo aderir-se às superfícies interna e externa do cateter para formar o biofilme (DOLAN,2011).

A típica formação do biofilme envolve vários estágios de ligação à superfície como: formação de micro colônias, desenvolvimento do biofilme jovem, diferenciação do biofilme maduro e dispersão (TAN *et al.*, 2015). Inicialmente, a camada formada por componentes orgânicos e inorgânicos, provenientes da terapia de infusão, soro, fibrina, proteínas do sangue funcionam como um substrato que eventualmente favorecerá a colonização pelos micro-organismos (SADEKUZZAMAN *et al.* ,2015). A rápida formação de camadas desses micro-organismos em crescimento extensivo é acompanhada pela excreção de polímero extracelular (RAJIV *et al.*,2011).

As bactérias experimentam certo grau de abrigo e homeostase quando inseridas nas estruturas de um biofilme, e um dos principais componentes deste micro- nicho é a matriz de substância extra polimérica circundante (FLEMMING *et al.*,2007). Esta matriz é composta por uma mistura de componentes, tais como EPS, proteínas, ácidos

nucléicos e outras substâncias. A maioria das bactérias é capaz de produzir polissacarídeos, tais como paredes (cápsulas) ou como secreções celulares no ambiente circundante (EPS) (DAVEY *et al.*,2000).

No presente estudo foram identificadas pela microscopia eletrônica, substâncias poliméricas extracelulares (EPS) no biofilme de *K. pneumoniae* já no terceiro dia de incubação no soro. Essas estruturas fornecem estabilidade mecânica ao biofilme, formando uma rede polimérica coesiva e tridimensional que interconecta e imobiliza as células no interior do biofilme (FLEMMING *et al.*,2010; DZU *et al.*,2011). A estabilidade é promovida por interações hidrofóbicas, ligações multivalentes catiônicas e com biopolímeros (FLEMMING *et al.*, 2007).

Dessa forma, observou-se a importância da cápsula de *Klebsiella pneumoniae* na estrutura do biofilme, na organização e formação de agregados celulares por essa espécie, nos diferentes tipos de cateteres testados.

Cada micro colônia é uma comunidade independente que contém milhares de bactérias compatíveis ou que pode conter diferentes combinações de espécies que coexistem na mesma superfície (JOHNSON,2008; ZHAO *et al.*, 2015). O sistema de sinalização *quorum sensing* permite essa comunicação célula-célula. A expressão de genes específicos gera sinais capazes de mediar a comunicação intercelular no interior do biofilme, sendo capaz também de promover sua dispersão (LI *et al.*,2012; SOLANO *et al.*,2014).

Evidências clínicas de infecção por biofilme, obtidas a partir de suas características de desenvolvimento, mostraram que o biofilme maduro é significativamente resistente ao uso de antimicrobianos. Estas estruturas podem dispersar intermitentemente células planctônicas para o ambiente externo a sua formação. O regime terapêutico antimicrobiano pode ser útil para controlar a exacerbação aguda, mas difícil de erradicar a infecção (WU *et al.*,2014)

Alguns estudos têm demonstrado que a sonicação apropriada de dispositivos médicos (segmentos de cateter, próteses, implantes) em paciente com suspeita de infecção poderia aumentar significativamente a taxa de detecção do biofilme (Bjerkkan *et al.*,2009; SONG, *et al.*,2013; JOST *et al.*,2014.) A sonicação é uma técnica fácil, barata para a quantificação de micro-organismos aderidos a uma superfície inerte na detecção

de biofilme (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2013). Apesar de se não usada adequadamente, a frequência poderia matar algumas células, dessa forma a contagem pode subestimar o real número de células que foram viáveis (ASSÉRÉ *et al.*,2008).

No presente estudo, após a sonicação dos segmentos de CVC controle e aqueles impregnados com antimicrobianos foi possível a detecção de micro-organismos, além da cultura quantitativa das células do biofilme.

A formação do biofilme foi diferente nos três diferentes tipos de cateter investigados: cateter controle, impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata e o impregnado com N-acetilcisteína e levofloxacina. Contudo, a partir do décimo quinto dia o número de células quantificadas tende a ser igual, ou seja, independentemente de possuir atividade antimicrobiana adicional, o cateter em determinado momento perde sua atividade contra a colonização e conseqüentemente, permite a formação de biofilme de *Klebsiella pneumoniae*.

Um estudo multicêntrico anteriormente mencionado mostrou que a clorexidina e a sulfadiazina de prata possuem durabilidade antimicrobiana curta e não tão efetiva quando comparada com o cateteres impregnados com rifampicina e minociclina (DAROUICHE *et al.*, 1999).Esse último possui durabilidade em torno de 50 dias e excelente atividade contra *Staphylococcus* (RAAD 2007; 2008), contudo o dispositivo falha completamente na prevenção de infecções relacionadas a bactérias Gram-negativas tais como *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (FRAENKEL, *et al.*,2006).

Jamal e colaboradores (2014) elaboraram um modelo de cateter impregnado com minociclina, rifampicina e clorexidina, que teve durabilidade antimicrobiana contra o biofilme testado superior aos modelos comercialmente disponíveis, principalmente contra a variedade de bactérias Gram negativas multirresistentes, tais como *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*,*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Stenotrophomonas maltophilia*.

Em um estudo similar, Raad (2012) mostrou que uma combinação de clorexidina, rifampicina e minociclina foi capaz de inibir completamente o biofilme com atividade prolongada de todas amostras multirresistentes testadas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA),*Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE),*P. aeruginosa*,*Candida albicans* e *Candida glabrata*.

Foi observada uma estreita relação entre a diminuição da atividade da combinação nos cateteres impregnados e a formação de biofilme. À medida que os cateteres impregnados perdiam atividade, o número de células do biofilme obtidas por cultura quantitativa era maior.

Estudos mais representativos ainda são necessários afim de que se possa determinar o potencial de formação de subpopulações resistentes em cateteres impregnados, custo-benefício do uso e o desenvolvimento de substâncias que melhorem a durabilidade antimicrobiana das substâncias antimicrobianas associadas às superfícies dos dispositivos.

Os cateteres impregnados com antimicrobianos são recomendados pelo CDC, FDA, e outras sociedades internacionais conforme o risco do paciente. Apesar da recomendação, é importante ressaltar que os cateteres cobertos com antimicrobianos, podem permitir o surgimento de subpopulações resistentes e também preocupam pela toxicidade e possíveis reações de hipersensibilidade associadas ao uso desses cateteres (WENG *et al.*,2014). Jee *et al.* (2009) descreveram quatro casos de anafilaxia relacionados ao uso de cateteres impregnados com clorexidina e sulfadiazina de prata.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda o uso de cateteres impregnados com antimicrobianos em situações onde as taxas de infecções associadas ao CVC persistirem elevadas acima do valor máximo aceitável, quando houver histórico de múltiplas infecções associadas ao dispositivo ou quando a consequência de eventual bacteremia relacionada a cateter poderia ser muito grave, por exemplo em pacientes com próteses endovasculares (ANVISA, p.54,2011).

