

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

DARÍO BORDAS GARCÍA

Avaliação da higiene das mãos na remoção da microbiota transitória dos punhos

Maringá
2014

DARÍO BORDAS GARCÍA

Avaliação da higiene das mãos na remoção da microbiota transitória dos punhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso.

Maringá
2014

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

G216a García, Darío Bordas
 Avaliação da higiene das mãos na remoção da
 microbiota transitória dos punhos / Darío Bordas
 García. -- Maringá, 2014.
 61 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

 Orientador : Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
 Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2014.

 1. Higienização - Antissépticos. 2. Higienização
 das mãos - Punhos - Profissionais da saúde. 3.
 Higienização - Sabão. I. Universidade Estadual de
 Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de
 Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed.613

Zss-1499

FOLHA DE APROVAÇÃO

DARÍO BORDAS GARCÍA

Avaliação da higiene das mãos na remoção da microbiota transitória dos punhos

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

COMISSÃO JULGADORA

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

Prof^a. Dr^a. Lourdes Botelho Garcia
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr. Benício Alves de Abreu Filho
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 31 de março de 2014.

Local de defesa: Bloco 126 – Sala 1, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

Ao meu orientador, Professor Dr. Celso Luiz Cardoso, por acreditar em mim, pela paixão pelo trabalho e a humildade que demonstra a diário. Foi um imenso prazer ser seu orientando e ter tido o privilégio de aprender com você. Muito obrigado.

Manifesto um sentido e profundo reconhecimento à minha família pelo apoio incondicional ao longo destes anos.

A Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

As Professoras Doutoras Lourdes Botelho Garcia e Maria Cristina Bronharo Tognim, muito obrigado pela ajuda, orientações e contribuições. Por me receber em seu laboratório de portas abertas e sempre estar à disposição.

A Sandra Regina Bin Silva, amiga e companheira, cujo apoio foi indispensável para a realização deste trabalho. Foi um prazer dividir a bancada com você.

A meus amigos do mestrado, por todos os momentos compartilhados que fizeram meu trabalho mais leve. Obrigado!

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Aos alunos e bolsistas que participaram desta pesquisa e foram fundamentais durante todo o processo.

Aos funcionários e colegas do Setor de Microbiologia (Bloco I-90), pelo apoio e amizade, sem vocês não teria sido possível a realização deste trabalho. Minha mais sincera gratidão.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.
(Albert Einstein)

RESUMO

Introdução. No Brasil, a higienização das mãos dos profissionais da saúde é considerada adequada quando as mãos são friccionadas em todas as suas faces, espaços interdigitais, articulações, unhas, extremidades dos dedos e punhos, realizando-se a técnica em sete passos. Um aspecto controvertido é se a fricção dos punhos (i.e., o passo sete) é efetiva e necessária, pois em vários países a técnica preconizada para a higiene das mãos é baseada na clássica técnica dos seis passos de Ayliffe, que não inclui a higienização dos punhos.

Objetivo. Investigar a eficácia da técnica de higiene das mãos, realizada em sete passos, na remoção da microbiota transitória dos punhos.

Métodos. O estudo foi realizado utilizando-se três quadrados Latinos 6x6 empregando-se os seguintes microrganismos testes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os tratamentos com os produtos (álcool etílico 70%, álcool gel, povidona-iodo, clorexidina e sabão comum) e os respectivos controles (pré-tratamento) foram efetuados em três blocos 6x5 (i.e., 6 voluntários *versus* 5 produtos, utilizando-se um bloco para cada microrganismo teste). Os punhos foram contaminados com 0,02 mL do microrganismo teste e após a secagem as mãos foram higienizadas com 3 mL de cada produto. O microrganismo teste foi recuperado dos punhos friccionando-se a pele com auxílio de bastão de vidro e solução salina contendo neutralizantes. A taxa de remoção foi determinada pelo fator de redução logarítmica (i.e., a média do \log_{10} das contagens pré-tratamento menos a média do \log_{10} das contagens pós-tratamento). A possibilidade de contaminação dos dedos pela microbiota dos punhos, durante a higiene das mãos (passo sete), foi investigada pela técnica de deslizamento dos dedos na superfície de ágar nutriente. Os resultados foram estimados por análise de variância, tendo como variável resposta o \log_{10} do fator de redução logarítmica. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. A comparação da eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL e 5 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *Staphylococcus aureus* dos punhos artificialmente contaminados foi também incluída no estudo, realizando-se 20 testes. As médias das taxas de remoção foram comparadas usando o teste *t* de Student. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados. Nos punhos dos voluntários controles foram recuperadas, em média, 6,45 (*E. coli*), 6,44 (*S. aureus*) e 5,89 (*C. albicans*) \log_{10} unidades formadoras de colônias. Povidona-iodo e as preparações alcoólicas apresentaram maior eficácia do que o sabão comum e clorexidina na remoção dos microrganismos testes dos punhos ($P < 0,05$). No bloco com *S. aureus* observou-se a contaminação dos dedos de 3 voluntários tratados com as preparações alcoólicas e com os antissépticos degermantes. No estudo comparativo da eficácia da antissepsia das mãos com álcool etílico 70% (p/p) a taxa média de remoção de *S. aureus* dos punhos, expressa pelo fator de redução logarítmica, foi de $4,85 \pm 0,94$ e de $5,51 \pm 0,84$, respectivamente, para os voluntários tratados com 3 mL e 5 mL, sendo estas diferenças significativas ($P=0,02344$). A contaminação dos dedos ocorreu em 65% (13/20) dos voluntários tratados com 3 mL do álcool etílico 70% e em nenhum daqueles tratados com 5 mL.

Conclusões. Os resultados sugerem que a eficácia da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na técnica de higiene das mãos depende do produto utilizado e da microbiota transitória presente nos punhos. Os dados também sugerem uma limitada eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *S. aureus* dos punhos artificialmente contaminados. Um maior volume de álcool (e.g., 5 mL) deve ser considerado na antissepsia das mãos com preparações alcoólicas utilizando a técnica dos sete passos.

Palavras-chave: antissépticos, higiene das mãos, punhos, sabão.

ABSTRACT

Introduction. In Brazil, the hand hygiene of health professionals is considered adequate when the hands are rubbed in all their faces, spaces between the fingers, joints, nails, tips of the fingers and wrists, performing the technique in seven steps. One controversial aspect is whether the friction of the wrists (i.e., step seven) is effective and necessary, since in many countries the recommended technique for hand hygiene is based on the Ayliffe's six-steps classic technique, which does not include the hygiene of wrists.

Objective. To investigate the efficacy of hand hygiene technique performed in seven steps, for the removal of transient microbiota from wrists.

Methods. The study was conducted using three 6x6 Latin squares utilizing the following test microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The treatments with the products (ethyl alcohol 70%, alcohol gel, povidone-iodine, chlorhexidine and plain liquid soap) and their respective controls (pre-treatment) were made into three 6x5 blocks (i.e., 6 volunteers *versus* 5 products, using a block for each test microorganism). The wrists were contaminated with 0.02 mL of the test microorganism and after drying, hand hygiene was performed using 3 mL of each product. The test microorganism was recovered from the wrists by rubbing the skin with the aid of a glass rod and saline solution containing neutralizers. The removal rate was determined by the logarithmic reduction factor (i.e., the mean \log_{10} of the pre-treatment values minus the mean \log_{10} of the post-treatment values). The possibility of contamination of the fingers with the microbiota of the wrists during hand hygiene (step seven) was investigated by the streak technique of the fingers on the surface of nutrient agar. The results were estimated by analysis of variance. A value of $P < 0.05$ was considered significant. A comparison of the efficacy of hand antisepsis with 3 mL and 5 mL of ethyl alcohol 70% (w/w) for removing *Staphylococcus aureus* from artificially contaminated wrists was also included in the study, performing 20 tests. The average removal rates were compared using the Student's *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results. On average, 6.45 (*E. coli*), 6.44 (*S. aureus*) and 5.89 (*C. albicans*) \log_{10} colony forming units were recovered from control volunteers' wrists. Povidone-iodine and alcoholic preparations showed greater efficacy than plain soap and chlorhexidine for removing the test microorganisms from wrists. Contamination of the fingers of 3 volunteers treated with alcoholic preparations and antiseptic agents was observed during the assays of *S. aureus* block. The average removal rate of *S. aureus* from wrists for volunteers treated with 3 mL and 5 mL, expressed by the logarithmic reduction factor, was 4.85 ± 0.94 and 5.51 ± 0.84 , respectively, and these differences were significant ($P = 0.02344$). The contamination of the fingers occurred in 65% (13/20) of the subjects treated with 3 mL of 70% ethyl alcohol and in none of those treated with 5 mL.

Conclusions. The results suggest that the efficacy of rubbing the wrists (i.e., step seven) in the hand hygiene technique depends on the product used and the type of transient microbiota present in wrists. The data also suggest a limited efficacy of hand antisepsis with 3 mL of 70% ethyl alcohol (w/w) for removing *S. aureus* from artificially contaminated wrists. A higher volume of alcohol (e.g., 5 mL) should be considered in hand antisepsis with alcoholic preparations using the seven-steps technique.

Keywords: antiseptics, hand hygiene, wrists, soap.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulos I e III) e da publicação científica (Capítulo II) *Infection Control and Hospital Epidemiology*, disponível em: <<http://www.press.uchicago.edu/ucp/journals/journal/iche.html>>

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	10
1.1. Introdução.....	11
1.2. Justificativa	16
1.3. Objetivos	16
1.4. Referências	17
2. CAPÍTULO II	20
2.1. Manuscrito: Avaliação da higiene das mãos na remoção da flora bacteriana transitória dos punhos	20
2.1.1. Página Título	21
2.1.2. Resumo/ <i>Abstract</i>	22
2.1.3. Introdução.....	26
2.1.4. Materiais e Métodos	27
2.1.5. Resultados	37
2.1.6. Discussão.....	40
2.1.7. Referências	44
2.1.8. Tabelas e Figuras.....	48
2.1.9. Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido	58
3. CAPÍTULO III	59
3.1. Conclusões	60
3.2. Perspectivas futuras.....	61

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

Infecção hospitalar é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Quando se desconhecer o período de incubação do microrganismo e não houver evidência clínica ou dado laboratorial de infecção no momento da internação considera-se infecção hospitalar, de acordo com a Portaria 2616/98 do Ministério da Saúde, toda manifestação clínica de infecção que se apresentar a partir de 72 horas após a admissão do paciente (Brasil, 1998).

As infecções hospitalares ou infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) constituem atualmente um importante problema de saúde pública devido a sua elevada morbidade e letalidade, pelo prolongamento do período de internação e aumento dos custos hospitalares (WHO, 2011; ECDC, 2013). Mais de 1,7 milhões de infecções hospitalares ocorrem anualmente nos Estados Unidos (KLEVENS et al., 2007), acometendo aproximadamente 4,5% dos pacientes internados (WHO, 2011), resultando em um custo anual estimado de 28,4 a 45 bilhões de dólares (SCOTT, 2009). Na Europa, a prevalência das infecções hospitalares é de 5,7 %, afetando aproximadamente 3,2 milhões de pacientes e gerando custos diretos de 7 bilhões de euros (WHO, 2011; ECDC, 2013). No Brasil, estima-se uma taxa de infecção 15% e a ocorrência de 0,5 a 1 milhão de casos de infecção hospitalar por ano (PANNUTI, GRINBAUM, 1995; PRADE et al., 1995; WEY, 1995).

Nos hospitais, os principais reservatórios ou fontes de infecção das IRAS são representados por pacientes colonizados ou infectados, profissionais da saúde e pelo ambiente hospitalar (ARCHIBALD, 2012). As medidas gerais de controle das IRAS incluem vigilância epidemiológica, controle do estado geral do paciente e controle dos métodos de proteção anti-infecciosa. Entre estas últimas medidas, que incluem desinfecção, antisepsia e técnicas de isolamento, a higienização das mãos ocupa lugar de destaque, sendo considerado o procedimento isolado mais importante na prevenção das IRAS porque a maioria destas infecções é causada por microrganismos transmitidos pelas mãos contaminadas do pessoal hospitalar (BOYCE, PITTET, 2002; WHO, 2009).

