

COLONIZAÇÃO POR *Staphylococcus aureus* EM PORTADORES SÃOS RELACIONADOS DE UMA CRECHE DE HOSPITAL UNIVERSITÁRIO

COLONIZATION BY STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HEALTHY CARRIERS FROM A NURSERY IN A UNIVERSITY HOSPITAL

Branca Maria de Oliveira Santos¹ & Ana Lúcia da Costa Darini²

¹Professor Livre-Docente pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto-USP. ²Docente do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto—USP.

Correspondência: Ana Lúcia da Costa Darini. Av. Café s/n – CEP:14.040-903-Ribeirão Preto-SP. aldarini@fcfrp.usp.br

OLIVEIRA SANTOS BM & DARINI ALC Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores sãos relacionados de uma creche de hospital universitário. *Medicina, Ribeirão Preto*, 35: 160-172, abr./jun. 2002.

RESUMO: O propósito deste estudo é verificar o quadro de colonização pelo *Staphylococcus aureus* entre portadores sãos, relacionados, do Centro de Convivência Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), e conhecer algumas características bacteriológicas e moleculares das linhagens isoladas, com vistas ao estabelecimento de relações epidemiológicas entre as amostras. As amostras de *S. aureus* foram obtidas da cavidade nasal, mão direita e mão esquerda de 37 mães ou responsáveis que trabalham no Serviço de Enfermagem do HCFMRP-USP, há mais de 6 meses e que utilizam o CCI durante a jornada de trabalho, 39 filhos ou dependentes das mesmas e de 39 funcionários que prestam assistência às crianças durante a estada no centro. Desse total, foram isoladas 55 amostras, das quais 58,2%, da cavidade nasal, 20,0% da mão direita e 21,8% da mão esquerda, demonstrando predominância de colonização na cavidade nasal. Os resultados do antibiograma sugeriram a caracterização de amostras com modelos de resistência a, no máximo, dois antimicrobianos. A análise dos padrões de restrição por *Pulsed Field Gel Electrophoresis*, utilizando-se a enzima de restrição *Sma I* e as avaliações de similaridade que foram estimadas por dendogramas, demonstraram baixa similaridade genética entre os portadores, principalmente entre os funcionários do CCI e as crianças atendidas por eles. A maior similaridade genética foi observada entre algumas crianças e suas respectivas mães ou responsáveis. O estudo genotípico teve um papel importante no delineamento e comparação das amostras de *S. aureus* dos portadores, já que só o antibiograma não daria parâmetros suficientes para uma precisa relação epidemiológica entre as amostras dos portadores sãos, mencionados neste estudo.

UNITERMOs: *Staphylococcus aureus*. Creches. Colonização. Tipagem Bacteriana.

1. INTRODUÇÃO

O portador são tem sido representado pelo indivíduo que alberga agentes infectantes, passíveis de invadirem o organismo de outro ser vivo, embora se apresente destituído de sintomatologia. Ele tem sido considerado a mais silenciosa, porém, a mais preocupante

fonte de microrganismos responsáveis por infecções, não havendo outra forma de reconhecê-lo, que não mediante a adoção de métodos laboratoriais¹. Dentre os membros patogênicos da microbiota normal, distingue-se o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), responsável por infecções piogênicas como furúnculos, foliculites, osteomielites, endocardites, pneumonias,

septicemias fatais e outros tipos de manifestações, podendo ser encontrado em várias partes do corpo, principalmente na pele e nas mucosas, tais como fossas nasais, mãos, garganta, intestino^{2,3,4,5}. É comumente transmitido de pessoa a pessoa (infecção cruzada), através do contato indireto (aerossóis, secreções, poeira, fômites e alimentos) ou por contato direto, estando, a transferência na dependência da presença de uma fonte (doentes ou portadores) e da taxa de microorganismos liberados, o que, por sua vez, está na dependência da capacidade de sobrevivência do agente e de sua patogenicidade, da presença de indivíduos suscetíveis e da freqüência de contatos entre os suscetíveis e os infectados.

A definição dessas informações tem sido obtida através da utilização de marcadores epidemiológicos, dentre os quais destacam-se o antibiograma, método clássico de tipagem fenotípica, e o perfil de macrorrestrição do DNA cromossômico (crDNA), detectado por eletroforese em campos pulsados, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis* PFGE, método molecular de tipagem genotípica.

Assim, com o intuito de buscar mais uma aproximação ao papel epidemiológico do portador são de *S. aureus* como fonte de infecção e ao provável risco a que ele está exposto em função das atividades desenvolvidas, nos propusemos, neste estudo, a verificar o quadro de colonização pelo *S. aureus* entre portadores saudáveis, relacionados num centro de convivência infantil de um hospital geral e escola e a conhecer algumas características bacteriológicas e moleculares das linhagens isoladas, com vistas ao estabelecimento de associações (relação epidemiológica) entre as amostras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local do estudo

O estudo foi realizado no Centro de Convivência Infantil do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (CCI-HCFMRP-USP), que tem por finalidade atender, assistir e orientar as crianças, filhos ou dependentes legais das servidoras, durante seu expediente normal de trabalho neste hospital"⁶. O referido centro funciona em prédio próprio, anexo ao hospital e recebe, observada sua capacidade de atendimento, crianças na faixa etária de, no mínimo, 01 mês a 03 anos de idade.

A estrutura física do prédio é composta por dois blocos: A, constituído pelos Berçários 1, 2, 3, 4, 5 e 6, onde são alocadas as crianças, de acordo com as fai-

xas etárias entre 1 mês a 1 ano e 9 meses. O bloco B é constituído pelo Minimaternal 1 que congrega crianças de 1 ano e 10 meses a 2 anos e 1 mês; Minimaternal 2, com crianças de 2 anos e 2 meses a 2 anos e 6 meses; Maternal 1, de 2 anos e 6 meses a 2 anos e 10 meses e Maternal 2, com crianças de 2 anos e 9 meses a 3 anos e 2 meses.

No momento da realização do estudo, o atendimento às crianças era feito por 40 auxiliares de enfermagem e atendentes de babá, treinados pelo hospital, responsáveis diretos pelas atividades relacionadas à alimentação, higiene, administração de medicamentos, recreação e coordenação motora das crianças, duas médicas, responsáveis pelo suporte às crianças que demandavam assistência médica, uma psicóloga, uma assistente social, um segurança, um chefe de pessoal e cinco pessoas, responsáveis pela coordenação dos trabalhos pedagógicos e de recreação.

O horário de funcionamento do centro é de 2 a 6 feira, das 6:30 h às 19:30 h e, aos sábados, das 6:30 h às 17:30 h, não funcionando nos feriados e dias de ponto facultativo. Os funcionários trabalham em dois turnos de 6 h diárias, com 35 h semanais, num esquema de 5 plantões por semana sendo um de 12 h diárias.

A criança freqüenta o CC em horário fixo, compatível com o da mãe ou responsável. Durante sua permanência no centro, é vedada a visita, exceto da mãe, quando no período de amamentação ou quando solicitada, não podendo haver interferência nem da mãe nem do responsável, durante o período em que o atendimento é prestado pelos profissionais do centro de convivência.