A literatura fundamenta que a própria composição do cateter pode influenciar em uma maior e mais rápida adesão bacteriana e formação de biofilme (VERMA *et al.*,2016). Embora diversas medidas de prevenção da formação de biofilme tenham sido examinadas, nenhuma bio-superfície, incluindo silicone, poliuretano, materiais cobertos com hidrogel tem sido efetiva na prevenção da colonização e desenvolvimento do biofilme (JACOBSEN *et al.*, 2008).

Outra característica importante está relacionada a estrutura do biofilme formado em cateter venoso central e aqueles provenientes de infecções de trato respiratório (BOISVERT *et al.*, 2016). Dependendo da proveniência das amostras (sangue, escarro,

feridas), material de adesão (cateter urinário, tubo endotraqueal) algumas linhagens de *Klebsiella pneumoniae* possuem maior aderência a superfícies de dispositivos médicos, com potencial invasivo e capacidade de formar grande quantidade de biofilme mono ou poli microbiano (CHUNG,2016; SEIFI *et al.*,2016; SINGHAI *et al.*,2012; VUOTTO *et al.*,2014).

O biofilme formado por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase é diferente por ser capaz de desenvolver estruturas multicelulares com elevada taxa de adaptabilidade e resistência aos antimicrobianos. Nesses casos, o tratamento relacionado ao biofilme é difícil não somente devido ao seu caráter recalcitrante, mas também à presença de diferentes genes de resistência (LEBEAUX *et al.*,2014). O surgimento de subpopulações resistentes a uma das combinações testadas no presente estudo pode ser explicado por essa adaptabilidade aos antimicrobianos que o biofilme de *K. pneumoniae* apresenta.

Na presença do biofilme é esperado a transferência de genes de resistência, como demonstrado em um estudo *in vitro*, o aumento da taxa de transferência do plasmídeo codificador CTX-M15 (ESBL) em biofilme de *K. pneumoniae* (HENNEQUIN *et al.*,2012). A aquisição de plasmídeos e a ocorrência de mutações cromossômicas conferem resistência adicional às fluoroquinonas e aos carbapenêmicos. A susceptibilidade a poucos antimicrobianos limita as opções terapêuticas para tigeciclina, colistina e outro aminoglicosídeo que ainda algumas linhagens são resistentes, aumentando a mortalidade entre os pacientes com infecção de corrente sanguínea. (WANG *et al.*, 2013).

Nos experimentos realizados neste estudo, observou-se que o soro humano pode estar relacionado com o ciclo de formação do biofilme. Quando foi realizada a substituição do soro semanalmente, notou-se um discreto aumento de células na cultura quantitativa. É sabido que compostos orgânicos, tais como proteínas (albumina, fibrinogênio, fibronectina e laminina) e plaquetas desempenham um papel fundamental como condicionantes da matriz, importante na adesão pelos micro-organismos e composição do biofilme (DOLAN,2002). Esses dados foram consistentes com estudos realizados por PATEL *et al.* (2007), a adesão, agregação e proliferação bacteriana na delgada camada de biofilme foi aumentada em 12-24h na presença do soro, conduzindo

a um espesso biofilme maduro *in vitro*. Componentes do soro podem promover a formação do biofilme (WUREN *et al.*, 2014; SAMARANAYAKE *et al.*,2013) principalmente de amostras recuperadas de sangue (MIKUCIONYTE *et al.*,2014).

7 SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou que cateteres impregnados com antimicrobianos são inicialmente eficazes na colonização por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase - KPC. Sua atividade é limitada pelo tempo de uso e a formação do biofilme foi observada, mesmo com o benefício adicional da associação de antimicrobiano.
- O cateter impregnado com NAC/LEV teve prolongada atividade, porém menor eficácia quando comparado com o cateter impregnado com clorexidina e sulfadiazina de prata, principalmente quanto ao surgimento de subpopulações resistentes presentes nos halos de inibição, na combinação testada.
- As amostras testadas formaram biofilme no cateter, porém a amostra clínica (produtora de KPC), exibiu um biofilme mais espesso e tridimensional em forma de tapete enquanto que para a de referência foi observado um biofilme mais delgado, bem delimitado.
- Os resultados da microscopia eletrônica de varredura confirmaram os resultados da cultura quantitativa, nos dias nos quais ocorreram uma diminuição da colonização e formação do biofilme maduro, observou-se características semelhantes a crostas.
- Os resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos demonstraram que algumas subpopulações resistentes apresentaram mudança do perfil de susceptibilidade após o contato com a combinação, principalmente a amostra de referência. Desta forma, se pode inferir que dependendo da combinação antimicrobiana contida no cateter, pode induzir a resistência de algumas bactérias, o que inclui aquelas presentes na microbiota da pele.

Este trabalho melhorou a compreensão da formação de biofilmes nas superfícies de CVCs impregnados ou não (controle) com antimicrobianos por *K. pneumoniae*, no entanto, ainda são necessários maiores estudos sobre a concentração ideal dessas substâncias que possam melhorar a eficácia de NAC/LEV no cateter, prevenindo o surgimento de subpopulações resistentes. Testes com outros micro-organismos associados à *K. pneumoniae*, incluindo linhagens produtoras de KPC, são fundamentais

para a compreensão do biofilme polimicrobiano nesses dispositivos e os mecanismos de adaptabilidade dessas linhagens. Além disso, estudos avaliando o impacto da presença dessas e outras substâncias antimicrobianas em cateteres, na ecologia microbiana do paciente e do ambiente nosocomial são de extrema necessidade tendo em vista a grande versatilidade adaptativa dos microrganismos e a emergência da resistência bacteriana a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ADVANI, S. *et al.* Central Line–Associated Bloodstream Infection in Hospitalized Children with Peripherally Inserted Central Venous Catheters: Extending Risk Analyses outside the Intensive Care Unit. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.9, p.1108–1115, 2011.
- AIASSA, V. *et al.* Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol:β-cyclodextrin: N-acetylcysteine complex. **Carbohydr Polym.** v.152, p.672-678.
- AGODI, A. *et al.* Containment of an Outbreak of KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Nov., v.49, n. 11, p. 3986–3989, 2011.
- ALLAN, N. D.; GIARE-PATEL, K.; OLSON, M. E. An In Vivo Rabbit Model for the Evaluation of Antimicrobial Peripherally Inserted Central Catheter to Reduce Microbial Migration and Colonization as Compared to an Uncoated PICC. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. May, p.1-12, 2012.
- ALLEN, B. L.; GERLACH, G. F.; CLEGG, S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol**, v.173, p. 916–920, 1991.
- ALKHATEEB, S.S. The prevalence of urinary tract infection, or urosepsis following transrectal ultrasound-guided prostate biopsy in a subset of the Saudi population and patterns of susceptibility to fluoroquinolones. **Saudi Medical Journal**, v.37, n.8, p.860-863, 2016.
- ALMEIDA, A.G. The use of chloroxedine varnishes in children: what is out there? **Int J Dent**, v.9, n.3, p.142-147, 2010.
- AL-MOUSA, H H *et al.* Device-associated infection rates, bacterial resistance, length of stay, and mortality in Kuwait: International Nosocomial Infection Consortium findings. **Am J Infect Control**, v. 44, n.4, p. 444- 449, Apr. 2016.
- ANDERSON, V.R.; PERRY, C.M. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. **Drugs**, v.68, n.4, p.535-65, 2008.
- ANDRADE, L.N *et al.* Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **J Clin Microbiology**, v.52, n.7, p.2530-2535, 2014.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medidas de Prevenção de Infecção relacionada á assistência á saúde. Brasília, 92p, 2013.