Entretanto, na prática hospitalar, a adesão dos profissionais de saúde às recomendações para a higienização das mãos é muito baixa, registrando-se uma taxa média de 40% (PITTET et al., 2000; LARSON et al., 2000; BOYCE, PITTET, 2002; HAAS, LARSON, 2007). É importante salientar que esta baixa adesão à higienização das mãos não é devido à falta de bons produtos disponíveis no mercado (i.e., aqueles com eficácia

antimicrobiana comprovada) mas sim pela negligência e falhas na execução da técnica de higiene (LARSON, 2004).

No Brasil, as recomendações do Ministério da Saúde para a higienização das mãos nos serviços de saúde preconizam a lavagem das mãos durante 40 a 60 segundos com água e sabão não medicamentoso (i.e., higienização simples das mãos) ou com antissépticos associados a detergentes, conhecidos como agentes degermantes, como por exemplo, clorexidina, povidona-iodo (i.e., higienização antisséptica das mãos); ou com preparações alcoólicas por 20 a 30 segundos (i.e., fricção antisséptica das mãos). A higienização das mãos é considerada adequada quando as mãos são friccionadas em todas as suas faces, espaços interdigitais, articulações, unhas, extremidades dos dedos e punhos (BRASIL, 2009).

O preparo pré-operatório das mãos ou antissepsia cirúrgica das mãos é feito com antissépticos degermantes, utilizando-se escovas descartáveis, de cerdas macias, impregnadas ou não com antissépticos e de uso exclusivo em leito ungueal e subungueal. As superfícies das mãos e antebraços devem ser friccionadas por 3 a 5 minutos para a primeira cirurgia e de 2 a 3 minutos para as cirurgias subsequentes (BRASIL, 2007; 2009).

As recomendações para a higiene das mãos preconizadas nos Estados Unidos pelos “Centers for Disease Control and Prevention”, ratificadas recentemente pela Organização Mundial de Saúde, propõem o uso de preparações alcoólicas como procedimento padrão para a antissepsia das mãos na prática hospitalar em substituição a tradicional lavagem das mãos com água e sabão líquido não medicamentoso (BOYCE, PITTET, 2002; WHO, 2009).

Segundo estas recomendações, os produtos a base de álcool são os agentes preferidos para a antissepsia das mãos porque eles reduzem a contagem bacteriana das mãos de forma mais eficaz do que o sabão comum e os antissépticos degermantes. Apresentam maior facilidade de uso, requerem menos tempo de ação e causam menos irritação e ressecamento da pele do que a lavagem com água e sabão. Entretanto, quando as mãos estiverem visivelmente sujas ou contaminadas com proteínas ou fluidos orgânicos, elas obrigatoriamente devem ser lavadas com água e sabão ou com preparação antisséptica degermante, porque o álcool não tem efeito na remoção de sujeira ou matéria orgânica (VOSS, WIDMER, 1997; BOYCE, PITTET, 2002; PITTET, BOYCE, 2003).

Vários estudos têm demonstrado que o uso de preparações alcoólicas tem contribuído de forma significativa para aumentar a adesão à higienização das mãos dos profissionais da saúde e diminuir as taxas de infecções na prática hospitalar (PITTET et al., 2000; BOYCE, PITTET, 2002; WHO, 2009; SAKAMOTO et al., 2010; MATSUMOTO et al., 2012). Entretanto, muitos aspectos deste procedimento como, por exemplo, a técnica, o tempo de

contato e o volume do produto alcoólico aplicado nas mãos, são ainda objetos de estudos e de discussão em muitos países (GIRARD, 2010).

Um dos primeiros estudos registrados na literatura para avaliar a qualidade da técnica da antissepsia das mãos com preparações alcoólicas foi realizado na década de setenta. Neste estudo, 129 indivíduos, incluindo estudantes e profissionais de enfermagem, fizeram a antissepsia das mãos com 5 mL de álcool 70% adicionado de um corante e com os olhos fechados friccionaram as mãos como se estivessem fazendo a tradicional lavagem das mãos com água e sabão. As áreas das mãos não coradas após a antissepsia revelaram falhas na técnica. O estudo mostrou que a técnica de higienização foi em geral inadequada, ocorrendo falhas em 89% dos casos em algumas partes da superfície das mãos, como por exemplo, em 56% dos polegares, em 28% das costas dos dedos, em 24% das costas das mãos, em 16% dos espaços interdigitais e em 16% de alguma área das palmas. O estudo também mostrou que a antissepsia adequada das mãos é realizada pela fricção das mãos durante 30 segundos (TAYLOR, 1978).

O estudo de Taylor (1978) chamou a atenção de Ayliffe et al. (1978), que baseado em seus resultados, desenvolveu uma técnica padronizada de higienização das mãos para ser usada em um teste proposto no Reino Unido para avaliar a eficácia de sabões e antissépticos na higienização das mãos. Os produtos (5 mL) deveriam ser aplicados nas mãos durante 30 segundos, seguindo uma técnica padronizada realizada em uma sequência de seis passos (etapas), incluindo: (1) fricção das palmas das mãos entre si; (2) fricção da palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda (e vice-versa), entrelaçando os dedos; (3) fricção das palmas das mãos entre si com os dedos entrelaçados; (4) fricção do dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta (e vice-versa), segurando os dedos; (5) fricção do polegar direito, com o auxílio da palma da mão esquerda (e vice-versa), utilizando movimento circular; (6) fricção das polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita (e vice-versa), fazendo um movimento circular. A fricção das mãos em cada passo era realizada com cinco movimentos para frente e para trás (AYLIFFE et al., 1978).

A técnica dos seis passos proposta por Ayliffe et al. (1978), devido sua eficácia e ao prestígio dos autores, foi praticamente aceita no mundo todo para a higiene das mãos dos profissionais da saúde. Atualmente ela é recomendada pelo “European Committee for Standardization” nos testes de avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos para a higiene das mãos na Europa e pela Organização Mundial de Saúde (ROTTER et al., 2009; WHO, 2009). No Brasil ela foi recomendada em 1989, no primeiro manual de higiene das mãos publicado pelo Ministério da Saúde com objetivo de proporcionar aos profissionais de saúde

subsídios técnicos relativos às normas e procedimentos para lavar as mãos, visando à prevenção das infecções hospitalares (BRASIL, 1989)

Entretanto, em 1998, a Portaria 2616/98-MS, no anexo referente à lavagem das mãos, incluiu a fricção dos punhos como o último passo desta técnica (i.e., o passo sete), que é realizado pela fricção do punho esquerdo com auxílio dos dedos e palma da mão direita (e vice-versa), com movimentos circulares (BRASIL, 1998). Esta técnica dos sete passos é recomendada no “Manual de Segurança do Paciente – Higienização das Mãos”, publicado em 2009 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

Recentemente, a Portaria 1377/13-MS, que aprova os “Protocolos Básicos de Segurança do Paciente”, em seu Anexo I: “Protocolo para a Prática de Higiene das Mãos em Serviços de Saúde”, determina que a técnica dos seis passos proposta por Ayliffe et al. (1978) (i.e., excluindo a fricção dos punhos) seja o procedimento utilizado na higienização simples ou antisséptica das mãos e na fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas; seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde e a Resolução aprovada durante a 57^a Assembleia Mundial da Saúde (WHO, 2009; BRASIL 2013).

Em relação à técnica de antisepsia das mãos com preparações alcoólicas, parece existir um consenso inicial de que o produto deve ser aplicado na palma da mão e espalhado por fricção através de ambas as mãos. Entretanto nas próximas etapas, os protocolos diferem (GIRARD, 2010). Alguns recomendam que a técnica seja realizada em seis passos (BRASIL, 1989; NSW, 2007; RAFFIN, VILLA, 2011; ITÁLIA, 2012; BRASIL, 2013), outros em sete passos, incluindo a fricção dos punhos (BRASIL, 1998, 2009; SFHH, 2009; SARI, 2009; NSW, 2010; NHS, 2010; SINGAPURA, 2013), ou ainda, sem uma sequência definida de passos, mas cobrindo todas as superfícies das mãos, como descrita na técnica de aplicação responsável recomendada na Alemanha (KAMPF et al., 2013; ALEMANHA, 2011).

Para dificultar ainda mais o entendimento deste assunto, alguns países, como por exemplo, Austrália, Brasil e Inglaterra, adotam a técnica dos seis passos preconizada pela Organização Mundial da Saúde, mas também mantêm em vigência protocolos nacionais ou regionais recomendando a técnica dos 7 passos, que inclui a fricção dos punhos. Estas informações demonstram claramente a falta de consenso em relação a este tópico. Nós não encontramos estudo na literatura justificando a inclusão da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na clássica técnica dos seis passos proposta por Ayliffe para a higiene das mãos.

Outros aspectos relevantes a serem considerados no uso das preparações alcoólicas são o volume e o tempo de contato. Apesar da importância destes parâmetros, eles nem sempre estão claramente definidos nos protocolos oficiais. Por exemplo, as recomendações dos

“Centers for Disease Control and Prevention” é de que a preparação alcoólica seja aplicada na palma de uma das mãos, seguido da fricção das mãos juntas, cobrindo todas as superfícies das mãos e dos dedos, até a completa secagem das mãos. O volume do produto a ser utilizado deve seguir as instruções do fabricante (BOYCE, PITTET, 2002). Na técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde, o produto deve ser aplicado cobrindo a palma da mão e friccionado em todas as superfícies das mãos, durante 20 a 30 segundos, utilizando-se a técnica dos seis passos de Ayliffe (WHO, 2009).

Apesar destas recomendações não indicarem o volume exato do produto a ser utilizado na antisepsia das mãos com preparações alcoólicas, a maioria dos fabricantes recomendam usar na prática pelo menos três mililitros. Esta indicação é baseada no fato de que nos testes de laboratório realizados para avaliar a eficácia antimicrobiana das preparações alcoólicas geralmente são usados volumes de 3ml ou 5mL (AYLIFFE et al., 1978; EN 1500, 1997; ASTM E-1174, 1999; KAMPF et al., 2008).

Entretanto os profissionais de saúde raramente utilizam 3 mL das preparações alcoólicas para a antisepsia das mãos, porque os dispensadores geralmente liberam volumes inferiores a 3 mL mesmo após dois a três acionamentos do dispositivo. Por exemplo, um estudo mostrou que 3 de 8 dispensadores liberaram volumes inferiores a 1 mL (0,6 mL a 0,9mL) e nos restantes, os volumes variaram de 1,0 mL a 1,3mL por aplicação (MACINGA et al., 2013). Assim, na prática hospitalar, a antisepsia das mãos utilizando pequenos volumes da preparação alcoólica pode não apresentar a mesma eficácia antimicrobiana demonstrada nos testes de laboratório.

A principal preocupação do uso de pequenos volumes das preparações alcoólicas na antisepsia das mãos (e.g., 0,5 mL), é que o produto não seja suficiente para cobrir todas as superfícies das mãos, comprometendo assim a eficácia do procedimento. Na prática, isto é evidenciado quando o profissional de saúde sente as mãos secas após friccioná-las por 10 a 15 segundos com a preparação alcoólica (BOYCE, PITTET, 2002).

JUSTIFICATIVA

Um aspecto controvertido na higienização das mãos utilizando a técnica dos sete passos, sobretudo com preparações alcoólicas, é se a fricção dos punhos é um passo necessário e efetivo, pois devido à evaporação do álcool durante a fricção das mãos nos passos 1 a 6, pode não existir mais o produto na etapa final da técnica (i.e., no passo 7). Assim, em vez de higienizar os punhos o profissional da saúde pode sofrer uma contaminação das pontas dos dedos pela microbiota dos punhos, comprometendo, desta forma, a eficácia do procedimento. Apesar da importância deste assunto, nós não encontramos quaisquer estudos justificando a inclusão da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na clássica técnica dos seis passos descrita por Ayliffe et al. (1978) para a higienização das mãos na prática hospitalar.

Se a fricção dos punhos é um passo realmente importante na higienização das mãos, por que ele não está incluído nas recomendações dos “Centers for Disease Control” (Boyce & Pittet, 2002) e da “World Health Organization” (WHO, 2009), consideradas o estado da arte na higienização das mãos?