2.2. População envolvida no estudo

As amostras de *S. aureus* foram obtidas da cavidade nasal (N), mão direita (Md) e mão esquerda (Me) de 37 mães ou responsáveis que trabalham há mais de 6 meses no Serviço de Enfermagem do HCFMRP-USP, em diferentes unidades, de internação e ambulatorial, do hospital e que utilizam o CCI durante a jornada de trabalho; de 39 filhos ou dependentes das mesmas e de 39 funcionários que prestam assistência às crianças durante estada delas no centro, que concordaram em participar do estudo e que atenderam aos critérios estabelecidos, totalizando 115, participantes e, consequentemente, 345 colheitas.

E importante ressaltar que, no momento da coleta das amostras, os participantes não poderiam apresentar nenhuma lesão nas áreas anatômicas pesquisadas, nem qualquer sinal ou sintoma de infecção, assim como não poderiam estar tomando qualquer tipo de antibiótico ou de quimioterápico. Aten-

dendo às normas éticas e legais para a condução de pesquisas envolvendo seres humanos, o estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital (Of. n° 1362/97) e pela Direção do CCI (Proc. N° 4.700/97).

Antes da colheita do material, as mães ou responsáveis e os funcionários do CCI-HCFMRP-USP assinaram o “Consentimento Livre e Esclarecido” em duas vias, ficando uma com eles e a outra com as pesquisadoras. No termo de consentimento, eram fornecidas informações sobre a pesquisa, os procedimentos adotados, a garantia do caráter confidencial das informações, o direito de esclarecimento a qualquer dúvida acerca da pesquisa e dos resultados e sobre a possibilidade de recusa e da retirada do consentimento a qualquer momento. Considerando a impossibilidade de o menor assumir tal consentimento, a mãe ou responsável responsabilizava-se pelo mesmo.

2.3. Colheita e identificação das amostras

Durante um período de 20 dias, foram colhidas todas as amostras da cavidade nasal e mãos (direita e esquerda) dos funcionários do centro de convivência, das mães ou responsáveis e das crianças.

As amostras foram obtidas sempre pelo mesmo pesquisador, sendo que as da cavidade nasal foram colhidas com zaragatoas estéreis, umedecidas em solução fisiológica, através de atrito com movimentos circulares em ambos os vestíbulos nasais, por três vezes, e as amostras das mãos foram colhidas em sacos plásticos esterilizados, contendo 10 mL de solução fisiológica (NaCl, 0,85%), na qual os participantes colocavam as mãos, uma a uma, friccionando-as com a solução fisiológica, por um minuto. Foi utilizado um saco para cada mão.

As amostras colhidas foram semeadas diretamente nas placas contendo ágar *Bacto Salt Manitol* (Difco), meio seletivo para o estafilococo, e incubadas a 37°C, por 24 h. As colônias Manitol com resultado positivo foram semeadas em placa de Agar Naito (NI)^{7,8}, meio seletivo e diferencial para *S. aureus*, pela observação da lecitinase produzida após incubação a 37°C, por 24/48 h. Todas as colônias suspeitas de *S. aureus* foram submetidas ao *Bacto Staph Latex Test* (Difco), para confirmação da espécie.

As amostras da cavidade nasal foram semeadas diretamente nas placas, e as das mãos, colhidas em solução fisiológica com 0,1ml da suspensão nas placas de ágar manitol.

2.4. Tipagem epidemiológica

As amostras de *S. aureus* foram, posteriormen-

te, submetidas ao antibiograma, segundo técnica de KIRBY-BAUER, recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards⁹. Uma suspensão das bactérias em estudo, na escala 0,5 de Mac Farland, foi semeada em placas de cultivo, contendo ágar Müller Hinton (Oxoid), nas quais foram aplicados os discos impregnados contendo: penicilina 10U, lincomicina 2µg, eritromicina 15µg, tetraciclina 30µg, oxacilina 1 µg e vancomicina 30 µg. Após incubação das placas a 37°C, durante 18 a 20 h, cada halo de inibição foi lido com régua milimetrada e as bactérias testadas foram consideradas resistentes se a leitura dos halos foi ≤ 8mm para os discos de penicilina, ≤ 17mm para a oxacilina, ≤ 14mm para a lincomicina, a tetraciclina e vancomicina, e ≤ 13mm para a eritromicina.

A extração do DNA cromossômico bacteriano, para análise do perfil de restrição pela eletroforese em campos pulsados, foi realizada segundo Haertl & Bandlow¹⁰. Brevemente, a lise das células bacterianas e a digestão do crDNA foram realizadas com as bactérias contidas em blocos de agarose (*Agarose Prep — Low Melting Point — Pharmacia*) para evitar quebras inespecíficas no crDNA.

A lise das células bacterianas foi realizada com 100,0 µl de lisostafina (5,0 mg/ml - Sigma), sarcosil (1% - Sigma) e proteinase K (0,5mg/ml - Sigma). A digestão das amostras de *S. aureus*, inseridas nos blocos de agarose, foi realizada com a enzima *Sma*I que cliva o DNA crônossômico no sítio de restrição CCC↓GGG com incubação a 30°C durante 18 a 24 h. A corrida do PFGE foi realizada no aparelho Gene Navigator (Pharmacia) a 180V a 13°C, utilizando-se gel de agarose a 1,5% (Ultra PURE - BRL) preparado em solução de TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Os pulsos elétricos foram por gradiente (*interpolate*), sendo a fase 1, com pulsos de 25 s, durante 20 h; a fase 2, com pulsos de 5 s, durante 4 h e a fase 3, com pulsos de 0,5 s, durante 60 m (total = 25 h). O gel foi corado com brometo de etídio (1 mg/ml) e fotografiado em transiluminador de luz ultravioleta.

A análise estatística foi realizada pelo estudo das porcentagens de similaridade genética entre as amostras através das linhas dos dendogramas obtidos pelo programa de computação MVSP (*Multi Statistics Package*).

As avaliações de similaridade, dadas pelos dendogramas, estimam a proximidade genética pela distância horizontal entre duas ou mais amostras, percorrendo-se suas linhas verticais, e o valor encontrado indica se as amostras são idênticas, similares ou diferentes. O critério utilizado foi estabelecido pelo Special

Microbiology Laboratory Department of Pathology — College of Medicine — University of Iowa USA: padrão idêntico é dado quando todas as batidas são iguais, com 100% de similaridade genética padrão similar, quando a maioria das bandas são iguais, com similaridade genética entre 90 a 99% e linhagens de padrão diferente, quando raras bandas são iguais, dando similaridade genética abaixo de 90%¹¹.

3. RESULTADOS

Das 345 colheitas realizadas das áreas anatômicas selecionadas, foram isoladas 55 amostras de *S. aureus*, das quais 32 (58,2%) da cavidade nasal (N), 11(20,0%) da mão direita (Md) e 12 (21,8%) da mão esquerda (Me). A distribuição dessas amostras por grupos de participantes: funcionários da creche (F), mães ou responsáveis (M) e crianças (C) encontrase na Tabela I.

O modelo de perfil de suscetibilidade aos antibióticos, adotado para as amostras isoladas, foi baseado no resultado de resistência (R) e/ou sensibilidade (S) dado pelo antibiograma. através do conjunto de seis letras, sempre na seguinte sequência: penicilina, lincomicina, eritromicina, tetraciclina, oxacilina e vancomicina.