ARNOLD, R.S. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Producing Bacteria. **South Med J.** January, v.104, n.1, p. 40–45, 2011.

ASLAM, S. Combination of Tigecycline and *N*-Acetylcysteine Reduces Biofilm-Embedded Bacteria on Vascular Catheters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Apr., v. 51, n. 4, p. 1556–1558, 2007.

ASLAM, S.M.S.; DAROUICHE, R.O. Role of Antibiofilm Antimicrobial Agents in Control of Device- Related Infections. **Int J Artif Organs**; v.34, n.9, p.752–758, 2011.

ASSÉRE A *et al.* Comparative evaluation of methods for counting surviving biofilm cells adhering to a polyvinyl chloride surface exposed to chlorine or drying. **Journal of Applied Microbiology**, p.1692-1702, 2008.

BALABAN, N. *et al.* Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. **Kidney International**, v.63, p. 340–345, 2003.

BALESTRINO, D. *et al.* The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environ Microbiol**, v.10, n.3, p.685-701, 2008.

BAMBEKE, F. V. *et al.* Quinolones in 2005: an update. **Clin Microbiol Infect**, v.11, p.256–280, 2005.

BAXI, S.M. *et al.* Impact of Postplacement Adjustment of Peripherally Inserted Central Catheters on the Risk of Bloodstream Infection and Venous Thrombus Formation. **Infect Control Hosp Epidemiol**. August, v.34, n.8, p.785–792, 2013

BEIRÃO, E.M. *et al.* Clinical and microbiological characterization of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Braz J Infect Dis**. v.15, n.1, p. 69-73, 2011.

BEN-DAVID, D. *et al.* Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **Clin. Microbiol. Infect.** v.18, p.54–60, 2012.

BEN-DAVID, D., *et al.* Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**, v.31, p. 620–626, 2010.

BEN-DAVID, D. *et al.* Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.32, p.845– 853, 2011.

BETJES, M.G.H. Prevention of catheter-related bloodstream infection in patients on hemodialysis. **Nature Reviews | Nephrology**, April, v.7, p. 257–265, 2011.

- BICUDO, D. *et al.* Risk factors for catheter-related bloodstream infection: a prospective multicenter study in Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.15, n.4, p.328-331, 2011.
- BLASI, F. *et al.* The effect of N-acetylcysteine on biofilms: Implications for the treatment of respiratory tract infections. **Respir Med**, v.117, p.190-197, 2016.
- BODDICKER J. D. *et al.* Signature-Tagged Mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to Identify Genes That Influence Biofilm Formation on Extracellular Matrix Material. **Infection and Immunity**, Aug, v.74, n. 8, p. 4590–4597, 2006.
- BOISVERT, A.A. *et al.* Microbial Biofilms in Pulmonary and Critical Care Diseases **Ann Am Thorac Soc**, v.13, n.9, p.1615-1623, Sep 2016.
- BORBA, C.M.A.; OLIVEIRA, V.M.; AREND, L.N.V.S.; PILONETTO, M. Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC). **J Bras Patol Med Lab**, Dezembro. 48, n. 6, p. 427- 433, 2012.
- BRATU, S. *et al.* Emergence of KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: Epidemiology and Recommendations for Detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, July, v.49, n. 7, p. 3018–3020, 2005.
- BURMØLLE, M. *et al.* Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. **Microbiology**, v.154, p. 187–195, 2008.
- BURTON, E. *et al.* Antibiofilm Activity of GlmU Enzyme Inhibitors against Catheter-Associated Uropathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, May, v.50, n.5, p. 1835 –1840, 2006.
- CABRAL, A.B. Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos B-lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE. Dissertação. Universidade Federal do Pernambuco. Medicina Tropical, 151p, 2011.
- CAMARGO, L F_ *et al.* Double-lumen central venous catheters impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine to prevent catheter colonisation in the intensive care unit setting: a prospective randomised study. **J Hosp Infect**, v.72, n.3, p.227-33, 2009.
- CAMPOS, A.C. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. **AM J Infec Control**, v.44, n.11, p.1374-1380, 2016.
- CANDAN, E.D.; AKSÖZ, N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Bioquímica Polínica.**, v.62, n.4, 867-874, 2015.
- CAPUTO, A *et al.* Pan-genomic analysis to redefine species and subspecies based on quantum discontinuous variation: the *Klebsiella* paradigm. **Biolo Direct**, v.10, n.55, p.1-34, 2015.

- CHEMALY, R.F. The efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin in the prevention of catheter-related bacteremia in cancer patients receiving high-dose interleukin-2. **International Journal of Infectious Diseases** .v.14, p.548–552, 2010.
- CHUNG, P.Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. **FEMS MICROBIOL LETT**,v.363,n.20,p.1-21,2016.
- CHUN-MING.L. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2-Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 11 in Taiwan in 2011. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, October, v. 56, n.10, p. 5016–5022, 2012.
- CLANCY, C. J. *et al.* Epidemiology and Molecular Characterization of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Transplant Recipients. **Am J Transplant.**, October, v.13, n.10, p. 2619 – 2633, 2013.
- CLEMENTS, A. *et al.* The Major Surface-Associated Saccharides of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Host Cell Association. **PLoS ONE**,v. 3, n.11, p.1-10, 2008.
- CIFUENTES, M. *et al.* Primer caso de detección de *bla*_{KPC} en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. **Rev Chil Infect.** , v.29, n.2, p. 224-228, 2012.
- CHAUHAN, A.M. *et al.* Preventing biofilm formation and associated occlusion by biomimetic glycocalyxlike polymer in central venous catheters. **J Infect Dis.**, Nov, v.210, n.9, p.1347-1356, 2014.
- CALOGIURI G.F. *et al.* Chlorhexidine Hypersensitivity: A Critical and Updated Review. **J Allergy Ther.**, v.4, n.4, 2013.
- CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. Are Antimicrobial-Impregnated Catheters Effective? Don't Throw Out the Baby with the Bathwater. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.1287–1292, 2004.
- DAROUICHE, R. O. *et al.* A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. **The New England Journal of Medicine**, January, v.340, n.1, p.1-8, 1999.
- DAVEY M. E *et al.* Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiol Mol Biol Rev.**v.64,n.4,p.847-67. 2000.
- DESTA, K. *et al.* High Gastrointestinal Colonization Rate with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Hospitalized Patients: Emergence of Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* in Ethiopia. **PLoS One**, v.11, n.8, 2016.
- DI CARLO, P. *et al.* Two cases of monomicrobial intraabdominal abscesses due to KPC - 3 *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone. **BMC Gastroenterology**, v.11, v.103, 2011.