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo realizado no Brasil com finalidade de proporcionar aos profissionais de saúde subsídios técnicos e científicos para validar ou não a fricção dos punhos na técnica de higiene das mãos preconizadas no guia técnico e no manual de higienização das mãos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007, 2009).

OBJETIVOS

Geral

Investigar a eficácia da técnica de higiene das mãos, realizada em sete passos, na remoção da flora microbiana transitória dos punhos.

Específicos

Avaliar a eficácia do sétimo passo (i.e., a fricção dos punhos) na técnica de higienização das mãos preparações alcoólicas (na forma líquida e de gel), com sabão líquido não medicamentoso e antissépticos degermantes, na remoção da microbiota transitória dos punhos.

REFERÊNCIAS

ALEMANHA. Wissenschaftlicher Beirat der Aktion Saubere Hände: Positionspapier “Einreibemethode”, 2011. Disponível em: “http://www.aktion-sauberehaende.de/downloads/pdf/ASH_Positionspapier_Einreibemethode_30092011.pdf”, acessado em 16/02/2013.

ARCHIBALD, L. K. Principles of infectious diseases epidemiology. In: Mayhall, C. G. (Ed.) **Hospital epidemiology and infection control**. Baltimore: Williams & Wilkins, 4th ed., 2012.

ASTM INTERNATIONAL. **E 1174**: Standard test method for evaluation of the effectiveness of health care personnel or consumer handwash formulations. West Conshohocken, PA: ASTM International, 1999.

AYLIFFE, G. A. J.; BABB, J. R.; QUORAISHI, A. H. A test for hygienic hand disinfection. **J Clin Pathol**, London: BMJ Pub. Group, v. 31, n. 10, p. 923-28, 1978.

BOYCE, J. M.; PITTET, D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA. Hand Hygiene Task Force. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago: University of Chicago Press, v. 23, p. 3-40, 2002. Supplement 12.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas e Manuais Técnicos: Lavar as Mãos. Informações para Profissionais de Saúde. Série A. Brasília: Centro de Documentação, 1989. 39 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 2.616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**. 1998; p. 13-15.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia técnico - Higienização das mãos em serviços de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 54 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Segurança do paciente - Higienização das mãos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 109 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 1.377, de 9 de julho de 2013. **Diário Oficial da União**. 2013; secção 1, p. 47.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual Epidemiological Report 2013**. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2013.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. **European standard EN 1500**. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic handrub. Test method and requirements. Brussels: European Committee for Standardization, 1997

GIRARD, R. A Review of Hand Rub Products. **Eur Infect Dis**, London: Touch Briefings, v. 4, n. 2, p. 61-64, 2010.

HAAS, J. P.; LARSON, E. L. Measurement of compliance with hand hygiene. **J Hosp Infect**, London: W.B. Saunders, v. 66, n. 1, p. 6-14, 2007.

ITÁLIA. Direzione Generale della Programmazione Sanitaria. Manuale di formazione per il governo clinico: la sicurezza dei pazienti e degli operatori. Milano: Ministero della Salute, 2012. 118 p.

KAMPF, G. How effective are hand antiseptics for the postcontamination treatment of hands when used as recommended?. **Am J Infect Control**, St. Louis: Mosby, v. 36, n. 5, p. 356-360, 2008.

KAMPF, G. et al. Less and less-influence of volume on hand coverage and bactericidal efficacy in hand disinfection. **BMC infect dis**, London: BioMed Central, v. 13, n. 1, p. 472-479, 2013.

KLEVENS, R. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in US hospitals, 2002. **Public health rep**, Atlanta: CDC, v. 122, n. 2, p. 160, 2007.

LARSON, E. L. et al. An organizational climate intervention associated with increased handwashing and decreased nosocomial infections. **Behav Med**, New York: Routledge, v. 26, n. 1, p. 14-22, 2000.

LARSON, E. L. Special problems in antisepsis. In: RUTALA, W. A. **Disinfection, sterilization and antisepsis: principles, practices, challenges and new research**. Washington: Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology, 2004. p. 104-106.

MACINGA, D. R. et al. Efficacy of novel alcohol-based hand rub products at typical in-use volumes. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago: University of Chicago Press, v. 34, n. 3, p. 299-301, 2013.

MATSUMOTO, K. et al. Reduction in the incidence of MRSA with use of alcohol-based hand rub solutions and gloves. **J Infect Chemother**, Tokyo: Springer-Verlag, v. 18, n. 2, p. 269-271, 2012.

NATIONAL HEALTH SERVICE - NHS. Standard Infection Control Precautions. London: Department of Health, 2010.

NEW SOUTH WALES HEALTH. **Infection Control Policy** (PD2007_036). Sydney: NSW Government, 2007.

NEW SOUTH WALES HEALTH. **Hand Hygiene Policy** (PD2010_058). Sydney: NSW Government, 2010.

PANNUTI, C. S.; GRINBAUM, R. S. An overview of nosocomial infection control in Brazil. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago: University of Chicago Press, v. 16, n. 3, p. 170-174, 1995.

PITTET, D. et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. **Lancet**, London: Lancet Publishing Group, v. 356, p. 1307-1312, 2000.

PITTET, D.; BOYCE, J. M. Revolutionising hand hygiene in health-care settings: guidelines revisited. **Lancet Infect Dis**, London: Lancet Publishing Group, v. 3, n. 5, p. 269-270, 2003.

PRADE, S. S. et al. Estudo brasileiro da magnitude das infecções hospitalares em hospital terciário. **Rev Cont Inf Hosp**, Brasília: Ministério da Saúde, v. 2, n. 2, p. 11-24, 1995.

RAFFIN, S. M.; VILLA, S. Higiene de manos. Guía de recomendaciones para los establecimientos de salud. **Epidemiolog Control Inf**, Buenos Aires: ADECI, v. 3, n. 3, p. 390-480, 2011.

ROTTER, M. et al. Methods to evaluate the microbicidal activities of hand-rub and hand-wash agents. **J Hosp Infect**, London: W.B. Saunders, v. 73, n. 3, p. 191-199, 2009.

SAKAMOTO, F. et al. Increased use of alcohol-based hand sanitizers and successful eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a neonatal intensive care unit: A multivariate time series analysis. **Am J Infect Control**, St. Louis: Mosby, v. 38, n. 7, p. 529-534, 2010.

SARI. Infection Control Subcommittee. Guidelines for Hand Hygiene in Irish Health Care Settings. Dublin: Health Protection Surveillance Centre, 2009. 41 p.

SCOTT, R. D. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. (Publication No. CS200891-A). Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2009.

SINGAPURA. Singapore Government. **Recommendations for Personal Hygiene**. Keep Your Hands Clean. Singapore: Health Promotion Board, 2013. Disponível em: “<http://www.hpb.gov.sg/HOPPortal/health-article/5652>”, acessado em 03/02/2013.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE D’HYGIÈNE HOSPITALIÈRE – SFHH. Recommandations pour l’hygiène des mains. **Hygiènes**, Lyon: SFHH, v. 17, n. 3, p. 139-240, 2009.

TAYLOR, L. J. An evaluation of handwashing techniques-1. **Nurs Times**, London : Macmillian Journals, v. 12, p. 54-55, 1978.

VOSS, A.; WIDMER, A. F. No time for handwashing! Handwashing versus alcoholic rub: can we afford 100% compliance? **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago: University of Chicago Press, v. 18, n. 3, p. 205-208, 1997.

WEY, S. Infection control in a country with annual inflation of 3,600%. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago: University of Chicago Press, v. 16, n. 3, p. 175-178, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines on hand hygiene in health care. First global patient safety challenge: clean care is safe care. Geneva: WHO, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: a systematic review of the literature. Geneva: WHO, 2011.

CAPÍTULO II – MANUSCRITO

“Avaliação da higiene das mãos na remoção da microbiota transitória dos punhos”

PÁGINA TÍTULO

Título: Avaliação da higiene das mãos na remoção da microbiota transitória dos punhos

Autores: Darío Bordas García, Sandra Regina Bin Silva, Benjamin Xavier Ramos, Camila Fernanda Leite Roseghini, Lourdes Botelho Garcia, Maria Cristina Bronharo Tognim, Celso Luiz Cardoso*

Afiliação: Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo 5790, Campus Universitário, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

***Autor correspondente:** Celso Luiz Cardoso, Laboratório de Microbiologia (Bloco I-90, Sala 116), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Campus Universitário. 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. Telefone: +55 44 3011-4953. Fax: +55 44 3011-4860. E-mail: clcardoso@uem.br.

RESUMO

Introdução. A fricção antisséptica das mãos com preparações alcoólicas é considerada atualmente a técnica mais eficiente para a higienização das mãos dos profissionais de saúde. É realizada na prática utilizando-se seis passos (técnica clássica, usada em vários países) ou sete passos quando inclui a fricção dos punhos (técnica usada no Brasil e em alguns países).

Objetivo. Investigar a eficácia da técnica de higiene das mãos, realizada em sete passos, na remoção da microbiota transitória dos punhos.

Métodos. O estudo foi realizado utilizando-se três quadrados Latinos 6x6 com os seguintes microrganismos testes: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os punhos foram contaminados com 0,02 mL do microrganismo teste e após a secagem as mãos foram higienizadas com 3 mL de cada produto (álcool etílico 70%, álcool gel, povidona-iodo, clorexidina e sabão comum). A taxa de remoção foi determinada pelo fator de redução logarítmica e os resultados estimados por análise de variância. A eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL e 5 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *Staphylococcus aureus* dos punhos artificialmente contaminados foi também incluída no estudo. As médias das taxas de remoção foram comparadas usando o teste *t* de Student.

Resultados. Povidona-iodo e as preparações alcoólicas apresentaram maior eficácia do que o sabão comum e clorexidina na remoção dos microrganismos testes dos punhos. Nos ensaios com *S. aureus* observou-se a contaminação dos dedos de 3 voluntários tratados com as preparações alcoólicas e os antissépticos degermantes. No estudo comparativo da eficácia da antissepsia das mãos com álcool etílico 70% (p/p) a taxa média de remoção de *S. aureus* dos punhos, expressa pelo fator de redução logarítmica, foi de $4,85 \pm 0,94$ e de $5,51 \pm 0,84$, respectivamente, para os voluntários tratados com 3 mL e 5 mL ($P = 0,02344$). A

contaminação dos dedos ocorreu em 65% (13/20) dos voluntários tratados com 3 mL do álcool etílico 70% e em nenhum daqueles tratados com 5 mL.

Conclusões: Os resultados sugerem que a eficácia da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na técnica de higiene das mãos depende do produto utilizado e da microbiota transitória presente nos punhos. Os dados também sugerem uma limitada eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *S. aureus* dos punhos artificialmente contaminados. Um maior volume de álcool (e.g., 5 mL) deve ser considerado na antissepsia das mãos com preparações alcoólicas utilizando a técnica dos sete passos.

Palavras-chave: antissépticos, higiene das mãos, punhos, sabão.

ABSTRACT

Introduction. The hand antiseptis with alcoholic preparations is currently considered the most effective technique for hand hygiene for health professionals. In practice, it is performed using six steps (classic technique used in many countries) or seven steps, when included the friction of the wrists (technique used in Brazil and in some other countries).

Objective. To investigate the efficacy of hand hygiene technique performed in seven steps, for the removal of transient microbiota from wrists.

Methods. The study was conducted using three 6x6 Latin squares utilizing the following test microorganisms: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The wrists were contaminated and hand hygiene was performed using 3 mL of each product (ethyl alcohol 70%, alcohol gel, povidone-iodine, chlorhexidine and plain liquid soap). The removal rate was determined by the logarithmic reduction factor. The results were estimated by analysis of variance. A comparison of the efficacy of hand antiseptis with 3 mL and 5 mL of 70% ethyl alcohol (w/w) for removing *S. aureus* from artificially contaminated wrists was also included in the study. The average removal rates were compared using the Student's *t* test.

