



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

SUELEN TEIXEIRA FARIA

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTRE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM
SAUDÁVEIS

MARINGÁ
2009

SUELEN TEIXEIRA FARIA

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENTRE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM
SAUDÁVEIS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. João Bedendo

MARINGÁ

2009

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

F224s Faria, Suelen Teixeira
Staphylococcus aureus entre estudantes de
enfermagem saudáveis / Suelen Teixeira Faria. --
Maringá, 2009.
57 f. : figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. João Bedendo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem,
2009.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. *Staphylococcus aureus*
- Prevalência de carreamento nasal - Estudantes de
Graduação - Enfermagem. I. Bedendo, João, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-
Graduação em Enfermagem. III. Título.

CDD 21.ed. 610.7369

SUELEN TEIXEIRA FARIA
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTRE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM
SAUDÁVEIS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Aprovado em: 02/12/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Bedendo (Orientador)
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho (Titular)
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Sheila de Araújo Teles (Titular)
Universidade Federal de Goiânia

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Bronharo Tognim (Suplente)
Universidade Estadual de Maringá

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

Dedico este trabalho

Aos meus pais, a minha irmã e ao meu namorado, que são os amores da minha vida, e que não mediram esforços para que este trabalho pudesse ser concluído. Sem vocês nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou meu caminho e me conduziu até aqui. Muito obrigada Senhor!

A meus pais, Terezinha e Vanderley, pelos esforços, pela dedicação e pela presença sempre constante ao meu lado, acreditando que venceria mais essa etapa em minha vida.

A minha irmã Kariliny: irmão é aquela pessoa que o tempo não apaga, que a doença não separa, que a maldade não destrói e que a saudade aproxima. A você o meu grande beijo.

A meu namorado César, que me proporcionou momentos alegres em meio a um turbilhão de incertezas, e que esteve comigo em todas as etapas para concretizar o meu sonho.

Ao prof. João Bedendo, meu orientador, presente nos momentos de angústias e de alegrias, e apesar dos obstáculos encontrados no caminho, conseguimos chegar até aqui.

A Aline Cristina Rissato Piekarski, minha companheira de luta; foi uma batalha difícil, mas vencemos, e seu apoio foi fundamental.

À Prof.^a Maria Cristina Bronharo Tognim pela amizade, pelos ensinamentos, pela compreensão e acima de tudo pelo conforto nos momentos difíceis.

Ao Prof. Benício Alves de Abreu Filho e Prof. Celso Luiz Cardoso, quanta sabedoria, quanto aprendizado, quanta amizade. Aprendi muito com vocês. Agradeço por me receberem de braços abertos.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica, pelo acolhimento, colaboração e carinho com que me receberam e pelo conhecimento compartilhado.

À Prof.^a Sueli Donizete Borelli, por sempre me acolher quando precisei.

À Prof.^a Magda Lúcia Félix de Oliveira, a grande incentivadora desse momento, uma pessoa maravilhosa, um exemplo, uma amiga.

À enfermeira Tanimária da Silva Lira Ballani e à psicóloga Ana Carolina Manna Bellasalma, agradeço pelo apoio e incentivo.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá.

A todos os alunos do curso de graduação em enfermagem, meus agradecimentos sinceros.

*Deus costuma usar a solidão
para nos ensinar sobre a convivência.
Às vezes, usa a raiva para que possamos
compreender o infinito valor da paz.
Outras vezes usa o tédio, quando quer nos mostrar
a importância da aventura e do abandono.
Deus costuma usar o silêncio para nos ensinar
sobre a responsabilidade do que dizemos.
Às vezes usa o cansaço, para que possamos
compreender o valor do despertar.
Outras vezes usa a doença, quando quer
nos mostrar a importância da saúde.
Deus costuma usar o fogo, para nos ensinar
a andar sobre a água.
Às vezes, usa a terra, para que possamos
compreender o valor do ar.
Outras vezes usa a morte, quando quer
nos mostrar a importância da vida.
Fernando Pessoa*

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTRE ESTUDANTES DE ENFERMAGEM SAUDÁVEIS