DICKINSON, G.M.; BISNO, A.L. Infections Associated with Indwelling Devices: Infections Related to Extravascular Devices. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, May, v.33, n. 5, p. 602-607, 1989.

DIENSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, Fevereiro, v.46, n.1, p.23-27, 2010.

DOLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DOMENICO, P. *et al.* Polysaccharide Capsule-Mediated Resistance to Opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, Oct, v. 62, n. 10, p. 4495-4499, 1994.

DZUL, S.P. *et al.* Contribution of the *Klebsiella pneumoniae* Capsule to Bacterial Aggregate and Biofilm Microstructures. **Applied and Environmental Microbiology**, Mar, p. 1777–1782 v. 77, n. 5, 2011.

EDINICOLA, S. *et al.* N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. v.18, n.19, p.2942-2948, Oct 2014.

EFRATI S, *et al.* N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis **Nephrol Dial Transplant.**, v.22, p.1873-1881, 2007.

EL-FEKY, M.A. *et al.* Effect of ciprofloxacin and N-acetylcysteine on bacterial adherence and biofilm formation on ureteral stent surfaces. **Pol J Microbiol.**v.58, n.3, p.261-267, 2009.

ENDIMIANI, A. *et al.* Emergence of bla_{KPC}-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Setembro, v. 64, p.1102–1110, 2009.

EVANGELOPOULOS, D. S. *et al.* Sonication: A Valuable Technique for Diagnosis and Treatment of Periprosthetic Joint Infections. *The Scientific World Journal*, p.1-5, 2013.

FALAGAS, M.E. *et al.* Rifampicin-impregnated central venous catheters: a meta-analysis of randomized controlled trials. **J Antimicrob Chemother.**v.59, n.3, p.359-369, 2007.

FRANCESCHI A. T. ; CUNHA M. L. C. Adverse Events Related to the Use of Central Venous Catheters in Hospitalized Newborns. **Rev. Latino Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, Mar./Apr. ,v.18, n.2 , 2010.

FRASCA, D.; DAHYOT-FIZELIER, C.; MIMOZ O. Prevention of central venous catheter-related infection in the intensive care unit. **Critical Care**, v.14, p.1-8, 2010.

FRAENKEL, D. *et al.* A prospective, randomized trial of rifampicin-minocycline-coated and silver-platinum-carbon-impregnated central venous catheters. **Crit Care Med**, v.34, n.3, p.668-675, 2006.

FLEMMING, H. C. *et al.* The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells. **J Bacteriol.** v.189, n.22, p.7945-7945, 2007.

FLEMMING, H. C. *et al.* The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. 8,p.623-633, 2010.

FLETCHER, S. Catheter-related bloodstream infection. **British Journal of Anaesthesia**, v. 5, n. 2, p.49-51, 2005.

FLORES-MIRELES, A.L. *et al.* Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nat Rev Microbiol**, v.13, n.5, p.269-284, 2015.

GAHLOT, R.*et al.* Catheter-related bloodstream infections. **Int J Crit Illn Inj Sci**, v.4, n.2, p.162-167, 2014.

GHAFOURIAN,S. *et al.* Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with urinary tract infection. **Sao Paulo Med J**,v.130,n.1,p.37-43.2012.

GUPTA A. *et al.* Extended Spectrum b Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. **Journal of Perinatology**, v. 23, p.439–443, 2003.

GUPTA, R. *et al.* Chlorhexidine, A Medicine for all the Oral Diseases. **GJMEDPH**, v. 1, n.2, April, 2012.

GUO, S.*et al.* Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* ventilator-associated pneumonia in mainland China. **BMC Infect Dis**, v.16, n.1, p. 608, Oct 26, 2016.

GRAY, J. *et al.* An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit in Guatemala. **American Journal of Infection Control**, v.40, n.6, p.516-520, 2012.

GRILLON, A. *et al.* Comparative Activity of Ciprofloxacin, Levofloxacin and Moxifloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* Assessed by Minimum Inhibitory Concentrations and Time-Kill Studies. **PLOS ONE**, v.11, n.6, p.1-10, 2016.

HANNA, H. A. *et al.* Antibiotic-impregnated catheters associated with significant decrease in nosocomial and multidrug-resistant bacteremias in critically ill patients. **Clinical Investigations in Critical Care**, September, v.124, n. 3, p.1030-1038, 2003.

HANNA H. *et al.* Long-Term Silicone Central Venous Catheters Impregnated With Minocycline and Rifampin Decrease Rates of Catheter-Related Bloodstream Infection in Cancer Patients: A Prospective Randomized Clinical Trial. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, p.3163-3171, 2004.

HAYDEN, M.K. *et al.* Prevention of Colonization and Infection by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Long Term Acute Care Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v.60, n.8, p.1153-1161, 2014.

HENNEQUIN, C. *et al.* Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.9, p.2123-2130, May, 2012.

HENRIQUE D. M. Fatores de risco e recomendações atuais para prevenção de infecção associada a cateteres venosos centrais: uma revisão de literatura. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. Out/Dez, v.3, n.4, p.1-5, 2013.

HOCKENHULL J.C. *et al.* The clinical effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing catheter-related bloodstream infections: a systematic review. **Crit. Care Med.**, v.37, p.702–712, 2009.

HOOTON.T M. *et al.* Diagnosis, Prevention, and Treatment of Catheter-Associated Urinary Tract Infection in Adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.625–663, 2010.

HORNICK, D. B., B. L. ALLEN, M. A. HORN, S. CLEGG. Adherence to Respiratory Epithelia by Recombinant *Escherichia coli* Expressing *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbrial Gene Products. **Infect. Immun.**, v. 60, n.4, p.1577–1588, 1992.

HUANG, T.W. *et al.* Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. **Research Notes**, v.7, n.13, p.1-8, 2014.

HUANG, Y *et al.* Reinfection and relapse of recurrent bacteremia caused by *Klebsiella pneumoniae* in a medical center in Taiwan. **Future Microbiol**, v.11, p. 1157-65, Sep 2016.

JAHANI-SHERAFAT, S. *et al.* Device-associated infection rates and bacterial resistance in six academic teaching hospitals of Iran: Findings from the International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC). **J Infect Public Health**, v 8, n.6, p.553-61, Nov-Dec, 2015.

JACOBSEN, S. M. *et al.* Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinic Microbiol Rev**, v.21, n.1, p.26-59, 2008.