Results. Povidone-iodine and alcoholic preparations showed greater efficacy than plain soap and chlorhexidine for removing the test microorganisms from wrists. Contamination of the fingers of 3 volunteers treated with alcoholic preparations and antiseptic agents was observed during the assays of *S. aureus* experiments. The average removal rate of *S. aureus* from wrists for volunteers treated with 3 mL and 5 mL, expressed by the logarithmic reduction factor, was 4.85 ± 0.94 and 5.51 ± 0.84 , respectively ($P = 0.02344$). The contamination of the fingers occurred in 65% (13/20) of the subjects treated with 3 mL of 70% ethyl alcohol and in none of those treated with 5 ml.

Conclusions. The results suggest that the efficacy of rubbing the wrists (i.e., step seven) in the hand hygiene technique depends on both the product used and the transient microbiota present in wrists. The data also suggest a limited efficacy of hand antisepsis with 3 mL of 70% ethyl alcohol (w/w) for removing *S. aureus* from artificially contaminated wrists. A higher volume of alcohol (e.g., 5 mL) should be considered in hand antisepsis with alcoholic preparations using the seven-step technique.

Keywords: antiseptics, hand hygiene, soap, wrists.

INTRODUÇÃO

A antissepsia das mãos com preparações alcoólicas é atualmente recomendada como a técnica padrão para a higienização das mãos dos profissionais de saúde.^{1,2} É realizada na prática utilizando-se a clássica técnica dos seis passos proposta por Ayliffe et al.³ (Figura 1), usada em vários países.⁵⁻⁷ Uma adaptação desta técnica, com a inclusão da fricção dos punhos como o sétimo e último passo é também recomendada em outros países.⁸⁻¹¹

Um aspecto controvertido na antissepsia das mãos com preparações alcoólicas, quando se emprega a técnica dos sete passos, é se a fricção dos punhos é uma etapa realmente efetiva e necessária, pois devido à evaporação do álcool durante a fricção das mãos nos passos 1 a 6 pode não existir mais álcool na etapa final da técnica (i.e., no passo 7). Assim, em vez de higienizar os punhos o profissional da saúde pode contaminar as pontas dos dedos pela microbiota dos punhos, comprometendo desta forma a eficácia do procedimento.

Apesar da importância deste assunto, nós não encontramos estudos na literatura justificando a inclusão da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na técnica dos seis passos de Ayliffe para a higienização das mãos na prática hospitalar. É importante salientar que a técnica dos seis passos é recomendada no manual de higienização das mãos da Organização Mundial da Saúde,² considerado o estado da arte sobre higiene das mãos.

No presente estudo nós investigamos a eficácia da antissepsia das mãos com álcool etílico e um álcool gel na remoção da microbiota dos punhos artificialmente contaminados de voluntários humanos. O sabão líquido não medicamentoso, povidona-iodo e clorexidina foram também incluídos no estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1 – Avaliação da eficácia de preparações alcoólicas (na forma líquida e de gel), do sabão comum e de antissépticos degermantes (povidona-iodo e clorexidina) na remoção da microbiota transitória dos punhos artificialmente contaminados de voluntários humanos durante a higienização das mãos.

Planejamento experimental. O planejamento experimental foi feito de acordo com um quadrado Latino 6x6, baseado nos trabalhos de Ayliffe et al.³ e Lilly e Lowbury¹², sendo os tratamentos com os agentes degermantes e os respectivos controles efetuados em três blocos aleatorizados 6x5 (seis voluntários contra cinco agentes degermantes, utilizando-se um bloco para cada organismo teste – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*), fazendo-se um rodízio de tal modo que cada um dos voluntários recebesse um tratamento diferente a cada semana. Foi mantido um intervalo de sete dias entre os experimentos, para a restauração da flora normal da pele dos voluntários. O presente estudo foi aprovado na 204ª Reunião (29/10/2012) do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, conforme Parecer No. 627/2010 (CAAE Nº. 05411212.5.0000.0104).

Microrganismos testes. Foram utilizadas amostras de *Escherichia coli*, cepa K12, DSM 11250 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) e *Candida albicans* ATCC 90028.

Inóculo. O inóculo do microrganismo teste foi obtido pela cultura de 24 horas em “Tryptic Soy Broth” (BD–Difco, Sparks, MD, USA) (*E. coli* e *S. aureus*) ou em “Sabouraud Dextrose Broth” (BD–Difco) (*C. albicans*). A contagem de viáveis foi realizada, em duplicata, pela técnica da contagem na gota modificada.^{13,14} Resumidamente, para cada contagem, três gotas de 0,02 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , preparadas pela mistura de 0,2 mL do inóculo com 1,8 mL de solução salina triptonada (Tryptone, BD–Difco) foram depositadas na superfície de placas de Petri 90 x 15 mm contendo 15 mL de “Tryptic Soy Agar” (BD–Difco) para *E. coli* e *S. aureus*, e 15 mL de “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) contendo 50 µg/mL de cloranfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda., Diadema, SP, Brasil) para *C. albicans*. Após a secagem do inóculo, as placas foram incubadas em estufa, a 37 °C, em aerobiose durante 24-48 horas. Sempre que possível, foram selecionadas para contagem as gotas das diluições que apresentaram crescimento entre 6 a 60.¹⁴

Voluntários. Foram convidados para participar deste estudo seis indivíduos adultos, sadios, de ambos os sexos, incluindo quatro estudantes e dois professores da Universidade Estadual de Maringá, sendo observado com rigor o estado íntegro e sadio das mãos e dos punhos destes voluntários durante a realização de todos os experimentos. Os voluntários que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme demonstrado no Anexo 1 (página 55).

Agentes degermantes. Foram utilizados os seguintes produtos: (i) sabão líquido não medicamentoso (Handtech® perolizado erva doce, Adhetec Química Indústria e Comércio Ltda., Sumaré, SP, Brasil); (ii) solução antisséptica-detergente contendo 10% de iodopolivinilpirrolidona, com 1% de iodo ativo (Laboriodine Degermante®, Segmenta Farmacêutica Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil); (iii) solução antisséptica-detergente contendo

2% de digluconato de clorexidina (Riohex®, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil); (iv): álcool etílico a 70% (p/p), preparado no momento de uso misturando-se 70g de álcool etílico absoluto ACS (©Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) com 30g de água destilada; (v) álcool gel 70% (v/v) (Riogel®, Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Contaminação artificial dos punhos. Para a aplicação do microrganismo teste, os punhos de cada voluntário foram inicialmente lavados durante 20-30 segundos com água corrente e 1mL de sabão líquido não medicamentoso. A seguir, as mãos dos voluntários foram lavadas durante 30 segundos com água e 3 mL de sabão líquido não medicamentoso, enxaguadas em água corrente por 15 segundos e enxugadas em toalhas de papel esterilizadas por 15 segundos (i.e., higienização simples das mãos). Volumes de 0,02 mL do inóculo foram depositados em uma área previamente demarcada, situada perpendicularmente a um centímetro da prega cutânea distal do punho direito de cada voluntário (círculo com 25mm de diâmetro), seguindo-se de leve fricção com um bastão de vidro 5x100 mm estéril durante 40 segundos e secagem ao ar por outros 80 segundos.^{3,15} Procedimento idêntico foi realizado para a contaminação do punho esquerdo.

Tratamento com os agentes degermantes. O tratamento com as preparações alcoólicas foi feito aplicando-se volumes de 3 mL do álcool etílico 70% (p/p) ou do álcool gel 70% (v/v), sobre as mãos secas, em concha, seguidas da fricção das mãos durante 30 segundos, empregando-se a seguinte técnica: (1) fricção das palmas das mãos entre si; (2) fricção da palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda (e vice-versa), entrelaçando os dedos; (3) fricção das palmas das mãos entre si com os dedos entrelaçados; (4) fricção do dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta (e vice-versa), segurando os dedos; (5) fricção

do polegar direito, com auxílio da palma da mão esquerda (e vice-versa), utilizando um movimento circular; (6) fricção das polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita (e vice-versa), fazendo um movimento circular; (7) fricção do punho esquerdo com auxílio dos dedos e palma da mão direita (e vice-versa), com movimentos circulares.^{8,16} No caso das soluções antissépticas-detergentes (povidona-iodo e clorexidina) e o sabão líquido não medicamentoso, foram aplicados 3 mL dos produtos, friccionando-se as mãos durante 30 segundos de maneira semelhante as preparações alcólicas, sendo no entanto, as mãos previamente umedecidas com água estéril. Após a fricção, as mãos foram enxaguadas com 300 mL de água estéril por 15 segundos e a seguir enxugadas suavemente por 15 segundos em toalhas de papel estéril.

Recuperação do microrganismo teste. A recuperação do microrganismo teste foi realizada com base na técnica descrita por Eckert e colaboradores.¹⁵ Brevemente, a amostragem dos punhos foi feita pressionando-se um cilindro de vidro 30x50mm estéril sobre a área previamente demarcada no punho (25mm) e adicionando-se 3,5 mL do líquido de amostragem, constituído por uma solução salina triptonada estéril a 0,1% adicionada de neutralizantes: tiosulfato de sódio a 1% (Labsynth® Produtos para laboratórios Ltda., Diadema, SP, Brasil), lecitina de soja a 0,5% (Via Farma importadora Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e Tween 80 a 1% (Alamar Tecno-Científica Ltda., Diadema, SP, Brasil). A seguir, com auxílio de um bastão de vidro 5x100mm estéril, foi efetuada a fricção da área da pele por 60 segundos e aspiração do fluido para a contagem de viáveis. A contagem de viáveis do microrganismo teste recuperado dos voluntários controles (i.e., pré-tratamento) foi realizada pela técnica de contagem na gota modificada.^{13,14} Brevemente, três gotas de 0,02 mL do fluido e das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , preparadas pela mistura de 0,2 mL do líquido de amostragem com 1,8 mL de solução salina triptonada, foram depositadas na superfície de

placas de Petri 90 x 15 mm contendo 15 mL de ágar “Tryptic Soy Agar” (BD–Difco) para *E. coli* e *S. aureus* e 15 mL de “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) adicionado de 50µg/mL de cloranfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda.) para *C. albicans*. A contagem de viáveis do microrganismo teste recuperado dos voluntários tratados com os agentes degermantes (i.e., pós-tratamento) foi realizada pela técnica de semeadura em superfície. Volumes de 0,5 mL (em duplicata) e de 0,1 mL do fluido foram semeados em placas contendo 15 mL de “Tryptic Soy Agar” (BD–Difco) para *E. coli* e *S. aureus* e 15 mL de “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) com 50µg/mL de cloranfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda.) para *C. albicans*. Adicionalmente, volumes de 0,01 mL foram semeados no caso dos voluntários tratados com clorexidina e sabão comum.