RESUMO

Staphylococcus aureus é um patógeno envolvido na etiologia de infecções hospitalares e comunitárias, encontrado como flora normal em um percentual importante da população em geral. Atualmente, diversos estudos têm demonstrado um aumento da frequência de isolamento de amostras de *S. aureus* resistentes a múltiplas drogas, particularmente a oxacilina (ORSA). Acadêmicos de Enfermagem podem ser carreadores nasais de estirpes multirresistentes, representando um fator de risco potencial na disseminação. O presente estudo tem por objetivo identificar a prevalência e o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *S. aureus* isoladas dos vestibulos nasais de estudantes de graduação em Enfermagem. A população envolveu 101 alunos do curso de graduação em Enfermagem que foram amostrados nos vestibulos nasais. As colônias suspeitas de pertencerem à *S. aureus* foram submetidas à Coloração de Gram, Teste da Coagulase em tubo e a seguir avaliadas quanto à susceptibilidade à oxacilina e à vancomicina através do Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O DNA foi extraído com CTAB e as amostras identificadas como resistentes à oxacilina foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gene *MecA*, utilizando-se como controle positivo a cepa de *S. aureus* ATCC 33591. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1,5% com brometo de etídio. Um fragmento de 154 pares de base indica a presença do gene *mecA*. A tipagem genética das amostras resistentes à oxacilina foi realizada utilizando o *primer* RW3A. Dos 101 alunos analisados, 91 (90,1%) proporcionaram o isolamento do *S. aureus*. Em 8 amostras, a CIM da oxacilina variou entre 4 µg/ml e 256 µg/ml. Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina. A presença do gene *mecA* foi identificada em todas as amostras resistentes à oxacilina pelo método da CIM. Todas as amostras resistentes à oxacilina pela CIM apresentaram resistência à penicilina, trimetropin/sulfametoxazol e à tetraciclina. A tipagem genética das oito amostras resistentes à oxacilina demonstrou uma similaridade superior a 84% para quatro amostras, sendo duas com 100%.

Palavra-chave: *Staphylococcus aureus*, Colonização, Resistência, Enfermagem.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN HEALTHY NURSING STUDENTS

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a pathogen involved in the etiology of hospital and community infections, and is also found in the normal flora of a significant percentage of the general population. Several studies have shown an increase in the isolation of multiple-drug-resistant samples of *S. aureus*, especially to oxacillin (ORSA). Nursing students may be nasal carriers of multi-resistant strains, which represents a potential risk factor for dissemination. The object of the present study is to identify the prevalence, phenotypic and genotypic profiles of *S. aureus* samples isolated from the nasal cavities of undergraduate Nursing students. The population consisted of 101 undergraduate Nursing students who had their nasal cavities sampled. Colonies suspected of belonging to *S. aureus* were subjected to Gram reaction and tube coagulase tests, and then evaluated regarding oxacillin and vancomycin susceptibility through the minimum inhibitory concentration (MIC) test. DNA was extracted through CTAB, and the samples identified as oxacillin-resistant were submitted to a polymerase chain reaction (PCR) to identify the *MecA* gene, with the ATCC 33591 strain of *S. aureus* as positive control. Electrophoresis was performed in agarose gel 1.5% with ethidium bromide. A fragment of 154 base pairs indicates the presence of the *MecA* gene. The genetic typing of oxacillin-resistant samples was performed using the RW3A primer. Among the 101 assayed students, 91 (90.1%) showed isolates of *S. aureus*. In eight samples, MIC varied between 4 µg/ml and 256 µg/ml. All samples were sensitive to vancomycin. The presence of the *MecA* gene was identified in all oxacillin-resistant samples through the MIC method. Of the eight oxacillin-resistant samples, 100% were resistant to penicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole and tetracyclin. The genetic typing of all eight oxacillin-resistant samples showed greater than 84% similarity for four samples, with two of them being 100%.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Colonization, Resistance, nursing.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTRE ESTUDIANTES DE ENFERMERÍA SALUDABLES