JAMAL, M.A. *et al.* Prevention of Biofilm Colonization by Gram-Negative Bacteria on Minocycline-Rifampin-Impregnated Catheters Sequentially Coated with Chlorhexidine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.58, n.2, p.1179-1182, 2014.

JEAN, S.S. *et al.* Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of pathogens causing urinary tract infections in the Asia-Pacific region: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART), 2010-2013. **Int J Antimicrob Agents**, v.47, n.4, p. 328-34, Apr. 2016.

JEE R *et al.* Four cases of anaphylaxis to chlorhexidine impregnated central venous catheters: a case cluster or the tip of the iceberg?. **Br J Anaesth**.v.103, n.4, p.-614-615, 2009.

JENKINSON, M. D. *et al.* The British antibiotic and silver-impregnated catheters for ventriculoperitoneal shunts multi-centre randomised controlled trial (the BASICS trial): study protocol. **Trials**, v.15, n.4, p.1-7, 2014.

JOHNSON, L.R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **J.Theor Biol**, n.251, n.1, p.24-34,2008.

JOST GF *et al.* Sonication of catheter tips for improved detection of microorganisms on external ventricular drains and ventriculo-peritoneal shunts. **J Clin Neurosci**, v.21, n.4, p.578-582, 2014.

KIKLIS, J. Chemical Dental Plaque Control: Chlorhexidine Tooth Staining and Efficacy of Common Whitening Procedures.2014. Scripps Senior Theses, (Senior Thesis in Biochemistry) http://scholarship.claremont.edu/scripps_theses/336

KITCHEL, B. *et al.* Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258
Molecular Epidemiology of KPC-producing isolates in the United States: Clonal

Expansion of Multilocus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Aug., p. 3365–3370, 2009.

KNOTHE, H. *et al.* Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, Nov-Dec, v.11, 6, p. 315-317, 1983.

KO, W.C *et al.* Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. **Emerg Infect Dis**, n.8, v.2, p.160-166, 2002.

KO, K.S. The Contribution of Capsule Polysaccharide Genes to Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence**, p.1-7, 2016.

KUHN, D.M. *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob. Agents Chemother.**v.46, p.1773–1780, 2002.

KWAN S. K. The contribution of capsule polysaccharide genes to virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence**. n.0, v, 0, p.1-2, 07 Oct 2016.

LAI, N.M *et al.* Catheter impregnation, coating or bonding for reducing central venous catheter-related infections in adults. **Cochrane Database Syst Rev**, v.6, n.6, p.1-175, 2013.

LAUPLAND, K.B. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.6, p.492-500, 2013.

LEÃO, R. S. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter related infection. **Clin Microbiol Infect**; v.17: p.380–382, 2011.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.78, n.3, p-510-543, Sep 2014.

LEE CH *et al.* Hypermucoviscosity associated with *Klebsiella pneumoniae*-mediated invasive syndrome: a prospective cross-sectional study in Taiwan. **Int J Infect Dis**.v.14,n.8,p.688-92, aug;2010.

LIAO, C.Y. Invasive liver abscess syndrome predisposed by *Klebsiella pneumoniae* related prostate abscess in a nondiabetic patient: a case report. **BMC Research Notes**, v.9, n.395, p.1-11, 2016.

LI, Y.H. *et al.* Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. **Sensors (Basel)**, v.12, n.3, p.2519-2538, 2012.

LIN, T.L. *et al.* Amino Acid Substitutions of MagA in *Klebsiella pneumoniae* Affect the Biosynthesis of the Capsular Polysaccharide. **PLOS ONE**.v.7, n.10, p.467- 483, 2012.

LOCKMAN, J.L. *et al.* Scrub the Hub! Catheter Needleless Port Decontamination. **Anesthesiology**, v.114, n.4, p. 958, 2011.

LORENTE, L. *et al.* Chlorhexidine-silver sulfadiazine- or rifampicin miconazole-impregnated venous catheters decrease the risk of catheter-related bloodstream infection similarly. **Am J Infect Control**, v.44, n.1, p.50-53, 2016.

LORENTE, L. *et al.* Chlorhexidine-silver sulfadiazine-impregnated venous catheters are efficient even at subclavian sites without tracheostomy. **Am J Infect Control**, v.44, n.12, p.1526-1529, 2016.

LUZZARO F. Fluorochinoloni e Gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. **Le Infezioni in Medicina**, Supplemento 2, v. 16, Aprile, 2008.

MAH, T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiol**, v.7, n.9, p. 1061–1072, 2012.

MAHESHWARI, M.; AHMAD, I.L ; ALTHUBIANI, A. S. Multidrug resistance and transferability of blaCTX-M among extended-spectrum β -lactamase-producing enteric bacteria in biofilm. **J Glob Antimicrob Resist** ,v. 6, p.142-149, Sep, 2016.

MAKIPOUR, K.; FRIEDENBERG F.K. The potential role of N-acetylcysteine for the treatment of Helicobacter pylori. **J Clin Gastroenterol**, v.45, n.10, p.841-843, 2011.

MANSOURI M.D. *et al.* In Vitro Activity and Durability of a Combination of an Antibiofilm and an Antibiotic against Vascular Catheter Colonization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. January, v. 57, n. 1, 2013.

MARRA, A.R. *et al.* Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum -lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **BMC Infectious Diseases**, v.6, n 24, p.1 – 8, 2006.

MARTIN, M *et al.* Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae* .**MSphere** .v. 1, n. 5, Sep-Oct, 2016.

MARTINS, W.M, B.S. Estudo de mecanismos de resistência e virulência em isolados de *klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase. **Dissertação** (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz,168p,2014.

MARTÍNEZ, J. *et al.* How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int Microbiol**, v.7, n.4, p.261-268, 2004.

MARTINEZ, P. *et al.* CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.16, n.5, p.420-425, 2012.

MAZZO, A. *et al.* Cateter urinário: Mitos e rituais presentes no preparo do paciente. **Acta Paul Enferm**, v.25, n.6, p.889-94,2012.

MCCABE, R.*et al.* Invasive *Klebsiella pneumoniae* infections, California, USA. **Emerg Infect Dis**, v.16, n.9, p.1490-1491, 2010.

MENGI, S. *et al.* Biofilms: A Diagnostic Challenge In Persistent Infections. **International Journal of Research in Medical and Health Sciences**, v. 2, n.3, 2013.

MAY,E.R. *et al.* Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates.**Vet Dermatol**, v.27, n.3, p.188-97, 2016.

MERMEL, L.A.*et al.* Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**.v.49,p.1-45,2009.

MERRITT, J.H.; KADOURI, D.E.; O'TOOLE, G.A. Growing and Analyzing Static Biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, August, v.1, n.1, p.1-18, 2011.

MILSTONE, A.M. *et al.* Catheter Dwell Time and CLABSIs in Neonates with PICCs: A Multicenter Cohort Study. **Pediatrics**, December, v.132, n. 6, 2013.

MIKUCIONYTE. G. *et al.* Biofilm formation and serum susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Central European Journal of Medicine**, v. 9, n. 2, p.187–192, April 2014.