Avaliação da contaminação dos dedos durante a fricção dos punhos. A contaminação das pontas dos dedos de cada voluntário, após tratamento com o agente degermante, foi investigada pela técnica de impressão e deslizamento dos dedos na superfície de “Tryptic soy agar” (BD–Difco) (*E.coli* e *S. aureus*) ou “Sabouraud dextrose agar” (BD–Difco) (*C. albicans*), utilizando-se uma placa para cada mão. Os meios de cultura foram ajustados para uma concentração final de 3% de ágar-ágar (BD–Difco) e adicionados de neutralizantes (Tween 80 1% - Alamar Tecno-Científica Ltda.; lecitina 0,5% - Via Farma Importadora Ltda.; e tiosulfato de sódio 1% - Labsynth®). O “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) foi adicionado de 50µg/mL de cloranfenicol (Alamar Tecno-Científica Ltda.). A técnica de impressão e deslizamento foi realizada, utilizando-se o seguinte procedimento: com auxílio de caneta para retroprojetor, o fundo de cada placa foi marcado com um risco paralelo ao diâmetro da placa, situado a uma distância de aproximadamente 2,5 cm do bordo da placa. Esta área foi usada para amostrar o dedo polegar, marcado com um “x”. Perpendicularmente a esta área, logo abaixo do risco, foram amostrados, individualmente, os dedos indicador

(abaixo do “x”), médio, anular e mínimo, conforme mostrado na Figura 2. A seguir, as placas foram incubadas na estufa a 37 °C durante 24 a 48 horas. No caso do desenvolvimento de colônias suspeitas de pertencerem aos microrganismos testes, as propriedades morfotintoriais das células foram confirmadas pela coloração de Gram e os isolados identificados por testes fenotípicos (e.g., coagulase em lâmina).¹⁷

Eficácia dos agentes degermantes. A eficácia dos agentes degermantes na remoção do microrganismo teste dos punhos foi expressa pelo fator de redução logarítmica (FRL), i.e., o \log_{10} da média das contagens pré-tratamento (voluntários controles) menos o \log_{10} da média das contagens pós-tratamento (voluntários tratados com os agentes degermantes). Os resultados foram estimados por análise de variância e teste de comparação múltipla de Tukey, empregando-se o programa “R” versão 3.0.3 (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Controles:

Neutralizantes. Para investigar um possível efeito inibitório dos agentes neutralizantes do líquido de amostragem sobre os microrganismos testes, a contagem de viáveis do inóculo (i.e., cultura de 24 horas em “Tryptic Soy Broth” - BD–Difco, para *E.coli* e *S. aureus* ou “Sabouraud Dextrose Broth” - BD–Difco, no caso de *C. albicans*) de cada ensaio foi realizada, em duplicata, pela técnica da gota modificada,^{13,14} diluindo-se o inóculo no líquido de amostragem. A contagem de viáveis realizada em solução salina triptonada foi usada, em paralelo, como um controle. Os valores médios obtidos nos testes de toxicidade dos neutralizantes de cada experimento foram comparados com seus respectivos controles empregando-se o teste *t* de Student, considerando-se um valor de $P < 0,05$ como estatisticamente significativa.

“Carryover”. Com objetivo de verificar uma possível inibição do crescimento dos microrganismos testes pela transferência dos produtos testados para o meio de cultivo (“carryover”) foi realizado um controle utilizando-se o seguinte procedimento: em cada ensaio, o fluido do punho direito de cada voluntário foi esterilizado por filtração em membrana MilliporeTM – HA 0,45 µm (©Merck KGaA). A seguir, a 0,9 ml do filtrado foi adicionado 0,1 ml do inóculo do “carryover” contendo aproximadamente 10.000 UFC/mL (teste). Em paralelo, 0,1 mL deste inóculo foi adicionado a 0,9 mL de solução salina triptonada estéril (controle). A seguir, seis gotas de 0,02 mL destas suspensões, puras (controle e teste) e diluídas 1/10, foram depositadas na superfície de placas de Petri 90 x 15 mm contendo 15 mL de “Tryptic soy agar” (BD–Difco) para *E. coli* e *S. aureus* e 15 mL de “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) para *C. albicans*. As placas foram incubadas por 24-48 horas a 37 °C, comparando-se então o número de colônias do microrganismo teste desenvolvido a partir do filtrado do líquido de amostragem e do controle em solução salina. Os valores médios obtidos no controle de “carryover” de cada experimento foram comparados com seus respectivos controles empregando-se o teste *t* de Student, considerando-se um valor de $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.¹⁸

Voluntários. Para verificar que os voluntários, ao final dos experimentos, não estivessem contaminados com algum dos microrganismos testes, cada punho foi higienizado por fricção durante 10-15 segundos, utilizando-se em cada punho 1 mL de sabão líquido não medicamentoso e água da torneira. As mãos foram então higienizadas inicialmente com água e sabão durante 30 segundos, enxaguadas e enxugadas com toalhas de papel esterilizadas; depois com álcool etílico a 70% (p/p) por 30 segundos. As pontas dos dedos foram então amostradas para controle final por técnica de impressão e deslizamento dos dedos em placas contendo “Tryptic Soy Agar” 3% (BD–Difco) (*E.coli* e *S. aureus*) ou “Sabouraud Dextrose Agar” 3% (BD–Difco) (*C. albicans*) adicionado de neutralizantes. Os punhos foram

amostrados por impressão sobre a área demarcada durante 5 segundos em placas Rodac™ (BD, Sparks, MD, USA) contendo 20 mL de “Tryptic Soy Agar” (BD–Difco) para *E. coli* e *S. aureus* e 20 mL de “Sabouraud Dextrose Agar” (BD–Difco) para *C. albicans*, sendo ambos adicionados de neutralizantes.

Preparo do inóculo para o controle do “carryover”. Nos ensaios com *E. coli* e *S. aureus*, o inóculo para o controle do “carryover” foi preparado após duas ativações dos microrganismos testes em “Tryptic soy broth” (cultivo de 24 horas a 37°C), seguidos dos plaqueamentos em “Tryptic soy agar”. Assepticamente, com auxílio de alça bacteriológica, foram transferidas 3 a 5 colônias idênticas para um tubo de ensaio 13 x 100 mm contendo 0,5 mL de solução salina triptonada para obtenção de uma suspensão fortemente turva. Em outro tubo de ensaio, contendo 3 mL de solução salina triptonada, foram adicionadas 2 a 3 gotas da suspensão bacteriana fortemente turva até alcançar uma turbidez visualmente comparável com aquela do tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Com o auxílio de espectrofotômetro (Milton Roy, Spectronic 21D, Ivyland, PA, USA), previamente regulado para um comprimento de onda de 620 nm, conforme recomendado pela Norma Europeia 1040,¹⁹ a absorvância desta suspensão foi ajustada para aproximadamente 0,170 nm para a *E. coli* e 0,180 nm para o *S. aureus*, adicionando-se pequenos volumes de solução salina triptonada ou da suspensão bacteriana concentrada. A partir dessa suspensão, foram realizadas as diluições decimais seriadas de 10^{-1} até 10^{-4} . Dois mililitros da diluição 10^{-4} foram misturados a 1 mL de solução salina triptonada, de forma a obter um inóculo com aproximadamente 10.000 UFC/mL. Na preparação do inóculo do “carryover” de *C. albicans*, foi utilizada a diluição 10^{-4} da contagem de viáveis do inóculo sem neutralizantes.

Preparo da suspensão padrão de sulfato de bário. A suspensão de sulfato de bário foi preparada de forma a apresentar uma turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Para isso, foi adicionado 0,5 mL de uma solução 0,048 M de cloreto de bário à 99,5 mL de uma solução 0,36 N de ácido sulfúrico utilizando balão volumétrico de 100 mL. Volumes de 4 mL desta suspensão foram transferidos para tubos de ensaio 13 x 100 mm com tampa de rosca e selados com Parafilm® (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA).²⁰

EXPERIMENTO 2 - Comparação da eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL e 5 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *Staphylococcus aureus* dos punhos artificialmente contaminados.

Microorganismo teste. Foi utilizada uma amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Voluntários. Foram convidados a participar deste estudo oito indivíduos adultos, sadios, de ambos os sexos, incluindo estudantes, técnicos e professores da Universidade Estadual de Maringá, sendo observado com rigor o estado íntegro e sadio das mãos e dos punhos destes voluntários durante a realização de todos os ensaios. Os voluntários que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme demonstrado no Anexo 1 (página 55).

Antisséptico. O antisséptico utilizado foi o álcool etílico 70% (p/p), preparado no momento de uso misturando-se 70 g de álcool etílico absoluto ACS (©Merck KGaA) com 30g de água destilada.

Metodologia. O preparo do inóculo, a contaminação artificial dos punhos, o tratamento com o antisséptico, a recuperação do microorganismo teste, a avaliação da contaminação dos dedos durante a fricção dos punhos, o cálculo da eficácia do antisséptico e o controle final de contaminação dos voluntários foram executados de maneira idêntica àquela descrita no Experimento 1, sendo, no entanto, cada voluntário seu próprio controle. Foram realizados 20 ensaios, comparando-se as médias das taxas de remoção de *S. aureus* dos punhos tratados com 3 mL e de 5 mL pelo teste *t* de Student. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

A Tabela 1 mostra o número de células viáveis de *Escherichia coli* (microrganismo teste) recuperado dos punhos artificialmente contaminados dos seis voluntários ensaiados no quadrado Latino (bloco 1). Nos voluntários controles (i.e., naqueles sem tratamento), a recuperação do microrganismo teste dos punhos variou de 60.000 a 12 milhões de unidades formadoras de colônias (UFC), recuperando-se, em média, em torno de 3 milhões de UFC/punho (i.e., 6,45 \log_{10}). A média das UFC/punho de *E. coli* recuperadas após os tratamentos variou de 14 (povidona-iodo e álcool 70%) a 790 (clorexidina).

O número médio de células viáveis de *Staphylococcus aureus* (bloco 2) recuperadas dos punhos dos voluntários controles e dos voluntários tratados com os agentes degermantes é mostrado na Tabela 2. A recuperação do microrganismo teste dos controles variou de 400.000 a 8 milhões de UFC/punho, obtendo-se, em média, em torno de 3 milhões de UFC/punho (i.e., 6,44 \log_{10}). O número médio de células viáveis de *S. aureus* recuperadas dos punhos após o tratamento com os agentes degermantes oscilou entre 14 UFC (povidona-iodo) e 150.000 UFC (clorexidina).

Na Tabela 3 são apresentados os valores do número médio de células viáveis de *Candida albicans* (bloco 3) recuperadas dos punhos dos voluntários controles e dos voluntários que receberam tratamento com os agentes degermantes. Os valores de células viáveis recuperadas nos voluntários controles variaram entre 170.000 e 1,5 milhões UFC/punho e, em média, foram recuperadas aproximadamente 800.000 UFC/punho (i.e., 5,89 \log_{10}). Nos voluntários tratados com os produtos degermantes os valores variaram de 2 UFC/punho (álcool etílico 70%) a 910 UFC/punho (clorexidina).

A eficácia dos produtos testados na remoção dos microrganismos testes (*E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*) dos punhos, expressa pelo fator de redução logarítmica (FRL) é apresentada na Tabela 4 e na Figura 3. No bloco 1, os agentes degermantes reduziram entre 99,9718% (clorexidina) e 99,9995% (povidona-iodo) a população de *E. coli* aplicada nos punhos. Em função da eficácia da remoção do microrganismo teste dos punhos os produtos foram distribuídos em dois grupos não muito bem delimitados. No primeiro grupo, não houve diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) entre povidona-iodo (FRL 5,31), álcool etílico 70% (FRL 5,29), álcool gel (FRL 4,86) e o sabão comum (FRL 4,30). No segundo grupo, também não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre clorexidina (FRL 3,55), sabão comum (FRL 4,30) e álcool gel (FRL 4,86) (Figura 3A). Nos blocos 2 e 3, os agentes degermantes testados reduziram entre 99,4630% (clorexidina) e 99,9995% (povidona-iodo) a quantidade de *S. aureus* dos punhos e entre 99,8825% (clorexidina) e 99,9997% (álcool etílico 70% e povidona-iodo) a população de *C. albicans* aplicada nos punhos. A eficácia dos produtos degermantes mostrou um padrão similar nos experimentos com *S. aureus* e *C. albicans* (Figuras 3B e 3C) ao dividir os agentes degermantes em dois grupos com diferença significativa ($P < 0,05$) entre eles. O grupo mais eficaz composto pelo álcool etílico 70% (FRL 4,78 e 5,65), povidona-iodo (FRL 5,29 e 5,54) e álcool gel (FRL 4,70 e 4,68) e o segundo grupo, de menor eficácia, compreendendo o sabão (FRL 2,67 e 3,30) e a clorexidina (FRL 2,27 e 2,94).

Durante os testes do Experimento 1 com *E. coli* e *C. albicans* não foi observada a contaminação da ponta dos dedos dos voluntários pela microbiota transitória dos punhos durante a higienização das mãos. Nos ensaios com *S. aureus* foi constatada a contaminação da ponta dos dedos com a microbiota transitória dos punhos após a higienização das mãos com álcool líquido 70%, álcool gel, clorexidina e povidona-iodo.

Em relação aos controles usados no presente estudo, os agentes neutralizantes não mostraram efeito inibitório para os microrganismos testes (Tabela 5). Não houve inibição do crescimento por “carryover” na recuperação dos microrganismos testes dos punhos após o tratamento com os agentes degermantes (Tabela 6). Nenhum dos voluntários ensaiados apresentou o microrganismo teste nos punhos e nas pontas dos dedos após o controle final da contaminação.