Os resultados dos antibiogramas possibilitaram o agrupamento de 6 modelos, caracterizados por SSSSSS, RSSSSS, SSRSSS, RSRSSS, RSSRSS e RSRRSS, com predomínio dos modelos de RSRSSS (63,6%) e RSSSSS (25,5%). Apenas uma amostra apresentou modelo com resistência a três antimicro-

bianos (RSRRSS), sendo ela isolada da cavidade nasal de uma mãe que exercia atividades no ambulatório de pediatria do hospital (Tabela II).

Os perfis da macrorrestricção dos crDNAs das amostras de *S.aureus* estão apresentados nas Figuras de 1 a 4, com a avaliação da similaridade genética entre as amostras bacterianas estimada por dendogramas que fornecem valores em percentagens para avaliar a similaridade genética entre as amostras analisadas.

Relacionando as amostras pela faixa etária das crianças e, consequentemente, pela distribuição de atendimento nos diferentes setores do centro, os resultados de PFGE mostram que, no Berçário 1, somente uma funcionária (F7), duas crianças (C13 e C36) e as mães correspondentes (M13 e M36) eram portadoras de *S.aureus* (Tabela II). Da criança n° 13 (C13) foram isoladas amostras de *S.aureus* da cavidade nasal e mãos direita e esquerda, com 100% de similaridade genética entre elas e, também, entre a isolada da mãe correspondente (M13) (Figura 1). Ainda nesta figura, a criança 36 apresentou ter *S.aureus* na cavidade nasal, sem relação molecular entre a amostra isolada da mão direita de sua mãe (M36) e a amostra da funcionária F7 apresentou baixa similaridade genética (70%) com as amostras isoladas das crianças (C36, C38, C13) e das mães envolvidas (M13 e M36).

Também na Figura 1 encontra-se o resultado da análise do crDNA da criança e da Funcionária do Berçário 3 (C38 e F38). sem nenhuma relação molecular de valor epidemiológico entre elas (60% de si-

milaridade genética), mesmo apresentando antibiogramas muito semelhantes (Tabela II).

Nenhum portador são foi detectado no Berçário 2, e nenhuma mãe das crianças deste berçário também foi portadora. Do mesmo modo, não foi representada nenhuma figura correspondente aos Berçários 4 e 6, por não ter sido detectada nenhuma criança portadora de *S.aureus*, ainda que quatro funcionárias tenham apresentado positividade em uma ou mais áreas anatômicas (F6, FI0, F5 e F9). No entanto, os resultados comprovaram que as referidas funcionárias apresentaram padrões distintos de PFGE, mesmo com padrão de antibiograma idênticos (Tabela II). Somente o F6 foi RSSSSS, os demais foram RSRSSS.

Tabela I: Distribuição das amostras anatômica e grupos de participantes de *Staphylococcus aureus* por área anatômica e grupos de participantes.

Grupo Participante	Áreas Anatômicas*					
	N		Md		Me	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
F	3	(40,6)	2	(18,2)	5	(41,7)
M	2	(37,5)	4	(36,4)	3	(25,0)
C	7	(21,9)	5	(45,4)	4	(21,8)
TOTAL	32	(58,2)	11	(20,0)	12	(21,8)

*F: funcionário; M: mãe ou responsável; C: criança; N: cavidade nasal; Md: mão direita; Me: mão esquerda.

Tabela II: Agrupamento das amostras de *S. aureus* segundo o grupo de participantes, data de colheita, área anatômica, local de trabalho dos participantes e características das amostras isoladas.

Amostra	Data de colheita	Espécime Clínico	Local de trabalho	Antibiograma: Pen Lim Eri Tet Oxa Van						PFGE Sma
				Pen	Lim	Eri	Tet	Oxa	Van	
M36	27/11/97	Mão D	C.Cir.Amb.	R	S	S	R	S	S	S1
C36	8/12/97	Nariz	Berçário 1	R	S	R	S	S	S	S2
M13	25/11/97	Mão E	Recuperação	R	S	R	S	S	S	S3
C13	8/12/97	Nariz	Berçário 1	R	S	R	S	S	S	S3
C13	8/12/97	Mão D	Berçário 1	R	S	R	S	S	S	S3
C13	8/12/97	Mão E	Berçário 1	R	S	R	S	S	S	S3
F7	18/11/97	Nariz	Berçário 1	R	S	S	R	S	S	S4
C38	8/12/97	Nariz	Berçário 3	R	S	R	S	S	S	S5
F38	20/11/97	Nariz	Berçário 3	S	S	R	S	S	S	S6
F6	18/11/97	Nariz	Berçário 4	R	S	S	S	S	S	S7
F10	18/11/97	Nariz	Berçário 4	R	S	R	S	S	S	S8
F10	18/11/97	Mão D	Berçário 4	R	S	S	S	S	S	S8
F10	18/11/97	Mão E	Berçário 4	R	S	R	S	S	S	S8
C23	9/12/97	Mão D	Berçário 5	R	S	R	S	S	S	S9
F32	19/11/97	Nariz	Berçário 5	R	S	R	S	S	S	S10
F32	19/11/97	Mão E	Berçário 5	R	S	S	S	S	S	S11
F5	18/11/97	Nariz	Berçário 6	R	S	R	S	S	S	S12
F9	18/11/97	Nariz	Berçário 6	R	S	R	S	S	S	S13
C16	15/12/97	Mão D	Minimaternal 1	R	S	S	S	S	S	S14
F15	18/11/97	Nariz	Minimaternal 1	R	S	R	S	S	S	S15
F23	19/11/97	Nariz	Minimaternal 1	R	S	R	S	S	S	S16
F23	19/11/97	Mão E	Minimaternal 1	R	S	R	S	S	S	S16
F25	19/11/97	Nariz	Minimaternal 1	R	S	R	S	S	S	S17
F25	19/11/97	Mão E	Minimaternal 1	R	S	S	S	S	S	S17
M5	25/11/97	Nariz	Ped.Amb.	R	S	R	S	S	S	S18
C5	15/12/97	Mão E	Minimaternal 2	R	S	R	S	S	S	S18
F4	18/11/97	Nariz	Minimaternal 2	R	S	R	S	S	S	S19
Eh	18/11/97	Nariz	Minimaternal 2	R	S	R	S	S	S	S20
F22	19/11/97	Nariz	Minimaternal 2	R	S	R	S	S	S	S21
F22	19/11/97	Mão D	Minimaternal 2	R	S	R	S	S	S	S21
F22	19/11/97	Mão E	Minimaternal 2	R	S	S	S	S	S	S21
MB	25/11/97	Nariz	Gastr. Amb.	R	5	5	5	5	5	S22
C3	9/12/97	Nariz	Maternal 1	R	5	5	S	5	5	S22
C3	9/12/97	Mão E	Maternal 1	R	5	5	S	5	5	S22
CiO	22/12/97	Mão D	Maternal 1	R	5	5	R	5	5	S23
C14	8/12/97	Nariz	Maternal 1	R	5	5	5	5	5	S24
C14	8/12/97	Mão D	Maternal 1	R	5	R	5	5	5	S24
C14	8/12/97	Mão E	Maternal 1	R	5	5	5	5	5	S24
C21	9/12/97	Nariz	Maternal 1	R	5	5	5	5	5	S25
M21	26/11/97	Nariz	UETDI	R	5	5	5	5	5	S25
M22	26/11/97	Nariz	Un. Met.	R	S	R	5	5	5	S26
M22	26/11/97	Mão D	Un. Met.	R	5	R	5	5	5	S26
M22	26/11/97	Mão E	Un. Met.	R	5	R	5	5	5	S26
C22	9/12/97	Nariz	Maternal 2	R	5	R	5	S	S	S26