MONTGOMERIE, J.Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis*. v.1, n.5, p.736-53, Sep-Oct, 1979.

MOHSEN, A. *et al.* Antibacterial, Anti-biofilm Activity of Some Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs and N-acetyl Cysteine against Some Biofilm Producing Uropathogens. **American Journal of Epidemiology and Infectious Disease**, v.3, n. 1,p. 1-9,2015.

MOREAU, N. Evidence-based consensus on the insertion of central venous access devices: definition of minimal requirements for training .**British Journal of Anaesthesia**, p.1-10, 2013.

MURGA, R.; MILLER, J. M; DONLAN, R. M. Biofilm Formation by Gram-Negative Bacteria on Central Venous Catheter Connectors: Effect of Conditioning Films in a

Laboratory Model **Journal of Clinical Microbiology**, June, v. 39, n.6,p. 2294–2297,2001.

MURUGAN K *et al.* Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.23, n.1, p.150-159, 2016.

MURPHY C. N; CLEGG S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. **Future Microbiol.**, v. 7, n.8, p. 991–1002, 2012.

NADASY, K.A. *et al.* Invasive *Klebsiella pneumoniae* syndrome in North America.Clin Infect Dis, v.45, n.3, p..25-28,2007.

NAMIKAWA *et al.* Two unusual cases of successful treatment of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* invasive syndrome. **BMC Infect Dis.** v.16, n.1, p.1-17, e.680, nov, 2016.

NAPARSTEK, L. *et al.* Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother**, v.69, n.4, p.1027-1034, 2014.

NEVES, M. A. Jr *et al.* Infecções em cateteres venosos centrais de longa permanência: revisão da literatura. **J Vasc Bras.**, v.9, n.1, p.46-50, 2010.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect. Dis.**, v.9, p.228–236, 2009.

NOVIKOV, A. *et al.* Impact of catheter antimicrobial coating on species-specific risk of catheter colonization: a meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v.1, n.40, p. 1- 9, 2012.

ODA T *et al.* Anaphylactic shock induced by an antiseptic-coated central venous [correction of nervous] catheter. **Anesthesiology**, v.88, n.2, p.1242-1244, 1997.

O'GRADY, N.P. *et al.* Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). **Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections.** Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2011.

OLOFSSON, A.C.; HERMANSSON, M.; ELWING, HANS. *N*-Acetyl-L-Cysteine Affects Growth, Extracellular Polysaccharide Production, and Bacterial Biofilm Formation on Solid Surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Aug., v.69, n.8, p. 4814–4822, 2003.

- PATEL J.D. *et al.* S. epidermidis biofilm formation: effects of biomaterial surface chemistry and serum proteins. **J Biomed Mater Res A**, v.80, n.3, p.742-751, n. Mar 1, 2007.
- PARKER, S.L. *et al.* Cost Savings Associated with Antibiotic-Impregnated Shunt Catheters in the Treatment of Adult and Pediatric Hydrocephalus. **World Neurosurg.** , v. 83, n.3, p. 382-386, 2015.
- PEDROLO, E; DANSKI, M. T. R.; VAYEGO, S. A. Chlorhexidine and gauze and tape dressings for central venous catheters: a randomized clinical trial. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**.Sept, v.22, n.5, p.764-71, 2014.
- POULOU, A. *et al.* Imported *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* Clones in a Greek Hospital: Impact of Infection Control Measures for Restraining Their Dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**, August, v. 50, n. 8. p. 2618–2623, 2012.
- PROIA, L. *et al.* Occurrence and persistence of antibiotic resistance genes in river biofilms after wastewater inputs in small rivers. **Environ Pollut**, n. 210, p.121-128, Mar 2016.
- PROFT, T. ; BAKE, E. N. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. **Sciences, February**, v. 66, n.4, p. 613-635, 2009.
- QURESHI, Z.A. *et al.* Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2108–2113, 2012.
- QUINN, J.P. *et al.* Novel plasmid mediated b-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, p.1451–1456, 1989.
- RAAD I *et al.* Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. **J. Antimicrob. Chemother.** v.62, n.4, p.746–750, 2008.
- RAAD, I. *et al.* Improved Antibiotic-Impregnated Catheters with Extended-Spectrum Activity against Resistant Bacteria and Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.6, p. 935 – 941, 2012.
- RANJBAR, R. *et al.* Molecular detection and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* from houseflies (*Musca domestica*) in kitchens, farms, hospitals and slaughterhouses. **Journal of Infection and Public Health**, v.9, n.4, p.499-505, 2016.

REGUEIRO, V. *et al.* The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells.

Microbiology, v.152, p. 555–566, 2006.

RIBEIRO, P.C.S. *et al.* Phenotypic and molecular detection of the *bla*_{KPC} gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, n.737, p.1-16, 2016.

ROBICSEK A.; JACOBY G.A.; HOOPER DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Dis**, v.10, p.629–640, 2006.

RODRÍGUEZ J.M.M. Mechanisms of plasmid-mediated resistance to quinolones. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 23, p.25–31, 2005.

RODRÍGUEZ, J.M.M. *et al.* Activity of ciprofloxacin and levofloxacin in experimental pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* deficient in porins, expressing active efflux and producing QnrA1. **Clin Microbiol Infect**; v.14: p.691–697, 2008.

RUPP, M.E. *et al.* Effect of a second-generation venous catheter impregnated with chlorhexidine and silver sulfadiazine on central catheter-related infections: a randomized, controlled trial. **Ann. Intern. Med**, v.143, p.570 –580, 2005.

SADEKUZZAMAN, M. *et al.* Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. **Comprehensive reviews**.v.14, p.491-509, 2015.

SALEEM, A.F *et al.* Trends in antibiotic susceptibility and incidence of late-onset *Klebsiella pneumoniae* neonatal sepsis over a six-year period in a neonatal intensive care unit in Karachi, Pakistan. **Int.J.Infect.Dis**, v.17, n.11, p.961-965, 2013.

SAIN R *et al.* Biofilm: A dental microbial infection. **J NatSci Biol Med**.v.2, n.1, p.71-75, 2011.

SAHLI, F; FEIDJEL, R; LAALAOUI, R. Hemodialysis catheter-related infection: rates, risk factors and pathogens .**J Infect Public Health**; Jul 2016.

SAMARANAYAKE, Y. H. *et al.* Human Serum Promotes *Candida albicans* Biofilm Growth and Virulence Gene Expression on Silicone Biomaterial. **PLOS ONE**, v.8, n.5, e. e62902, May, 2013.

SCHEMBRI, M.A. *et al.* Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, Aug., 73, n.8, p. 4626–4633, 2005

SCHIAVONE, P. A.; STONER, N.E.; COMPHER, C.W.; KINOSIAN, B. P.; BOULLATA, J. I. Management of Catheter-Related Infection in Patients Receiving Home Parenteral Nutrition. **Practical gastroenterology**, October, série 88, p. 22-34, 2010.