EXPERIMENTO 2

A tabela 7 mostra a eficácia do Álcool etílico 70 % (p/p), após a higiene das mãos com 3 mL e 5 mL, na remoção de *Staphylococcus aureus* de punhos artificialmente contaminados. Nos voluntários controles recuperou-se em média em torno de 3 milhões UFC/punho (i.e., $6,43 \log_{10}$) do microrganismo teste por punho. A taxa média de remoção de *S. aureus* dos punhos, expressa pelo FRL, foi de $4,85 \pm 0,94$ e de $5,51 \pm 0,84$, respectivamente, para os tratamentos com 3 mL e 5 mL, sendo esta diferença significativa ($P = 0,02344$). A contaminação dos dedos ocorreu em 65 % (13/20) dos voluntários após tratamento com 3 mL do álcool etílico 70% e em nenhum daqueles tratados com 5 mL. Nenhum dos voluntários ensaiados apresentou o microrganismo teste nos punhos e nas pontas dos dedos após o controle final da contaminação.

DISCUSSÃO

No Brasil, a higienização das mãos dos profissionais da saúde é considerada adequada quando as mãos são friccionadas em todas as suas faces, espaços interdigitais, articulações, unhas, extremidades dos dedos e punhos, realizando-se a técnica em sete passos.⁸ Por outro lado, a técnica de higienização das mãos recomendada pela Organização Mundial da Saúde, adotada em diversos países, é baseada na clássica técnica dos seis passos de Ayliffe que não inclui a higienização dos punhos.^{2,3}

Em nosso conhecimento este é o primeiro estudo realizado com o objetivo de investigar se o sétimo passo da técnica de higienização das mãos (i.e., a fricção dos punhos) é uma etapa realmente efetiva na descontaminação dos punhos, utilizando como modelo experimental os punhos artificialmente contaminados de voluntários humanos. Os resultados do experimento 1 mostraram que a remoção da microbiota dos punhos depende do produto utilizado e também do tipo de microrganismo. No experimento 2, a amostra de *S. aureus* persistiu nas mãos de 65% (13 de 20) dos voluntários tratados 3 mL de álcool etílico 70% (p/p) e foi completamente removida naqueles tratados com 5 mL, demonstrando a importância do volume do álcool na eficácia da antissepsia das mãos.

Alguns estudos, realizados com metodologias diferentes daquela usada em nosso trabalho, também demonstraram que a redução da microbiota das mãos é fortemente influenciada pelo volume da preparação alcoólica utilizada.^{21,22} Por exemplo, um experimento mostrou que a antissepsia das mãos com 0,75 mL, 1,5 mL ou 3 mL de etanol a 62% em gel, resultou em uma taxa de remoção, expressa pelo fator de redução logarítmica, de respectivamente, 1,96, 2,41 e 3,79.²¹ Em outro estudo foi investigada a eficácia antimicrobiana de duas preparações alcoólicas, comparando-se volumes de 2 mL a 4 mL.

Somente os produtos testados a partir de 2,5 mL e 3 mL alcançaram os critérios de eficácia exigidos pela Norma Europeia 1500 (EN 1500).^{22,23}

Em um estudo, realizado em nosso laboratório, a maioria (83%, 10 de 12) dos álcoois géis testados alcançou o critério de eficácia requerido pela EN 1500 no tempo de aplicação de 60 segundos, utilizando-se volumes de 6 mL. Em contraste, apenas 4 dos 12 (33%) álcoois géis foram aprovados quando aplicados em 30 segundos, empregando-se volumes de 3 mL.^{24,25} Os resultados destes estudos demonstram claramente a existência de uma relação entre o aumento do volume e a eficácia do antisséptico. Em nosso estudo, os resultados do experimento 2 são consistentes com estes achados.

Apesar da importância do volume e do tempo de contato no uso das preparações alcoólicas, estes parâmetros nem sempre estão claramente definidos nos protocolos oficiais. Por exemplo, as recomendações dos “Centers for Disease Control and Prevention” é de que a preparação alcoólica seja aplicada na palma de uma das mãos, seguido da fricção das mãos juntas, cobrindo todas as superfícies das mãos e dos dedos, até a completa secagem das mãos. O volume do produto a ser utilizado deve seguir as instruções do fabricante.¹ Na técnica recomendada pela Organização Mundial de Saúde, o produto deve ser aplicado cobrindo a palma da mão e friccionado em todas as superfícies das mãos, durante 20 a 30 segundos, utilizando-se a técnica dos seis passos de Ayliffe.² Na prática, a maioria dos fabricantes das preparações alcoólicas recomendam o uso de pelo menos 3mL.

Uma grande preocupação do uso de preparações alcoólicas em volumes inferiores a 3 mL é que o produto não seja suficiente para cobrir todas as superfícies das mãos, comprometendo assim a eficácia da antissepsia das mãos. Na prática, isto é evidenciado quando o profissional de saúde sente as mãos secas após friccioná-las por 10 a 15 segundos com a preparação alcoólica.¹ Este fato foi observado em nosso estudo, no experimento 2, apesar do uso de 3 mL de álcool etílico 70%. Em varias ocasiões, os voluntários relataram que

sentiam as mãos secas antes de realizarem o último passo (i.e., a fricção dos punhos). Isto não ocorreu quando foram empregados 5 mL do álcool etílico 70%.

A escolha dos microrganismos testes no experimento 1, foi baseado nas recomendações de Ayliffe et al.³, onde além de outros fatores, os autores enfatizam a necessidade de se utilizar pelo menos um representante de cocos Gram-positivos e um de bacilos Gram-negativos. Justificamos o uso de *E. coli*, *S. aureus* e de *C. albicans* como microrganismos testes porque estes microrganismos persistem como importantes patógenos hospitalares oportunistas,²⁶⁻²⁸ são de fácil cultivo e identificação, apresentam boa capacidade de sobrevivência na pele,²⁹⁻³⁰ além de constituírem representantes clássicos dos cocos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*), bacilos Gram negativos – enterobactérias – (*Escherichia coli*) e leveduras (*Candida albicans*).

Na avaliação do efeito imediato de antissépticos sobre a microbiota transitória das mãos, independente da metodologia empregada, é indispensável a utilização de neutralizantes adequados para impedir um possível efeito residual dos produtos a serem testados, conhecido como “carryover”. Nós usamos a técnica de neutralização para prevenir o efeito de “carryover”. Com este propósito usamos Tween 80 e lecitina para neutralização da clorexidina e Tween 80 e tiossulfato de sódio para povidona-iodo.^{3,12,31} Apesar do sabão não medicamentoso e dos álcoois (líquido e em gel) não apresentarem efeito residual, eles foram incluídos no controle de “carryover” para confirmar a ausência de ingredientes antimicrobianos com ação residual em suas formulações. A mistura de neutralizantes foi eficiente e não mostrou efeito inibitório sobre os microrganismos testes.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. Primeira, o reduzido número de microrganismos testes e sua origem de coleção. Acreditamos que o estudo deva ser ampliado testando-se mais amostras, incluindo isolados clínicos, para torná-lo mais representativo. Segunda, o volume de 3 mL dos produtos usados na higiene das mãos no experimento 1, pode

ter influenciado os resultados. Acreditamos que ele não tenha alterado a tendência dos resultados, pois as preparações alcoólicas e a povidona-iodo, conforme esperado, foram os agentes com maior eficácia antimicrobiana. Justificamos o uso de 3 mL porque a maioria dos produtos alcoólicos usados nos hospitais da Europa, alcançam os critérios de eficácia da Norma Europeia 1500,²³ utilizando-se 3 mL e tempo de aplicação de 30 segundos. Por último, no experimento 2 usamos *S. aureus* porque ele foi o único microrganismo teste recuperado das pontas dos dedos no experimento 1. Apenas o álcool etílico 70% foi usado no experimento 2 porque entre os produtos testados é o que tem maior probabilidade de sofrer evaporação durante a antissepsia das mãos.

Em resumo, os resultados do presente estudo sugerem que a eficácia da fricção dos punhos (i.e., o passo sete) na técnica de higiene das mãos depende do produto utilizado e do tipo de microbiota transitória presente nos punhos. Os resultados também sugerem uma limitada eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *S. aureus* dos punhos artificialmente contaminados. Um maior volume de álcool (e.g., 5 mL) deve ser considerado na antissepsia das mãos com preparações alcoólicas utilizando a técnica dos sete passos, recomendada em nosso meio pelo Ministério da Saúde.

REFERÊNCIAS

1. Boyce JM, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings: Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA. Hand Hygiene Task Force. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002;23(suppl 12):S3-40.
2. World Health Organization. *WHO guidelines on hand hygiene in health care. First global patient safety challenge: clean care is safe care*. Geneva: WHO, 2009.
3. Ayliffe GAJ, Babb JR, Quoraishi AH. A test for hygienic hand disinfection. *J Clin Pathol* 1978;31(10):923-28.
4. Field EA, Jedyakiewicz NM, King CM. A practical gloving and handwashing regimen for dental practice. *Br Dent J* 1992;172(3):111-113.
5. New South Wales Health. *Infection Control Policy (PD2007_036)*. Sydney: NSW Government, 2007.
6. Raffin SM, Villa S. Higiene de manos. Guía de recomendaciones para los establecimientos de salud. *Epidemiolog Control Inf* 2011;3(3):390-480.
7. Italia. Direzione Generale della Programazione Sanitaria. *Manuale di formazione per il governo clinico: la sicurezza dei pazienti e degli operatori*. Milano: Ministero della Salute, 2012.
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Segurança do paciente - Higienização das mãos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
9. Société Française d'Hygiène Hospitalière – SFHH. Recommandations pour l'hygiène des mains. *Hygiènes* 2009;17(3):139-240.
10. National Health Service - NHS. *Standard Infection Control Precautions*. London: Department of Health, 2010.

11. Singapura. Singapore Government. *Recommendations for Personal Hygiene. Keep Your Hands Clean.* Singapore: Health Promotion Board. <http://www.hpb.gov.sg/HOPPortal/health-article/5652>. Published 2013. Accessed December 3, 2013.
12. Lilly HA, Lowbury EJ. Transient skin flora: their removal by cleansing or disinfection in relation to their mode of deposition. *J Clin Pathol* 1978;31(10):919-922.
13. Miles AA, Misra SS, Irwin, JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg* 1938; 38(06):732-749.
14. Guilhermetti M, Hernandez SED, Garcia LB, Cardoso CL. Effectiveness of hand-cleansing agents for removing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from contaminated hands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001;22(2):105-108.
15. Eckert DG, Ehrenkranz NJ, Alfonso BC. Indications for alcohol or bland soap in removal of aerobic gram-negative skin bacteria: assessment by a novel method. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10(7):306-311.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. *Guia técnico - Higienização das mãos em serviços de saúde.* Brasília: Ministério da Saúde, 2007.
17. MacFaddin JF. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.* 3rd ed. Philadelphia, PA: Williams and Wilkins; 2000.
18. Zarpellon MN, Soares VS, Albrecht NR, et al. Comparison of 3 alcohol gels and 70% ethyl alcohol for hand hygiene. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(10):960-962.
19. European Norm EN 1040. Chemical disinfectants and antiseptics. Basic bactericidal activity. Test method and requirements (phase 1). European commission, Brussels, Belgium, 1997.
20. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JCT, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45(4):493-496.

21. Macinga DR, Beausoleil CM, Campbell E, et al. Quest for a realistic in vivo test method for antimicrobial hand-rub agents: introduction of a low-volume hand contamination procedure. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(24):8588-8594.
22. Goroncy-Bermes P, Koburger T, Meyer B. Impact of the amount of hand rub applied in hygienic hand disinfection on the reduction of microbial counts on hands. *J Hosp Infect* 2010;74(3):212-218.
23. European Standard EN 1500. *Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic handrub. Test method and requirements*. Brussels: European Committee for Standardization, 1997.
24. Guilhermetti, M, Wiirzler LAM, Facio, BC, et al. Antimicrobial efficacy of alcohol-based hand gels. *J Hosp Infect* 2010;74(3):219-224.
25. Prado, MF, Coelho, ACC, Brito, JPB, et al. Antimicrobial efficacy of alcohol-based hand gels with a 30-s application. *Lett Appl Microbiol* 2012;54(6):564-567.
26. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29(2):239-244.
27. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39(3):309-317.
28. Pien BC, Sundaram P, Raoof N, et al. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am J Med* 2010;123(9):819-828.
29. Gontijo Filho PP, Stumpf M, Cardoso CL. Survival of gram-negative and gram-positive bacteria artificially applied on the hands. *J Clin Microbiol* 1985;21(4):652-653.
30. Rangel-Frausto MS, Houston AK, Bale MJ, Fu C, Wenzel RP. An experimental model for study of *Candida* survival and transmission in human volunteers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13(7):590-595.