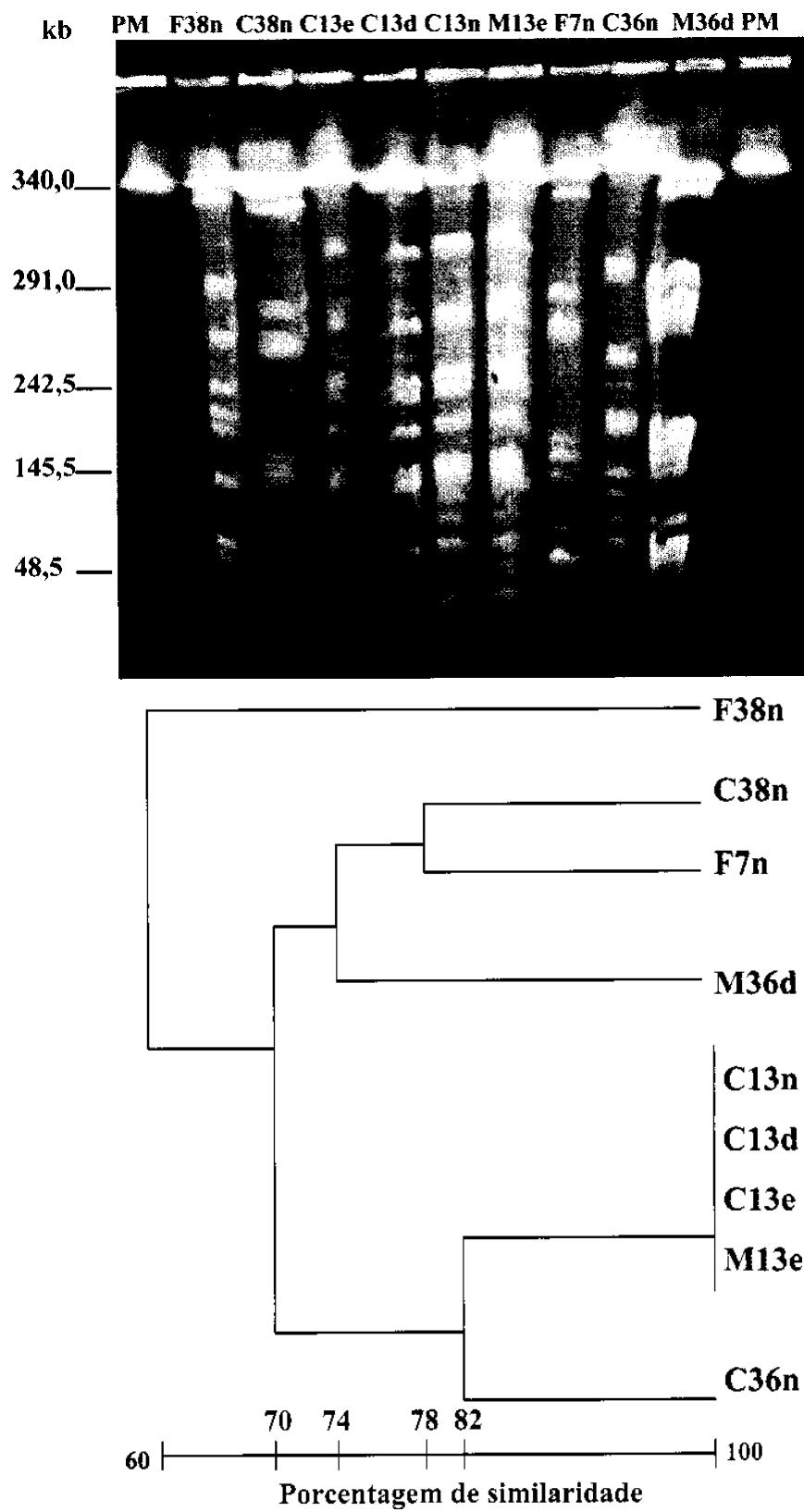


Figura 1. Perfil de macrorrestrição do crDNA dos *S. aureus* isolados, dos portadores dos berçários 1 e 3, obtidos pela digestão com *Sma*I, após separação por PFGE e dendograma representando a similaridade genética entre as amostras. PM - padrão de tamanho dos fragmentos - concatâmeros do fago lambda.

No Berçário 5, somente uma criança foi portadora de *S. aureus* (C23) e a amostra de *S. aureus*, isolada da mão direita da criança, não apresentou relação molecular de valor epidemiológico com as amostras isoladas da única funcionária portadora (F32). A Figura 2 mostra que a funcionária apresentou duas amostras de *S. aureus* (cavidade nasal e mão esquerda) geneticamente distintas.

Também, na Figura 2, estão as análises do crDNA das amostras de *S. aureus* isoladas de três funcionárias e uma criança do Minimaternal 1. Todas as funcionárias (F15, F23, F25) apresentaram amostras de *S. aureus* sem nenhuma relação molecular com a amostra isolada da criança (C 16).

Apresentaram 100% de similaridade genética as duas amostras de *S. aureus* isoladas de uma mesma funcionária (F25) e as duas amostras isoladas de outra funcionária (F23). No entanto, as linhagens de *S. aureus* isoladas das referidas funcionárias não apresentaram relação epidemiológica, pois a porcentagem de similaridade genética entre elas foi de apenas 22% (Figura 2).

A análise do crDNA após macrorrestricção das amostras isoladas de uma criança, três funcionárias e uma mãe ou responsável do Minimaternal 2 estão apresentadas na Figura 3. A amostra da única criança que mostrou ser portadora de *S. aureus* apresentou 100% de similaridade genética com a amostra isolada da mãe correspondente (C5 e M5). A amostra dessa criança, em relação às amostras das funcionárias daquele setor de atendimento, apresentou baixa similaridade genética tal como: 84% em relação à F 11 24% em relação à F4 e 0% de similaridade genética em relação à F22 de quem foram isoladas três amostras, que tiveram 100% de similaridade genética quanto ao perfil de restrição dado pelo PFGE. As amostras de *S. aureus* isoladas da cavidade nasal das funcionárias 11 e 4, que também atendem no Minirnaternal 2, não apresentaram relação genética de valor epidemiológico (24% de similaridade genética).

A Figura 4 refere-se aos Maternais 1 e 2. Em “A”, está o perfil de restrição de três amostras de crDNA sendo duas isoladas da criança nº 3 (C3), que apresentou *S. aureus* na cavidade nasal e mão esquerda, e uma da mãe da criança (M3), mostrando o mesmo bandeamento dos fragmentos de macrorrestricção (100% de similaridade genética). Em “B”, está apresentado o bandeamento 4 crianças (C10, C14, C21 e a mesma C3 já citada) e 2 mães correspondentes (M21 e M22). A amostra da C3 mostrou ter similaridade genética de 86% com a C21 e 73% com a C10. A C21, portadora do *S. aureus* na cavidade nasal, apresentou 100% de similaridade genética com o *S. aureus* isolado da mãe correspondente (M21).