- SCHROLL, C. *et al.* Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v.10, n.179, p.1-10, 2010.
- SCOTT J. R.; ZÄHNER, D. Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. **Molecular Microbiology**, v. 62, n.2, p. 320–330, 2006.
- SEBGHATI, T. A. S. *et al.* Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* Strains. **Infection and Immunity**, June, v.66, n. 6, p. 2887–2894, 1998.
- SEIFI, K. *et al.* Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundisharpur J Microbiol**, v.9, n.1, p.1-16, 2016.
- SIDDIQ, D.M.; DAROUICHE, R.O. New strategies to prevent catheter-associated urinary tract infections. **Nature Reviews | Urology**, June, v.9, p.305-3014, 2012.
- SINGHAI, M. *et al.* A Study on Device-Related Infections with Special Reference to Biofilm Production and Antibiotic Resistance. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.4, n.4, p.193-198, 2012.
- SIQUEIRA, G. L. G *et al.* Infecção de corrente sanguínea relacionada a cateter venoso central (ICSRC) em enfermarias: estudo prospectivo comparativo entre veia subclávia e veia jugular interna. **J Vasc Bras.**, v. 10, n. 3, p.211-216, 2011.
- SHPIGEL, N.Y. *et al.* Diversity of Bacterial Biofilm Communities on Sprinklers from Dairy Farm Cooling Systems in Israel. **PLOS ONE**, v,10, n.9, p.1-14,2015.
- SRIVASTAVA, S.; BHARGAVA, A. Biofilms and human health. **Biotechnol Lett** , v. 38, n.1, p.1-22, Jan 2016.
- SHAH H. *et al.* Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection. Improving Health Care Quality: Review. **The Neurohospitalist**, v.3, n.3, p. 144-151, 2013.
- SHON, A. S.; RUSSO, T. A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: the next superbug. **Future Microbiol.** v. 7, n.6, p.669–671, 2012.
- SHON, A.S. *et al.* Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Virulence**, v.4, n.2, p.107-118, 2013.
- SNITKIN, E.S. *et al.* Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole Genome Sequencing. **Sci Transl Med**. August, v. 22; n. 4, p.1-18, 2012.

SOKURENKO, E.V. *et al.* FimH Family of Type 1 Fimbrial Adhesins: Functional Heterogeneity due to Minor Sequence Variations among fimH Genes. **Journal of Bacteriology**, Feb., v.176, n. 3, p. 748-755, 1994.

SOLANO, C. *et al.* Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v.18, p.96-104, 2014.

SONG, Z *et al.* Prosthesis infections after orthopedic joint replacement: the possible role of bacterial biofilms. **Orthop Rev (Pavia)**, v.5, n.2, e.14, p.1-29, 2013.

SOPIRALA, M.M. *et al.* Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.11, p.4678-4683, 2010.

STAHLHUT, S.G. *et al.* Screening for genes involved in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation using a fosmid library. **Immunol Med Microbiol**, v.59, p.521–524, 2010.

STOCCO, J. G. D.*et al.* Second-Generation central venous catheter in the prevention of bloodstream infection: a systematic review. **Rev Lat Am Enfermagem** , v.24 n.2722, p.1-25, Aug 8, 2016.

STAHLHUT, S.G. *et al.* Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. **Immunol Med Microbiol.**, v.65, p.350–359, 2012.

STORTI, A. *et al.* Biofilme detectado em ponta de cateter venoso central por cultura usando método quantitativo, **RBAC**, v. 39, n.3, p.183-187, 2007.

STRUVE, C.; KROGFELT, K.A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. **Microbiology Letters**, v.218, p.149-154, 2003.

TALIBI, S *et al.* Has the introduction of antibiotic-impregnated external ventricular drain catheters changed the nature of the microorganisms cultured in patients with drain-related infection? A single neurosurgical centre's experience. **Br J Neurosurg**.v. 30, n.5, p.560-566, Oct., 2016

TAN, X. *et al.* Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*. **Sci. Rep.**, July, n.11997, p.1-12, 2015.

TIMSIT, J.F. *et al.* Treatment of bloodstream infections in ICUs. **BMC Infectious Diseases**, v.14, n.489, p.1-11, 2014.

TOFTELAND, S. *et al.* A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. **PLOS ONE**, March, v. 8, n. 3, p .1 – 8, 2013.

- TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. **Am J Infect Control**, May, v.32, n.3, p. 177–183, 2004.
- VALENCIA, C. *et al.* Poor adherence to guidelines for preventing central line-associated bloodstream infections (CLABSI): results of a worldwide survey. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.5, n. 49, 2016.
- VENTURINI, V. *et al.* O papel do enfermeiro no manejo da monitorização hemodinâmica em unidade de terapia intensiva, *Revista Científica de Enfermagem*.v.6,n.17,p.-19-23,2016.
- VERMA, A. *et al.* Differences in Bacterial Colonization and Biofilm Formation Property of Uropathogens between the Two most Commonly used Indwelling Urinary Catheters. **J Clin Diagn Res**, v.10, n.6, p.1-14, 2016.
- VISCOLI, C.; VARNIER, O.; MACHETTI, M. Infections in Patients with Febrile Neutropenia: Epidemiology, Microbiology, and Risk Stratification. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, n.4, p.240-245, 2005.
- VUOTTO, C. *et al.* Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v.3, p. 743-758, 2014.
- ZAMANI *et al.* Detection of magA Gene in *Klebsiella* spp. Isolated from Clinical Samples. **Iran J Basic Med Sci**. v.16, n.2, p.173-176, 2013.
- ZARKOTOU, O. *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n.12, 2011.
- ZHAO K *et al.* Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, **NATURE** n.497, p.388-391, 2013.
- WANG, Q. *et al.* Genotypic Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Beijing Hospital Reveals High Genetic Diversity and Clonal Population Structure of Drug-Resistant Isolates. **PLOS ONE**. v. 8, n.2, e, 57091, Feb 2013.
- WASSIL, S. K.; CRILL, C. M.; PHELPS, S. J. Antimicrobial Impregnated Catheters in the Prevention of Catheter- Related Bloodstream Infection in Hospitalized Patients. **J. Pharmacol. Ther.** , v.12, n.2, p.77-90, 2007.
- WEN ,C. K. Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, February, 2002.

WENG, M. *et al.* Life-threatening anaphylactic shock due to chlorhexidine on the central venous catheter: a case series. **Clinical and Experimental experience**, v.7, n.12, p.5930-5936, 2014.

WHITE, J.R.; COOPER, R. Silver sulphadiazine: A review of the evidence. **Clinical Review**.p.51-61.

WH, L. *et al.* Clinical and Microbiological Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Community-Acquired Urinary Tract Infections. **Infection**, v.38, n.6, p.459-464, 2010.

WL *et al.* Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. **Diagn Microbiol Infect Dis**.v.62, n.1, p-1- 6, sep. 2008.

WU, H. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v.7, p.1-7, 2014.