31. Ayliffe, GAJ, Babb, JR, Davies, JG, Lilly, HA. Hand disinfection: a comparison of various agents in laboratory and ward studies. *J Hosp Infec* 1988;11(3):226-243.

TABELA 1. Efeito imediato de agentes degermantes sobre a flora bacteriana transitória (*Escherichia coli* DSM 11250) dos punhos, expresso em Log₁₀ da média do número de células viáveis recuperadas.

Voluntários	Contagem inicial ^a	Após tratamento ^b com:				
		Sabão	Clorexidina	PVP-I	Álcool gel	Álcool 70%
A	6,47	2,50	2,44	1,72	1,49	2,03
B	6,99	1,67	3,44	0,48	1,23	–
C	6,63	3,35	3,15	1,72	2,25	2,09
D	4,77	2,35	3,93	0,65	2,13	2,03
E	7,08	1,41	2,72	0,65	1,31	–
F	6,74	1,62	1,70	1,60	1,08	0,78
Média ± DP:	6,45 ± 0,35	2,15 ± 0,30	2,90 ± 0,32	1,14 ± 0,24	1,58 ± 0,20	1,16 ± 0,42

NOTA. DP, desvio padrão. –, ausência de crescimento.

^a Controles, sem tratamento. Log₁₀ da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo.

^b Log₁₀ da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo após tratamento.

TABELA 2. Efeito imediato de agentes degermantes sobre a flora bacteriana transitória (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) dos punhos, expresso em Log_{10} da média do número de células viáveis recuperadas.

Voluntários	Contagem inicial ^a	Após tratamento ^b com:				
		Sabão	Clorexidina	PVP-I	Álcool gel	Álcool 70%
A	6,46	3,77	4,68	1,82	2,44	1,52
B	6,69	4,10	3,48	–	–	2,61
C	6,67	4,01	4,47	1,70	2,20	1,77
D	5,57	3,03	4,01	1,06	1,65	2,18
E	6,92	4,05	4,08	0,65	2,22	0,48
F	6,32	3,63	4,27	1,65	1,95	1,41
Média ± DP:	6,44 ± 0,19	3,77 ± 0,16	4,17 ± 0,17	1,15 ± 0,29	1,74 ± 0,37	1,66 ± 0,30

NOTA. DP, desvio padrão. –, ausência de crescimento.

^a Controles, sem tratamento. Log_{10} da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo.

^b Log_{10} da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo após tratamento.

TABELA 3. Efeito imediato de agentes degermantes sobre a flora bacteriana transitória (*Candida albicans* ATCC 90028) dos punhos, expresso em Log_{10} da média do número de células viáveis recuperadas.

Voluntários	Contagem inicial ^a	Após tratamento ^b com:				
		Sabão	Clorexidina	PVP-I	Álcool gel	Álcool 70%
A	6,03	2,86	3,00	0,81	1,00	–
B	6,10	2,22	2,00	–	–	–
C	5,24	3,41	2,96	–	1,28	–
D	5,74	2,14	2,51	0,48	1,38	1,00
E	6,07	2,29	3,69	–	–	–
F	6,19	2,63	3,59	0,81	3,66	0,48
Média ± DP:	5,89 ± 0,15	2,59 ± 0,20	2,96 ± 0,26	0,35 ± 0,16	1,22 ± 0,55	0,25 ± 0,17

NOTA. DP, desvio padrão. –, ausência de crescimento.

^a Controles, sem tratamento. Log_{10} da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo.

^b Log_{10} da média da contagem de viáveis recuperadas dos punhos direito e esquerdo após tratamento.

TABELA 4. Eficácia dos agentes degermantes na remoção das amostras de *Escherichia coli* (DSM 11250) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 90028) dos punhos contaminados, expressa pelo fator de redução logarítmica (FRL).

Agentes Degermantes	Taxa de remoção dos punhos, FRL \pm DP		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Álcool etílico 70%	5,29 \pm 0,22	4,78 \pm 0,14	5,65 \pm 0,09
Álcool gel 70%	4,86 \pm 0,16	4,70 \pm 0,17	4,68 \pm 0,23
Povidona-iodo 10%	5,31 \pm 0,17	5,29 \pm 0,14	5,54 \pm 0,09
Clorexidina 2%	3,55 \pm 0,19	2,27 \pm 0,10	2,94 \pm 0,12
Sabão Líquido	4,30 \pm 0,19	2,67 \pm 0,10	3,30 \pm 0,10
Controle ^a	6,45 \pm 0,35	6,44 \pm 0,19	5,89 \pm 0,15

NOTA. FRL é o Log_{10} da média da contagem inicial menos o Log_{10} da média da contagem final. DP, desvio padrão.

^a Voluntários sem tratamento com os agentes degermantes. Os resultados são o Log_{10} da média da contagem inicial.

TABELA 5. Controle do efeito inibitório dos neutralizantes: *Student's t* teste da média do Log_{10} das unidades formadoras de colônias da contagem de viáveis do inóculo dos microrganismos testes, realizadas no líquido de amostragem e em solução salina (controle).

Microrganismos Testes	Líquido de Amostragem	Solução Salina (Controle)	<i>P</i>
<i>E. coli</i>	9,20 ± 0,13	9,27 ± 0,18	0,2
<i>S. aureus</i>	8,90 ± 0,24	8,97 ± 0,21	0,6
<i>C. albicans</i>	7,97 ± 0,08	8,01 ± 0,08	0,2

NOTA. Os dados são média ± desvio padrão exceto quando for indicado. A média de 6 contagens foi determinada pela técnica da contagem na gota em sixtuplicata. Não significante, $P > 0,05$.

TABELA 6. Controle do “carryover”: *Student’s t* teste da média do Log₁₀ das unidades formadoras de colônias dos microrganismos testes suspensos no filtrado do líquido de amostragem obtido após o tratamento dos punhos com os agentes degermantes e em solução salina (controle).

Microrganismos Testes e Tratamento	Filtrado do Líquido de Amostragem	Solução Salina (Controle)	<i>P</i>
<i>Escherichia coli</i>			
Álcool etílico 70%	3,30 ± 0,21	3,21 ± 0,23	0,5
Álcool gel 70%	3,07 ± 0,16	3,04 ± 0,09	0,7
Povidona-iodo 10%	3,16 ± 0,20	3,13 ± 0,21	0,8
Clorexidina 2%	3,09 ± 0,28	3,13 ± 0,18	0,8
Sabão Líquido	3,10 ± 0,20	3,00 ± 0,17	0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Álcool etílico 70%	3,02 ± 0,23	2,98 ± 0,19	0,7
Álcool gel 70%	3,05 ± 0,13	3,01 ± 0,12	0,6
Povidona-iodo 10%	3,05 ± 0,18	3,04 ± 0,19	0,9
Clorexidina 2%	3,02 ± 0,11	3,01 ± 0,16	0,9
Sabão Líquido	3,05 ± 0,18	3,04 ± 0,19	0,9
<i>Candida albicans</i>			
Álcool etílico 70%	3,06 ± 0,08	3,06 ± 0,04	1
Álcool gel 70%	3,00 ± 0,06	2,99 ± 0,06	0,8
Povidona-iodo 10%	3,04 ± 0,08	3,03 ± 0,06	0,8
Clorexidina 2%	3,03 ± 0,11	3,01 ± 0,09	0,7
Sabão Líquido	3,05 ± 0,07	3,03 ± 0,08	0,7

NOTA. Os dados são média ± desvio padrão exceto quando for indicado. A média de 6 contagens foi determinada pela técnica da contagem na gota em sixtuplicata. Não significante, $P > 0,05$.

TABELA 7. Eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL e 5 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) dos punhos artificialmente contaminados, expressa pelo Log₁₀ das unidades formadoras de colônias.

Voluntário	3 mL de Álcool etílico 70 %			Voluntário	5 mL de Álcool etílico 70 %		
	Amostra Pré-tratamento	Amostra Pós-tratamento	Redução		Amostra Pré-tratamento	Amostra Pós-tratamento	Redução
A	6,51	–	6,51	A	6,56	1,33	5,23
B	5,35	1,51	3,84	B	6,43	0,74	5,69
C	6,61	0,88	5,73	C	6,75	0,95	5,80
D	6,07	0,85	5,22	F	6,73	–	6,73
A	7,15	0,54	6,61	A	6,93	0,30	6,63
B	6,41	1,04	5,37	B	6,19	1,20	4,99
C	6,13	0,54	5,59	F	6,74	1,64	5,10
E	4,85	1,76	3,09	A	6,86	0,74	6,12
B	5,60	2,05	3,55	B	6,08	0,54	5,54
C	6,44	1,54	4,90	F	6,37	1,94	4,43
D	7,32	2,94	4,38	A	6,87	0,74	6,13
E	7,10	2,03	5,07	B	6,45	1,36	5,09
B	6,17	0,85	5,32	F	5,93	2,06	3,87
C	6,62	1,69	4,93	A	6,86	–	6,86
D	6,65	2,07	4,58	G	7,06	0,88	6,18
E	6,66	2,10	4,56	F	5,41	0,95	4,46
B	6,73	1,20	5,53	H	6,00	–	6,00
C	6,84	2,31	4,53	C	6,45	1,61	4,84
D	7,11	3,56	3,55	F	5,38	0,74	4,64
E	6,93	2,67	4,26	A	6,04	–	6,04
Média ± DP:	6,46 ± 0,63	1,61 ± 0,89	4,85 ± 0,94	Média ± DP:	6,40 ± 0,48	0,89 ± 0,64	5,51 ± 0,84

NOTA. DP, desvio padrão. –, ausência de crescimento.