RESUMEN

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un patógeno implicado en la etiología de infecciones hospitalarias y comunitarias siendo también, encontrado como flora normal en un porcentaje importante de la población en general. Actualmente diversos estudios han demostrado un aumento de la frecuencia de aislamiento de muestras de *S. aureus* resistentes a múltiples drogas particularmente a la oxacilina (ORSA). Académicos de enfermería pueden ser cargadores nasales de estirpes multiresistentes representando un factor de riesgo potencial en la diseminación. El presente estudio tiene por objetivo identificar la prevalencia y el perfil fenotípico y genotípico de muestras de *S. aureus* aisladas de los vestíbulos nasales de estudiantes de graduación en enfermería. La población implicó 101 alumnos del curso de graduación en enfermería que fueron usados de muestra en los vestíbulos nasales. Las colonias sospechas de pertenecer a *S. aureus* fueron sometidas a Coloración de Gram, Test de la Coagulasa en tubo y a seguir evaluadas cuanto a susceptibilidad a la oxacilina y a la vancomicina a través del Teste de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). El DNA fue extraído con CTAB y las muestras identificadas como resistentes a la oxacilina fueron sometidas a la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificación del gen *MecA*, utilizándose como control positivo la cepa de *S. aureus* ATCC 33591. La electroforesis fue realizada en gel de agarosa a 1,5% con bromuro de etidio. Un fragmento de 154 pares de bases indica la presencia del gen *MecA*. El tipo genético de las muestras resistentes a la oxacilina fue realizado utilizando el *primer* RW3A. Entre los 101 alumnos ensayados, 91 (90,1%) proporcionaron el aislamiento del *S. aureus*. En 8 muestras el CIM varió entre 4 µg/ml y 256 µg/ml. Todas las muestras fueron sensibles a la vancomicina. La presencia del gen *MecA* fue identificada en todas las muestras resistentes a la oxacilina por el método de la CIM. Las ocho muestras resistentes a la oxacilina 100% presentaron resistencia a la penicilina, trimetropin/sulfametoxazol y a la tetraciclina. El tipo genético de las ocho muestras resistentes a la oxacilina demostró una similitud superior a 84% para cuatro muestras, siendo dos con 100%.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, Colonización, Resistencia, Enfermería.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição da prevalência de MRSA na América Latina.....	22
Figura 2 - <i>Staphylococcus aureus</i> de origem hospitalar e comunitária.....	25
Figura 3 - Resultados da técnica de PCR utilizada para detecção do gene <i>mecA</i> entre 8 amostras de <i>S. aureus</i> oxacilina resistentes isoladas de acadêmicos de graduação de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.....	40
Figura 4 - Grau de similaridade obtido pelo programa NTSYS das oito amostras de <i>S. aureus</i> oxacilina resistentes isolados de acadêmicos de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos estudantes de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.....	36
Tabela 2 – Distribuição acumulativa da concentração inibitória mínima nos diferentes anos de graduação relacionado à oxacilina, Maringá, 2008.....	37
Tabela 3 – Distribuição da resistência aos antimicrobianos dos <i>S. aureus</i> isolados de acadêmicos nos diferentes anos do curso de graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, 2008.....	38
Tabela 4 – Distribuição da resistência aos antimicrobianos das oito amostras de <i>S. aureus</i> resistentes á oxacilina isoladas de acadêmicos do curso de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, 2008.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

ORSA: *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina

HA-MRSA: *Staphylococcus aureus* hospitalar resistente à meticilina

CA-MRSA: *Staphylococcus aureus* comunitário resistente à meticilina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

CIM: Concentração inibitória mínima

Fem: *Factor essential for methicilyn resistance*

PBP: Penicillin-binding Protein

SCC*mec*: Staphylococcal Chromosomal Cassette

VISA: *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina

VRSA: *S. aureus* resistentes à vancomicina

PVL: Leucocidina de Panton Valentine

SEC: Enterotoxinas

SEH: Enterotoxinas

UEM: Universidade Estadual de Maringá

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSB: Caldo de Soja Trypticaseína