S. aureus isolado da C14 mostrou-se exatamente com o mesmo bandeamento, portanto com 100% de similaridade genética. Tais amostras mostraram 96% de similaridade genética com as amostras isoladas da cavidade nasal da C22, mostrando que as amostras podem ser geneticamente relacionadas, porém, não idênticas. A criança (C22) pertence ao Maternal 2, mas pode manter contato com as outras (C 14 e C21) durante os períodos de recreação, justificando uma possível transmissão. Esse foi o maior valor de % de similaridade genética encontrada entre crianças do CCI. E interessante notar que a mãe da C22 também é portadora da mesma linhagem de *S. aureus* que seu filho, mas não foi considerada a possibilidade de contato da mãe com a C14.

4. DISCUSSÃO

O predomínio da freqüência de positividade na cavidade nasal vem confirmar o que a literatura tem revelado, ou seja, que as fossas nasais têm sido a área mais freqüentemente positiva para *S. aureus* e que a colonização nasal é a responsável pela colonização da superfície cutânea. Esses fatos são relevantes para alertar sobre a preocupação com as vias aéreas superiores na aquisição e transmissão do microorganismo e com a dificuldade de aplicação rotineira de medidas de controle, principalmente quando da necessidade de desenvolvimento de atividades de assistência que requerem certa proximidade física entre o prestador da assistência e o receptor da mesma.

Essa preocupação se torna niais evidente, se considerarmos o fato de as mães exercerem atividades assistenciais de enfermagem junto a pacientes, internados em diferentes unidades de internação do hospital e, ao mesmo tempo, participarem da assistência rotineira exigida pelas crianças sob sua responsabilidade. Do mesmo modo, vale considerar o próprio relacionamento entre as mesmas com os funcionários da creche e desses com as crianças, criando um possível círculo vicioso de oportunidades de transmissão recíproca.

As porcentagens de colonização pela bactéria nas mãos, apesar de, separadamente em menor proporção, e das variações entre os grupos, levaram-nos a considerar que as mãos também têm sido apontadas como uma região importante para a obtenção de amostras de *S. aureus* e têm sido um dos principais meios de transmissão da bactéria, de um indivíduo colonizado para outro suscetível, contribuindo, sensivelmente, para a formação da população de colonizados e para o grande aumento das fontes e reservatórios de amostras resistentes.

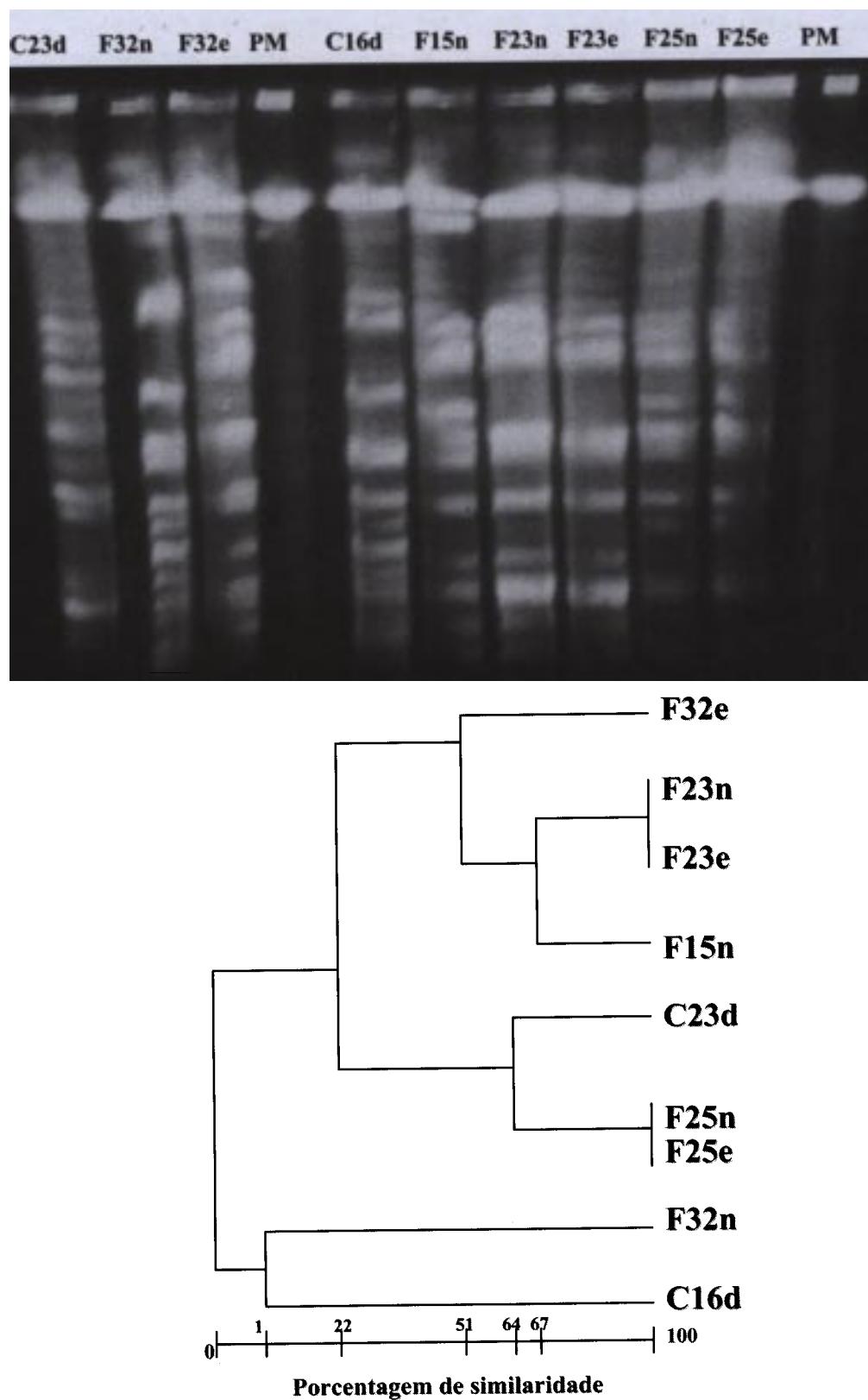


Figura 2. Perfil de macrorrestricção do crDNA dos *S. aureus* isolados, dos portadores do berçário 5 e Minimaternal 1, obtidos pela digestão com *Sma*I após separação por PFGE e dendograma representando a similaridade genética entre as amostras. PM - padrão de tamanho dos fragmentos - concatâmeros do fago lambda.