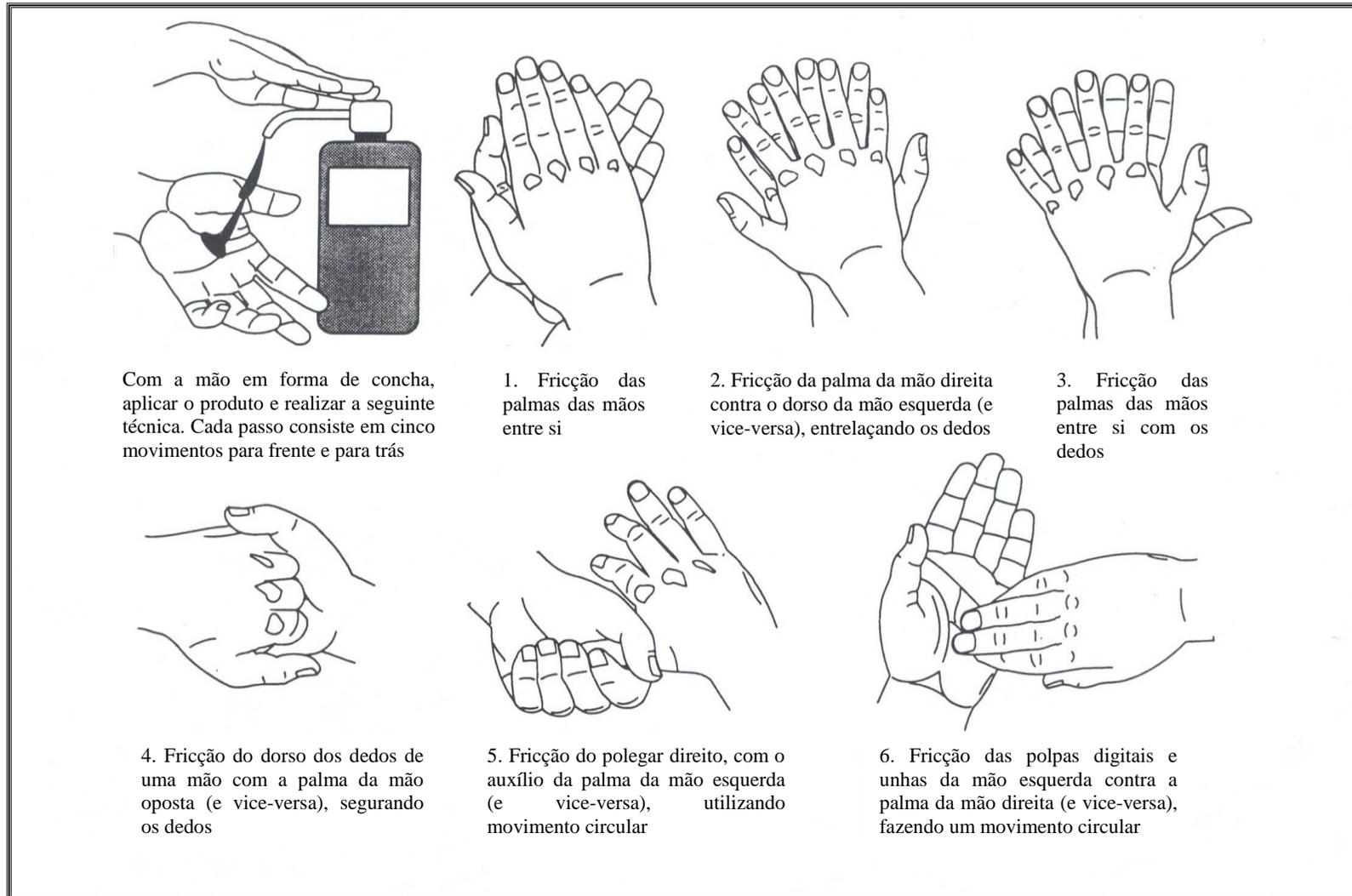


FIGURA 1. Ilustração da técnica dos seis passos proposta por Ayliffe et al.³ para a antissepsia das mãos com preparações alcoólicas.⁴

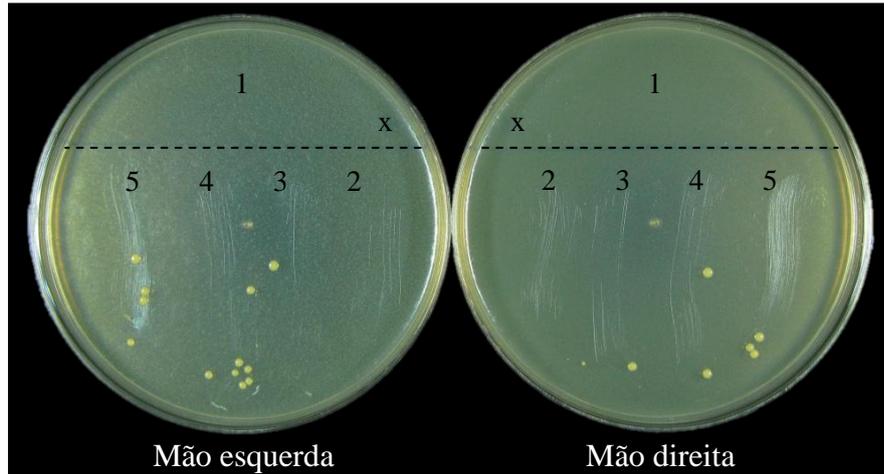


FIGURA 2. Contaminação das pontas dos dedos com a microbiota transitória dos punhos (*Staphylococcus aureus*) durante a higienização das mãos. Os dedos foram amostrados empregando-se a técnica de impressão e deslizamento em superfície de ágar nutriente. NOTA. Dedos: 1, polegar; 2, indicador; 3, médio; 4, anular; 5, mínimo.

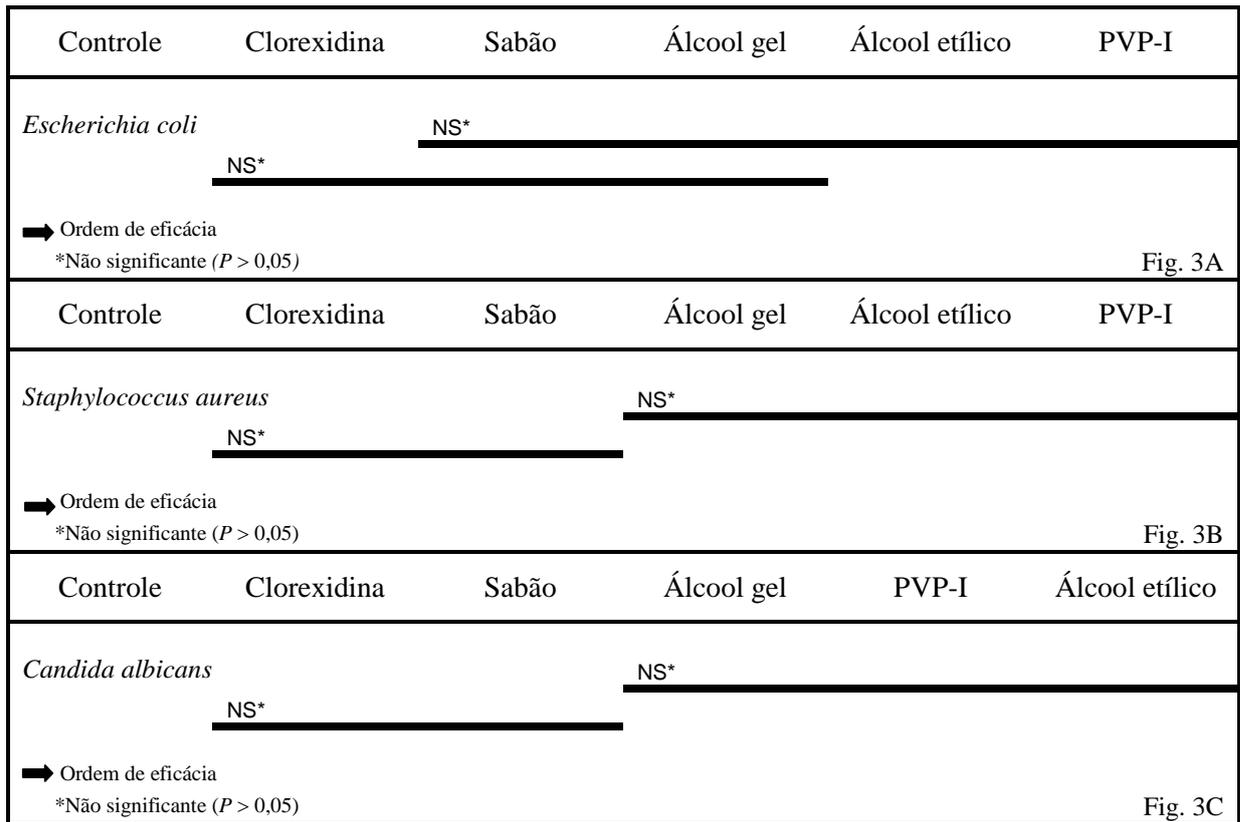


FIGURA 3. Comparação múltipla (Tukey) da eficácia da higienização das mãos na remoção de *Escherichia coli* (3A), *Saphylococcus aureus* (3B) ou *Candida albicans* (3C) dos punhos artificialmente contaminados.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada “Avaliação da higiene das mãos na remoção da flora bacteriana transitória dos punhos”, que faz parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e é orientada pelo professor Celso Luiz Cardoso do Departamento de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Estadual de Maringá. O objetivo da pesquisa é investigar se a fricção dos punhos é ou não uma etapa essencial na técnica de higienização das mãos com preparações alcoólicas. Para isto a sua participação é muito importante e ela se dará da seguinte forma: você terá seus punhos contaminados com o microrganismo teste, depois fará a higienização das mãos utilizando a técnica recomendada pelo Ministério da Saúde. A seguir será feita a amostragem dos punhos durante 1 minuto para verificar se o microrganismo teste foi removido ou não pela higienização das mãos. Informamos que poderá ocorrer algum desconforto durante a amostragem dos punhos, mas você estará confortavelmente sentado e terá a assistência dos participantes do projeto.

Estudo deste tipo, apesar da contaminação temporária dos punhos, pode apresentar um pequeno risco de contaminação para você, mas todos os cuidados de biossegurança serão tomados para evitá-los. Assim, ao término do experimento, cada punho será lavado com água e sabão durante 15 segundos. A seguir, as mãos serão higienizadas com água e sabão por 40 a 60 segundos, secadas com auxílio de papel toalha estéril e depois friccionadas com preparação alcoólica por 20 a 30 segundos. Você ainda fará como controle final, uma nova amostragem dos punhos e das pontas dos dedos para comprovar a ausência do microrganismo teste.

Assumimos a responsabilidade de dar assistência integral às complicações e danos decorrentes dos riscos previstos. Assim, no caso de você sofrer alguma contaminação com o microrganismo teste, você será avaliado clinicamente e tratado pela Dra. Márcia Arias Wingeter, médica infectologista, docente do Departamento de Medicina de nossa Instituição e participante do projeto. Os eventuais custos decorrentes da compra de medicamentos (antibióticos) serão pagos com recursos próprios do coordenador da pesquisa.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Informamos também que o microrganismo teste e as bactérias da microbiota da pele serão utilizadas para os fins estabelecidos na pesquisa e após serão descartadas de acordo com as normas de biossegurança do trabalho microbiológico. Nós esperamos que a realização do presente estudo possa contribuir para o melhor conhecimento da técnica de higienização das mãos com agentes degermantes. Caso você tenha mais dúvidas ou necessite maiores esclarecimentos, pode nos contatar no endereço abaixo ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UEM, cujo endereço consta deste documento. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Eu, _____, declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa coordenada pelo Professor Celso Luiz Cardoso.

Data: ___/___/2012.

Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu, **Darío Bordas García**, declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra-nominado.

Data: ___/___/2012.

Assinatura do pesquisador

Endereço do Coordenador da Pesquisa:

Prof. Celso Luiz Cardoso. Laboratório de Microbiologia (Sala 116, Bloco I-90), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790 – Campus Universitário. CEP 87020-900 Maringá, PR, Brasil. Telefone: (44) 3011-4953. E-mail: clcardoso@uem.br

Endereço do COPEP/UEM:

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá – COPEP/UEM.

Universidade Estadual de Maringá.

Avenida Colombo, 5790. Campus Sede da UEM.

Bloco da Biblioteca Central (BCE) da UEM.

CEP 87020-900. Maringá, PR, Brasil. Telefone: (44) 3261-4444. E-mail: copep@uem.br

CAPÍTULO III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que a eficácia do passo sete na técnica de higiene das mãos (i.e., a fricção dos punhos) depende do produto utilizado e do tipo de microrganismo da flora microbiana transitória presente nos punhos.

Nossos resultados também sugerem uma limitada eficácia da antissepsia das mãos com 3 mL de álcool etílico 70% (p/p) na remoção da flora bacteriana transitória dos punhos. Por isso, um maior volume de álcool, como por exemplo, 5 mL, deve ser usado para uma adequada antissepsia das mãos, quando da utilização da técnica dos sete passos recomendada em nosso meio pelo Ministério da Saúde (Portaria 2616/98-MS).

PERSPECTIVAS FUTURAS

Atualmente encontra-se amplamente reconhecido que a promoção do uso de preparações alcoólicas na prática hospitalar aumenta a adesão à higienização das mãos dos profissionais da saúde e diminui as taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde. Entretanto, muitos aspectos da antissepsia das mãos com preparações alcoólicas, como por exemplo, a técnica, o tempo de contato e o volume do produto alcoólico aplicado nas mãos, são ainda objetos de estudos e de discussão em muitos países.

Com objetivo de contribuir para uma melhor compreensão desse assunto, acreditamos que o presente estudo deve ser continuado testando-se um maior número de microrganismos em experimentos de laboratório, complementado com ensaios clínicos para avaliar a eficácia das preparações alcoólicas nas reais condições de uso.