AMS: Agar Manitol Salgado

ATCC: *American Type Culture Collection*

NaCl: Cloreto de Sódio

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

AMH: Agar Mueller Hinton

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

TE: Solução de Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM

CIA: Clorofórmio Álcool Isoamílico

CTAB: Cetyl Trimethylammonium Bromide

NTSYS: Numerical Taxonomy System

COPEP: Comitê Permanente de Ética em Pesquisa

DMSO: Dimetilsulfóxido

MLST: *Multi Locus Sequence Typing*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Origem, morfologia e epidemiologia dos <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2 Histórico e mecanismo de resistência antimicrobiana dos <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.3 Carreamento dos <i>Staphylococcus aureus</i>	26
3.4 Testes antimicrobiano	26
3.5 Estudo genotípico	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Caracterização do estudo e critérios de inclusão	30
4.2 Procedimentos	30
4.2.1 Coleta de material biológico	30
4.2.2 Semeadura	31
4.2.3 Estocagem	31
4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos	32
4.3.1 Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima	32
4.3.2 Teste de disco difusão	33
4.4 Reação em cadeia da polimerase	33
4.4.1 Extração de DNA	33
4.4.2 Genotipagem	34
4.4.3 Reação de amplificação para o gene <i>mecA</i>	34
4.5 Eletroforese	35
4.6 Comitê de Ética	35
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	46
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Diferentes gêneros e espécies de micro-organismos fazem parte da microbiota normal dos seres humanos (MARTINS, 2002), entre eles o *Staphylococcus aureus*, que habita a pele e as membranas mucosas, principalmente as fossas nasais (HESHIKI *et al.*, 2002; ONANUGA, OYI e ONAOLAPO, 2005; RICARDO, 2004).

O organismo, ao albergar o *S. aureus*, pode se comportar de duas formas: na primeira ocorre o processo infeccioso, revelando-se então o caso clínico ou declarado e, na segunda, ocorre em muitos casos nos quais o organismo está colonizado, porém não apresenta nenhuma sintomatologia, conhecido genericamente como “portador são” ou assintomático. Esses podem ainda ser classificados como portadores persistentes ou permanentes (20%), portadores intermitentes ou transitórios (60%) e não portadores (20%) (KLUYTMANS, VAN BELKUM e VERBRUGH, 1997).

A colonização nasal por *S. aureus* está intimamente relacionada à colonização da superfície cutânea, tornando-se motivo de preocupação ao serem considerados os procedimentos cirúrgicos (FELIX JUNIOR, 2007; SANTOS e DARINI, 2002), e sua eliminação nas fossas nasais poderia interromper infecções de origem endógenas (MENOGOTTO e PICOLI, 2007; VON EIFF *et al.*, 2001). A colonização nasal de *S. aureus* é a principal responsável pela colonização da superfície cutânea, tornando-se motivo de preocupação ao se considerar a prevalência desses micro-organismos na população em geral e entre trabalhadores hospitalares (SANTOS *et al.*, 2007; SANTOS e DARINI, 2002).

No Brasil, estudo realizado entre mães, filhos e cuidadores saudáveis em um centro de convivência de medicina em São Paulo mostrou uma prevalência de 58,2% de portadores nasais de *S. aureus* (SANTOS e DARINI, 2002). Entre residentes de medicina de um hospital ensino do Paraná, observou-se uma prevalência de 17,68% (HESHIKI *et al.*, 2002). Estudos demonstram que não existe diferença na positividade dos *S. aureus* entre os funcionários que prestam assistência direta e os demais (SANTOS, 1987; VIEIRA e SANTOS, 2007; VOSS, 2004).

A detecção do portador nasal de *S. aureus* assintomático em ambiente hospitalar e comunitário é importante para a compreensão da epidemiologia da infecção

(CARDOSO, 2007) e para avaliar o risco para sua aquisição e transmissão (KUEHNERT *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2005).

A prevalência de *S. aureus* entre a população sadia tem sido de 40% entre a comunidade universitária; segundo estudo realizado entre estudantes universitários da área da saúde de uma Universidade Estadual do Paraná (PRATES, 2008), foi observado um percentual expressivo de cepas multirresistentes, particularmente entre os membros do *staff* hospitalar (SANTOS *et al.*, 2007).

A colonização de trabalhadores hospitalares pode variar de 30% a 70%, podendo atingir 90%, dependendo das condições ambientais, dos pacientes atendidos, do uso de antimicrobianos e da própria estrutura do hospital. Em adultos sem ligação com o ambiente hospitalar, a variação deveria se limitar entre 20% e 50% (MANDELL, BENNETT e DOLIN, 2005; SANTOS, 2000).