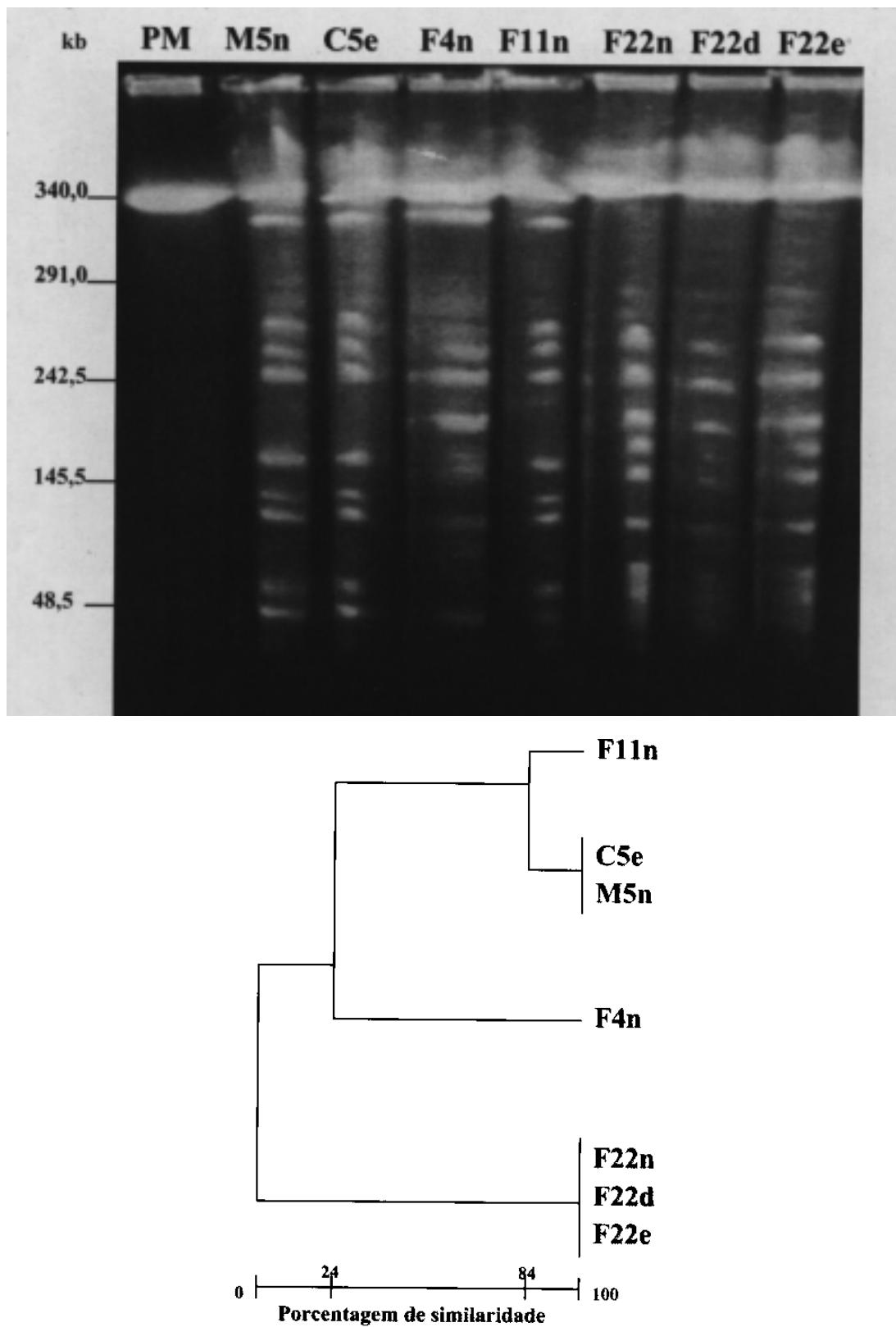


Figura 3. Perfil de macrorrestricção do crDNA dos *S. aureus* isolados dos portadores do Minimaternal 2, obtidos pela digestão com *Sma*I, após separação por PFGE e dendograma representando a similaridade genética entre as amostras. PM - padrão de tamanho dos fragmentos - concatâmeros do fago lambda.

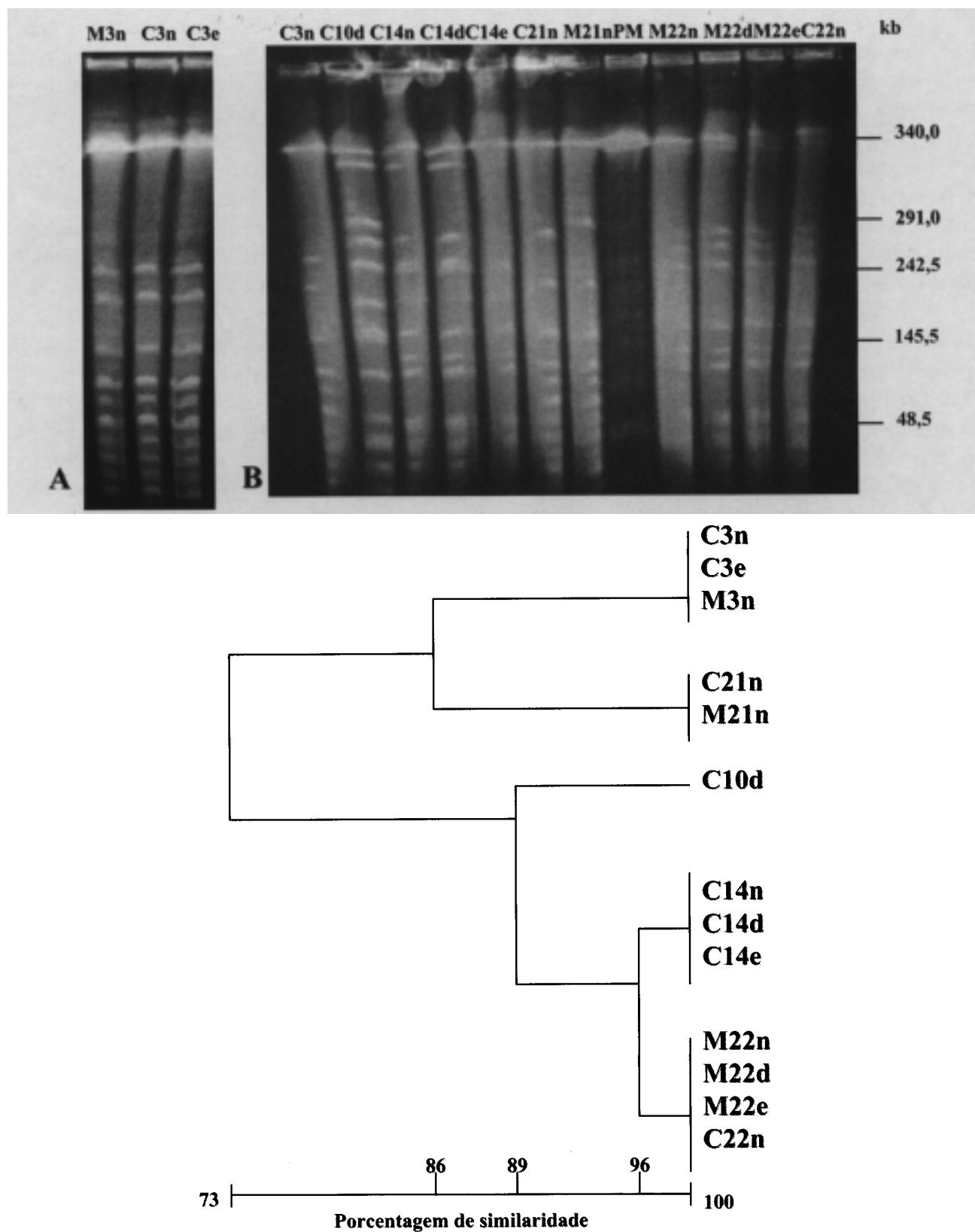


Figura 4. Perfil de macrorrestricção do crDNA dos *S. aureus* isolados dos portadores dos Maternais 1 e 2, obtidos pela digestão com *Sma*I após separação por PFGE e dendograma representando a similaridade genética entre as amostras. PM - padrão de tamanho dos fragmentos - concatâmeros do fago lambda.