WU, M.C.; LIN, T.L.; HSIEH, P.F.; YANG H.C.; WANG,J.T. Isolation of Genes Involved in Biofilm Formation of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Causing Pyogenic Liver Abscess. **PLoS ONE**, v.6, n.8, p.1-11, 2011.

WUREN, T. *et al.* Effect of serum components on biofilm formation by *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Jpn J Infect Dis**, v.67, n.3, p.172-179, 2014.

YOSHIDA, T. *et al.* Clinical efficacy of silver sulfadiazine (AgSD: Geben cream) for ulcerative skin lesions infected with MRSA. **Japanese J Antibiot**. Jan, v.50, n.1p.39-44, 1997.

YU, S. *et al.* A novel survival strategy of *Pseudomonas aeruginosa*: using exopolysaccharides to sequester and store iron to stimulate Psl-dependent biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol**, v.82, n.21, p.6403-6413,2016.

YU, WL *et al.* Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. **Diagn Microbiol Infect Dis**.v.62, n.1, p.1- 6, Sep. 2008.

APÉNDICE



Tabela 02. Perfil de susceptibilidade da amostra referência ATCC 13883 *K. pneumoniae* e subpopulações resistentes a combinação de NAC+ LEV.

ANTIMICROBIANOS	ATCC 13883 K. <i>pneumoniae</i>	ATCC1 7DIA	ATCC2 7DIA	ATCC1 15 DIA	ATCC215 DIA
<i>BLSE</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
<i>AMPICILINA</i>	16 - R	≥ 32 R	≥ 32 R	16 - R	16 - R
<i>AMPICILINA/SUBACTAM</i>	≤ 2 S	4 S	4 S	≤ 2 S	≤ 2 S
<i>PIPERACILINA /TAZOBACTAM</i>					
<i>CEFUROXIMA</i>	≤ 1 S	4 S	4 S	≤ 1 S	≤ 1 S
<i>CEFUROXIMA AXETIL</i>	≤ 1 S	4 S	4 S	≤ 1 S	≤ 1 S
<i>CEFOXITINA</i>	≤ 4 S	≤ 4 S	≤ 4 S	≤ 4 S	≤ 4 S
<i>CEFTAZIDIMA</i>	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S
<i>CEFTRIAXONA</i>	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S	≤ 1 S

<i>CEFEPIMA</i>	≤ 1				
	S	S	S	S	S
<i>ERTAPENEM</i>	$\leq 0,5$				
	S	S	S	S	S
<i>IMIPINEM</i>	$\leq 0,25$				
	S	S	S	S	S

Tabela 03. Perfil de interação sinérgica das subpopulações de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

ATCC NAC+LEV	ATCC1 7D NAC+LEV	ATCC2 7D NAC+LEV	ATCC 1 15D NAC+LEV	ATCC 2 15 NAC+LEV					
NAC 512 µ/ML	LEV <0,01 µ/mL	NAC 512 µ/mL	LEV 2µ/mL	NAC 512 µ/mL	LEV 2µ/mL	NAC 512 µ/mL	LEV 2µ/mL	NAC 512 µ/mL	LEV 0,06 µ/mL
256 µ/ML	< 0,01 µ/mL	256 µ/mL	1µ/mL	256 µ/mL	2µ/mL	256 µ/mL	2µ/mL	256 µ/mL	0,06 µ/mL
128 µ/ML	< 0,01 µ/mL	128 µ/mL	1µ/mL	128 µ/mL	2µ/mL	128 µ/mL	2µ/mL	128 µ/mL	0,06 µ/mL
64 µ/ML	< 0,01 µ/mL	64 µ/mL	0,5µ/mL	64 µ/mL	2µ/mL	64 µ/mL	2µ/mL	64 µ/mL	0,06 µ/mL
32 µ/ML	< 0,01 µ/mL	32 µ/mL	0,5µ/mL	32 µ/mL	2µ/mL	32 µ/mL	2µ/mL	32 µ/mL	0,06 µ/mL
16 µ/ML	< 0,01 µ/mL	16 µ/mL	0,5µ/mL	16 µ/mL	2µ/mL	16 µ/mL	2µ/mL	16 µ/mL	0,06 µ/mL

8 μ/mL	< 0,01 μ/mL	8 μ/mL	2μ/mL	8 μ/mL	2μ/mL	8 μ/mL	2μ/mL	8 μ/mL	0,125 μ/mL ⁵
-----------	----------------	-----------	-------	-----------	-------	-----------	-------	-----------	----------------------------

Tabela 04. Perfil de interação sinérgica das subpopulações de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

KPC NAC+LEV		KPC1 3D NAC+LEV		KPC 2 3D NAC+LEV		KPC 3 7D NAC+LEV		KPC 4 7D NAC+LEV		KPC1 7D		KPC2 7D		KPC1 15D		KPC2 15D	
NAC 512 µg/mL	LEV 0,125 µg/mL	NAC 512 µg/mL	LEV 0,125 µg/mL	NAC 512 µg/mL	LEV 0,125 µg/mL	NAC 512 µg/mL	LEV 2 µg/mL	NAC 512 µg/mL	NAC 0,25 µg/mL	NAC 512 µg/mL	LEV 2 µg/mL						
256 µg/mL	0,125 µg/mL	256 µg/mL	0,125 µg/mL	256 µg/mL	0,125 µg/mL	256 µg/mL	2 µg/mL	256 µ/mL	0,12 µ/mL	256 µ/mL	2 µ/mL						
128 µg/mL	0,125 µg/mL	128 µ/mL	0,125 µ/mL	128 µ/mL	0,125 µ/mL	128 µ/mL	2 µ/mL	128 µ/mL	0,06 µ/mL	128 µ/mL	2 µ/mL	128 µg/mL	2 µg/mL	128 µ/mL	2 µ/mL	128 µ/mL	2 µ/mL
64 µg/mL	0,125 µg/mL	64 µ/mL	0,125 µ/mL	64 µ/mL	0,125 µ/mL	64 µ/mL	2 µ/mL	64 µ/mL	0,06 µ/mL	64 µ/mL	2µ/mL						
32 µ/mL	0,125 µ/mL	32 µ/mL	0,125 µ/mL	32 µ/mL	0,125 µ/mL	32 µ/mL	2 µ/mL	32 µ/mL	0,06 µ/mL	32 µ/mL	2µ/mL						
16 µ/mL	0,125 µ/mL	16 µ/mL	0,125 µ/mL	16 µ/mL	0,125 µ/mL	16 µ/mL	2 µ/mL	16 µ/mL	0,06 µ/mL	16 µ/mL	2µ/mL						

8 μ /mL	< 0,01 μ /mL	8 μ /mL	2 μ /mL	8 μ /mL	2 μ /mL	8 μ /mL	2 μ /mL	8 μ /mL	0,125 μ /mL5				
----------------	---------------------	----------------	-------------	----------------	-------------	----------------	-------------	----------------	---------------------	--	--	--	--