Menegotto e Picoli (2007), ao estudar uma população sem fatores de risco, verificaram uma prevalência de 40% para o *S. aureus* e 7,5% de resistência à oxacilina. Em sua pesquisa, os autores destacam a escassez de estudos de *S. aureus* resistente à oxacilina no Brasil.

Existem alguns fatores de risco para a colonização ou infecção pelo *S. aureus* multirresistente, entre eles o uso prolongado de antimicrobianos, a imunossupressão, as internações em unidades de terapia intensiva, as cirurgias e exposição a pacientes já colonizados (CHAMBERS, 2001; HONG e GORAN, 2006; MARTINS, 2002; RICARDO, 2004; SAIID-SALIM, MATHEMA e KREISWIRTH, 2003).

Estudantes de Enfermagem desenvolvem parte de sua formação acadêmica em ambiente hospitalar e estão propensos a adquirir e também a veicular micro-organismos, entre os quais os *S. aureus*. A identificação de portadores assintomáticos entre grupos de estudantes, em ambiente hospitalar e comunitário, é importante para se conhecer a epidemiologia da infecção estafilocócica.

Os hospitais universitários de grande porte são considerados centros de referência, e por esse motivo recebem um grande número de pacientes, incluindo casos graves que muitas vezes necessitam de unidades de terapia intensiva, facilitando assim a disseminação do *S. aureus* multirresistente (FELIX JUNIOR, 2007; LEISER, TOGNIM e BEDENDO, 2007; MOREIRA *et al.*, 1998).

Os *S. aureus* são versáteis em desenvolver resistência aos antimicrobianos, e já na década de 1942 e 1961 observou-se resistência à penicilina e oxacilina, respectivamente (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; ENRIGHT *et al.*, 2002; MAXWEL *et al.*, 1969; MENEGOTTO e PICOLI, 2007). O surgimento de amostras resistentes à penicilina, oxacilina/meticilina e à vancomicina foi inevitável, devido à grande exposição que estes micro-organismos sofreram frente aos diferentes antimicrobianos (CHAMBERS, 2001; MOURA e GIR, 2007).

A origem dos *S. aureus* comunitário resistente à meticilina (CA-MRSA) ainda é indefinida, todavia existe a hipótese de que esse micro-organismo tenha sofrido mutação ao adquirir o gene de resistência a partir de cepas de origem hospitalar (MENEGOTTO e PICOLI, 2007). Os *S. aureus* meticilino-resistentes (MRSA) inicialmente estavam restritos ao ambiente hospitalar, contudo a partir de 1990 começaram relatos de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) em indivíduos sem fatores de risco (MIMICA e MENDES, 2007).

Estudos realizados em Nova York indicaram que *S. aureus* resistentes à meticilina foram isolados em cerca de 30% das infecções hospitalares e associados a 50% das mortes (SHOPSIN *et al.*, 2000).

Shopsin *et al.* (2000) identificaram 32% de prevalência de *S. aureus* sensível à meticilina entre crianças e seus acompanhantes em um hospital dos EUA, e Hidron *et al.* (2005) detectaram, em um hospital de Atlanta, uma prevalência de 23,7% de *S. aureus*, sendo que 16,4% eram sensíveis à meticilina e 7,3% foram resistentes.

A tipagem bacteriana tem como finalidade identificar a origem e a disseminação de infecções e vários métodos podem ser utilizados, entre os quais a biotipagem, a sorotipagem, a fagotipagem e a resistotipagem. Atualmente, entretanto, os métodos mais utilizados são os genotípicos, através de algumas variações da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com a utilização de *primers* específicos (TEIXEIRA *et al.*, 2008; TENOVER *et al.*, 1994).

O gene que codifica a resistência bacteriana às drogas localiza-se no cromossomo ou em plasmídios, sendo esse DNA transmitido mais facilmente por conjugação (NEVES *et al.*, 2007). A identificação do tipo de resistência e a forma pela qual é transmitida pode ser um instrumental importante na prevenção e controle da infecção estafilocócica de origem hospitalar ou comunitária.

Para a tipagem genotípica e a identificação do gene que codifica a resistência bacteriana utiliza-se a técnica de PCR, conforme concebida por Kary Mullis, que é um método rápido, sensível e específico (ANTONINI, MENIGHIN e URASHIMA, 2004; VANNUFFEL *et al.*, 1995). Essa técnica é capaz de amplificar milhões de vezes um segmento de DNA a partir de uma única molécula, sendo extremamente útil e versátil no estudo de micro-organismos (COOKSON *et al.*, 2007; SILVA-PEREIRA, 2003).