A microbiota bacteriana normalmente encontrada nas mãos é composta por bactérias patogênicas e não patogênicas, adquiridas nas atividades normais de trabalho, sendo que, entre aquelas que constituem a microbiota residente, considerada a verdadeira microbiota da pele, relativamente estáveis em número e tipo, encontra-se *S. aureus*^(12,13). Este é um fator de considerável importância, quando se considera também a possibilidade da contaminação manual no transporte do agente para outras portas de entrada.

Nesse sentido, temos realizado alguns estudos no intuito de demonstrar o importante papel epidemiológico das mãos na transmissão de infecções, procurando alertar, inclusive, para a possível relação entre as amostras isoladas de diferentes áreas anatômicas de um mesmo indivíduo e para a influência da qualidade do trabalho realizado pelo indivíduo no tipo e natureza dos microorganismos isolados das mãos^(17/21).

As argumentações anteriores, relacionadas à importância da cavidade nasal corno fonte reconhecida de colonização por *S. aureus* e à possibilidade de propagação de microrganismos pelas mãos durante o desenvolvimento das atividades habituais de trabalho, ressaltam a importância de se conhecer a identidade das amostras isoladas.

O antibiograma tem se constituído em processo útil em estudos epidemiológicos de amostras de *S. aureus*, mesmo sem finalidade terapêutica, tendo em vista a versatilidade da bactéria e o modo de adquirir resistência aos antimicrobianos^(22,23). A partir do grau de resistência aos mesmos, as amostras têm sido consideradas como de “identidade perigosa”, com considerável comunicabilidade, virulência e capacidade de sobreviver no ambiente e, consequentemente, com maior dificuldade de serem eliminadas perante medidas de assepsia e “não perigosa”, pelo fato de serem facilmente eliminadas, apesar de poderem causar infecções.

Os dados dos antibiogramas apresentados permitem visualizar uma possível tendência a modelos exibindo resistência a, no máximo, dois antimicrobianos, caracterizado as amostras como do tipo extra-hospitalar. Essa baixa de resistência aos antimicrobianos entre os portadores sãos de *S. aureus* tem sido considerada natural em indivíduos que, mesmo permanecendo por tempo variável em ambiente hospitalar, não estão sendo submetidos à antibioticoterapia⁵.

Tendo em vista o interesse inicial de conhecer as possíveis associações e relações epidemiológicas entre as amostras isoladas, elas foram agrupadas, considerando-se a alocação dos participantes segundo a

área física do prédio e o relacionamento físico mantido entre eles, com vistas a estabelecer as vias de propagação do *S. aureus* isolado.

Assim, do total das 55 amostras, essa relação foi estabelecida entre 44 delas (Tabela II), das quais encontram-se referidos os participantes, datas das coletas, espécimes clínicos, os locais de atendimento da criança, de trabalho do funcionário e da mãe ou responsável, bem como, o modelo de resistência aos antimicrobianos e os resultados do PFGE.

Pelas figuras apresentadas é possível visualizar que os resultados da PFGE das amostras de *S. aureus*, isoladas dos funcionários e crianças da creche, mostraram baixa similaridade genética entre si, após macrorrestruturação com a enzima *Sma* I. Mesmo a similaridade genética dos *S. aureus* isolados entre as crianças ou entre os funcionários, não apresentou grande porcentagem de similaridade.

De um modo geral, a maior similaridade genética foi detectada entre algumas crianças e suas mães ou responsáveis. Isso está representado na Figura 1 (criança e mãe n° 13), na Figura 3 (criança e mãe n° 5) e na Figura 4 (crianças e mães n 3, 21 e 22) que mostram 100% de similaridade genética entre a(s) amostra(s) isolada(s), ou seja, amostras idênticas entre si.

A partir da consideração de que o contato físico direto é uma fonte de propagação de microorganismos, uma vez que envolve uma proximidade física, esperávamos encontrar uma maior similaridade genética entre as amostras dos funcionários e das crianças sob seus cuidados, a exemplo da maior similaridade observada entre algumas crianças portadoras da bactéria e suas mães ou responsáveis. Tal expectativa tem respaldo no fato de as funcionárias responsáveis pelo atendimento das crianças, durante o período de permanência no centro, acompanharem a trajetória das mesmas pelos diferentes locais de atendimento, desde a admissão até o seu completo desligamento, ao atingirem a idade máxima, por desistência, por opção ou por condições não justificadas, expondo ambos, o prestador e o receptor do cuidado, a determinados riscos de aquisição de microorganismos. Essa reciprocidade de relacionamento poderia, assim, estar diretamente relacionada com a transmissibilidade dos microorganismos.

Neste estudo, a baixa aplicabilidade do antibiograma, como marcador epidemiológico, está de acordo com a literatura, ressaltando o valor de métodos moleculares em rastreamento epidemiológico de portadores, como também de bactérias envolvidas em infecção/colonização.

Também, neste estudo, a tipagem por PFGE, mostrou ser o método de tipagem epiderniológica mais indicado para agrupar ou separar linhagens relacionadas ou não, por flagrar polimorfismos dos fragmentos de restrição, causados por modificações das seqüências das bases do DNA. É um método de tipagem genotípica que permitiu, ainda, o cálculo da similaridade genética entre as amostras estudadas.

5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados, em função da expectativa em relação ao quadro de colonização por *S. aureus* entre os portadores relacionados, do C.C.I., possibilitaram a identificação da positividade das áreas anatômicas pesquisadas entre os participantes, confirmando a maior freqüência na cavidade nasal (58,2%). Uma relativa semelhança entre as mãos direita e esquerda (e 21,8% respectivamente) e a reconhecida argumentação da cavidade nasal enquanto fonte de colonização de *S. aureus*.

Os resultados do antibiograma, ainda que com baixa representatividade como marcador epidemiológico, possibilitaram a definição do grau de resistência das amostras frente aos antimicrobianos testados, sugerindo a caracterização de amostras “menos perigosas” com modelos de resistência a, no máximo, dois antimicrobianos, e CO forte chance de serem eliminadas com medidas de assepsia.

Os resultados da tipagem por PFGE permitiu o cálculo da similaridade genética entre as amostras. A similaridade genética entre as amostras, de pessoas diferentes mas com certo grau de relacionamento físico direto, mostrou-se baixa. Apesar disso, o estudo genotípico teve um papel importante no delineamento e comparação das amostras de *S. aureus* dos portadores, já que só o antibiograma não forneceu parâmetros suficientes para uma precisa relação epidemiológica entre as amostras do estudo, possibilitando a identificação de poucas amostras idênticas entre si.