O *primer* RW3A apresenta uma sequência repetitiva de nucleotídeos com as seguintes bases: 5' TCGCTCAAACAACGACACC 3' (DEL VECCHIO *et al.*, 1995; REINOSO *et al.*, 2007). Através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ocorre a formação de vários fragmentos, segundo Del Vecchio *et al.* (1995), podendo variar entre 3 e 12. Esses fragmentos podem ser visualizados através da eletroforese dos produtos amplificados em gel de agarose, o que possibilita a construção de um dendograma, demonstrando a similaridade entre as amostras.

O desenvolvimento da técnica de PCR para estudo de resistência bacteriana às drogas de uso clínico implica a busca de marcadores específicos. A resistência à oxacilina é codificada por genes que compõem um cassete cromossômico denominado *SCCmec*, que congrega sete genes de resistência *I*, *II*, *III*, *IV*, *V*, *VI* e *VII* (DEURENBERG e STOBBERINGH, 2008; SANTOS *et al.*, 2007). O elemento *mec IV* se encontra associado ao CA-MRSA (MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

A resistência à oxacilina é mediada por um gene chamado *mecA*, porém outros mecanismos podem estar envolvidos, tais como alteração na permeabilidade da membrana, degradação enzimática dos antimicrobianos e alteração no sítio ativo. Não obstante, a presença do gene indica que essa resistência pode ser transmitida a outras gerações através da conjugação (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009c).

Para a determinação da resistência à oxacilina e à vancomicina, o Clinical and Laboratory Standards Institute (2009c), documento M07-A8, preconiza a realização do teste de Concentração Inibitória mínima (CIM). O documento técnico não apresenta parâmetro para a aferição do tamanho do halo de inibição para vancomicina. Uma amostra só poderá ser confirmada como resistente à vancomicina após a realização do teste da concentração inibitória mínima (BROWN *et al.* 2005).

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivo identificar a prevalência, o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas dos vestíbulos nasais de estudantes de Graduação em Enfermagem para melhor compreender o papel do portador nasal na epidemiologia da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar a frequência de carreamento, o perfil fenotípico e genotípico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas do vestíbulo nasal de estudantes de Graduação em Enfermagem.

2.2. Objetivos Específicos

Verificar a prevalência de carreamento nasal de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de Graduação em Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá.

Avaliar o perfil de resistência à oxacilina e aos diferentes antimicrobianos de amostras de *Staphylococcus aureus* isolados dos vestíbulos nasais.

Comparar os resultados da resistência à oxacilina e à vancomicina obtidos através do teste de disco difusão e do teste Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Identificar o perfil genético das amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) empregando a sequência repetitiva RW3A.

Determinar a presença do gene *mecA* em amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina, através da técnica de PCR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Origem, morfologia e epidemiologia dos *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* possui 37 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de seres humanos. Três espécies de *S. aureus* apresentam maior importância clínica: o *Staphylococcus saprophyticus*, comum em infecções do trato urinário em mulheres, o *Staphylococcus epidermidis*, geralmente associado a dispositivos e aparelhos implantados, e o *Staphylococcus aureus*, capaz de provocar desde infecções cutâneas e toxinfecções alimentares até infecções graves e fatais (BRAGA *et al.*, 2009; JAWETZ, MELNICK e ADELBERG, 1998; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

Os *S. aureus* são capazes de promover processos infecciosos, tanto de origem hospitalar quanto comunitária, causados por bactérias do próprio indivíduo, de outros doentes ou de portadores saudáveis. Geralmente estão associados a infecções superficiais e discretas, mas em indivíduos imunodeprimidos se tornam graves e fatais (MARTINS, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2008; TORTORA, FUNKE e CASE, 2005).