Os perfis de restrição dos crDNAs demonstraram baixa similaridade genética entre os portadores, principalmente entre os funcionários do CCI e as crianças atendidas por eles. A maior similaridade genética foi observada entre algumas crianças e suas mães.

A despeito das evidências apresentadas, vale considerar, finalmente, a possibilidade de o CCI possuir uma sistemática de prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às infecções, através da adoção de medidas de biossegurança, tais como técnicas administrativas, educacionais e médicas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq — Proc. N 523520/96-4 NV) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP — Proc. N°96/09749-7)

OLIVEIRA SANTOS BM & DARINI ALC. Colonization by *Staphylococcus aureus* in healthy carriers from a nursery in a University Hospital. *Medicina, Ribeirão Preto*, 35: 160-172, apr./june, 2002.

ABSTRACT: The aim of this study was to verify the colonization by *Staphylococcus aureus* among healthy carriers at a nursery of an University Hospital in Ribeirao Preto — University of Sao Paulo. Bacteriological and molecular characteristics were used to determine epidemiological relationship among isolates. *S. aureus* isolates were collected (obtained) from nasal swab, right and left hands of 37 mothers (or liable for the children) from hospital staff, that were working from 6 months or more and that were using the nursery for their children during the work time. Thirty-nine children and 39 nurses from the nursery were included. A total of 55 *S. aureus* were isolated, 58,2% from nasal swabs, 20,0% from right hands and 21,8% from left hands, which shows predominance of *S. aureus* in nasal swabs. Antibiograms showed resistance to 2 or more antibiotics tested. PFGE profiles using *Smal* and generated dendograms showed low genetic similarity among carriers, mainly among nursery staff and the children. The high genetic similarity was observed among some children and their own mother or liable. Antibiogram was not useful to determine epidemiological relationship among *S. aureus* isolates, but the genetic study was very important to delineate and compare *S. aureus* isolates from carriers.

UNITERMS: *Staphylococcus aureus*. Child Day Care Centers. Colonization. Bacterial Typing.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANDERSON GW; ARNSTEIN MG & LESTER MR Control de enfermedades transmisibles 4 ed. Interamericana, México, cap. 28, p.330-339, 1965: Infecciones por estafilococo.
- 2 - FERREIRA MS; GONÇALVES EG & ASSIS VP. Infecções estafilococicas Rev Bras Med 42:179-189, 1985.
- 3 - NOBLE WC. Exogenous infection. In: NOBLE WC. Microbiology skin disease: its epidemiology. Edward Arnould, London, cap.4, p.49-87, 1983.
- 4 - NOBLE WC & SOMERVILLE DA. Microbiology of human skin. W.B. Saunders, London, cap.7, p.144-159, 1974: Micrococcaceae as pathogens.
- 5 - SOLÉ-VERNIN C & UTHIDA TANAKA AM. *Staphylococcus aureus* e as estafilococcas. In: VERONESI R. Doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.264-275, 1983.
- 6- HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Regulamento Centro de Convivência Infantil. Ribeirão Preto, 1989.
- 7- ITO IY; COSTA A & BARACCHINI O. Emprego da gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. An Microbiol 16: 189-192, 1969.
- 8 - COSTA AL & LEVY CE. Caracterização do *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis*: Estudo comparativo entre os testes convencionais e o teste da Termonuclease. Rev Microbiol 20:157-164, 1989.
- 9- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 3 ed. Approved standard M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS, Villanova, Pa. 1993.
- 10- HAERTL R & BANDLOW G. Epidemiological fingerprinting of Enterobacter c/oacae by small - fragment restriction endonuclease analysis and pulsed - field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. J Clin Microbiol 31: 128- 133, 1993.
- 11 - DARINI ALC. Métodos epidemiológicos de tipagens de bactérias. Rev Bras Patol Clín 30: 14-19, 1994.
- 12 - GROSS A; CUTRIGHT & D'ALESSANDRO SM. Effect of surgical scrub on microbial population under fingernails. Am J Surg 138: 463-467, 1979.
- 13 - HANN JB. The source of resident flora. Hand 5:247-252, 1973.
- 14 - GOULD O. Nurses' hand as vectors of hospital-adquired infection. a review. J Adv Nurs 16:1216-1225, 1991.
- 15 - MONTES LF & WILBORN WH. Anatomical location of normal skin flora. Arch Dermatol 101: 145-159, 1970.
- 16 - OJAJARVI J. Effectiveness of hand washing and disinfection methods in removing transient bacteria after patient nursing. J Hygiene 85: 193-203, 1980.
- 17- OLIVEIRA SANTOS BM. Prevalência de portadores sãos de *S.aureus* em pessoal de diferentes categorias de enfermagem de um hospital escola. Tese de Doutorado, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto. p.1-201, 1987.
- 18 - LEVY CE; COSTA JC; LAMA J; FURLAN MLS; TOLOY RC; PASTI MJ & TAKEDA E. Papel epidemiológico das mãos nas infecções hospitalares. Rev Soc Bras Med Trop 21: 89, 1988.
- 19- OLIVEIRA SANTOS BM & UTHIDATANAKAAM. Staphylococcus aureus em portadores sãos de diferentes categorias de enfermagem do HCFMRP-USP fagótipos e resistência a antibióticos. Rev Microbiol 21: 304-308, 1990.
- 20 - OLIVEIRA SANTOS BM; AGUILLAR OM & TAKAKURA MS. Colonização simultânea de Staphylococcus aureus na cavidade nasal e mãos de portadores sãos de um hospital escola. Rev Microbiol 21:309-314, 1990.
- 21 - OLIVEIRA SANTOS BM; SCOCHE CGS & GARCIA E SOUZA MT. Marcadores epidemiológicos de amostras de Staphylococcus aureus em pessoal de enfermagem de unidades pediátricas de um hospital geral escola — Parte II Rev Paul Hosp 38:53-57, 1990.
- 22 - TAVARES W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. Atheneu, São Paulo, 1994. cap. 3, p 23-28: Teste de sensibilidade in vitro.
- 23 - ZANON U & MORAIS N. Vigilância epidemiológica das infecções hospitalares. In: ZANON U & NEVES J Infecções hospitalares: prevenção, diagnóstico e tratamento. MEDSI — Editora Médica e Científica, Rio de Janeiro, p.297-325, 1987.
- 24- SOLÉ-VERNIN C & UTHIDATANAKAAM. A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Hospital 75: 2043-2086, 1969.
- 25- MAGALHÃES VD; DARINI ALC; PITTL; LEVY CE & COSCINA AL. Comparação de antibiograma, fagotipagem e ribotipagem na discriminação de cepas hospitalares de Enterobacter c/oacae. News Lab 6: 26-28, 1994.
- 26 - DARINI ALC; MAGALHÃES VD; BARTH AL; LEVY CE & COSCINA AL. Phenotyping and genotyping methods applied to investigate relatedness of Brazilian isolates of Enterobacter c/oacae. Braz J Med Biol Res 32: 1077- 1081, 1999.

Recebido para publicação em 11/02/2002

Aprovado para publicação em 14/06/2002