Pela primeira vez, em 1880, os *S. aureus* foram descritos pelo cirurgião Alexandre Ogston, em secreção (pus) de abscesso cirúrgico (SANTOS *et al.*, 2007). Morfologicamente são cocos Gram e coagulase positivos, encontrados em diversas formas, desde isolados, aos pares ou agrupados, semelhante a um cacho de uva (MARTINS, 2002; SANTOS *et al.*, 2007). Fermentam a glicose com a produção de ácido em aerobiose e em anaerobiose, sendo este facultativo (KLUYTMANS; VAN BELKUM e VERBRUGH, 1997).

Os *S. aureus* tem aproximadamente entre 0,5 e 1,5 μ m de diâmetro, são imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados, pertencentes à família *Micrococcae* (JAWETZ, MELNICK e ADELBERG, 1998; SANTOS *et al.*, 2007).

Os *Staphylococcus* crescem rapidamente na maioria dos meios a 37° C, porém é em temperatura ambiente que melhor forma seu pigmento, em meio sólido apresenta-se arredondado, elevado e brilhante. As colônias geralmente possuem a cor acinzentada ou amarelo-dourado intenso, sendo de fácil identificação (JAWETZ, MELNICK e ADELBERG, 1998).

O MRSA está presente em todo o mundo, e principalmente na América Latina. De acordo com Guzmán-Blanco (2009), os dados da Pan American Health Organization e da Pan-American Association of Infectious Diseases informam que em vários países o índice ultrapassou os 40%. Na Figura 1, é possível observar a distribuição da prevalência de MRSA na América Latina.

Figura 1 - Distribuição da prevalência de MRSA na América Latina



3.2 Histórico e mecanismo de resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus*

A resistência do *S. aureus* iniciou com a introdução dos antimicrobianos. Em 1942, já eram relatadas cepas resistentes à penicilina, utilizadas há apenas dois anos,

com uma resistência de 80% a 90% em ambiente hospitalar no final de 1960 (MIMICA e MENDES, 2007). Alguns autores acreditam que a resistência à penicilina, meticilina/oxacilina e à vancomicina são consequências inevitáveis da exposição aos diversos antimicrobianos (CHAMBERS, 2001).

A produção de penicilinas semissintéticas em 1959, com a modificação na cadeia do precursor da penicilina, resultou na proteção do anel betalactâmico contra a ação hidrolítica das betalactamases. A meticilina foi a primeira penicilina sintética, contudo em 1961 surgiram as primeiras cepas resistentes (MOREIRA *et al.*, 1998; MIMICA e MENDES, 2007).

Souza, Reis e Pimenta (2008) afirmam que três mecanismos distintos são responsáveis pela resistência à meticilina: a hiperprodução de beta-lactamases, a presença de uma proteína ligadora de penicilina e as modificações na capacidade de ligação das PBPs.

Os antimicrobianos β -lactâmicos interagem com as proteínas ligadoras de penicilina, situadas nas membranas da célula e responsáveis pela biossíntese da parede celular, impedindo a formação completa da camada de peptidoglicano da parede celular. O gene *mecA* altera essas proteínas de membrana, codificando uma nova proteína de ligação denominada PBP2a com baixa afinidade por β -lactâmicos, e dois genes regulatórios, o *mecI* e o *mecRI*, constituindo o complexo cromossômico *mec* estafilocócico (*SCCmec*) (MENEGOTTO e PICOLI, 2007; NEVES *et al.*, 2007).

Existem alguns genes que auxiliam o gene *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos β -lactâmicos, denominados genes auxiliares, fatores essenciais ou genes *fem* (factor essential for methicillin resistance). Seis genes *fem* foram identificados: *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF*. O gene *femA* e o gene *mecA* estão relacionados à resistência do *S. aureus* à oxacilina/meticilina, sendo de grande importância a sua detecção. Ambos os genes podem ser detectados através da técnica de PCR (VANNUFFEL *et al.*, 1995).

Estudo realizado apontou sete tipos de cassetes cromossômicos estafilocócicos relacionados à meticilina, sendo eles: *SCCmec I*, *II*, *III*, *IV*, *V*, *VI* e *VII* (SANTOS *et al.*, 2007), sendo o elemento *mec IV* associado ao CA-MRSA (MENEGOTTO e PICOLI, 2007). Higuchi *et al.* (2008) e Deurenberg e Stobberingh (2008) assinalam que, além do elemento *IV*, os elementos *V* e *VII* também estão associados ao CA-MRSA, os

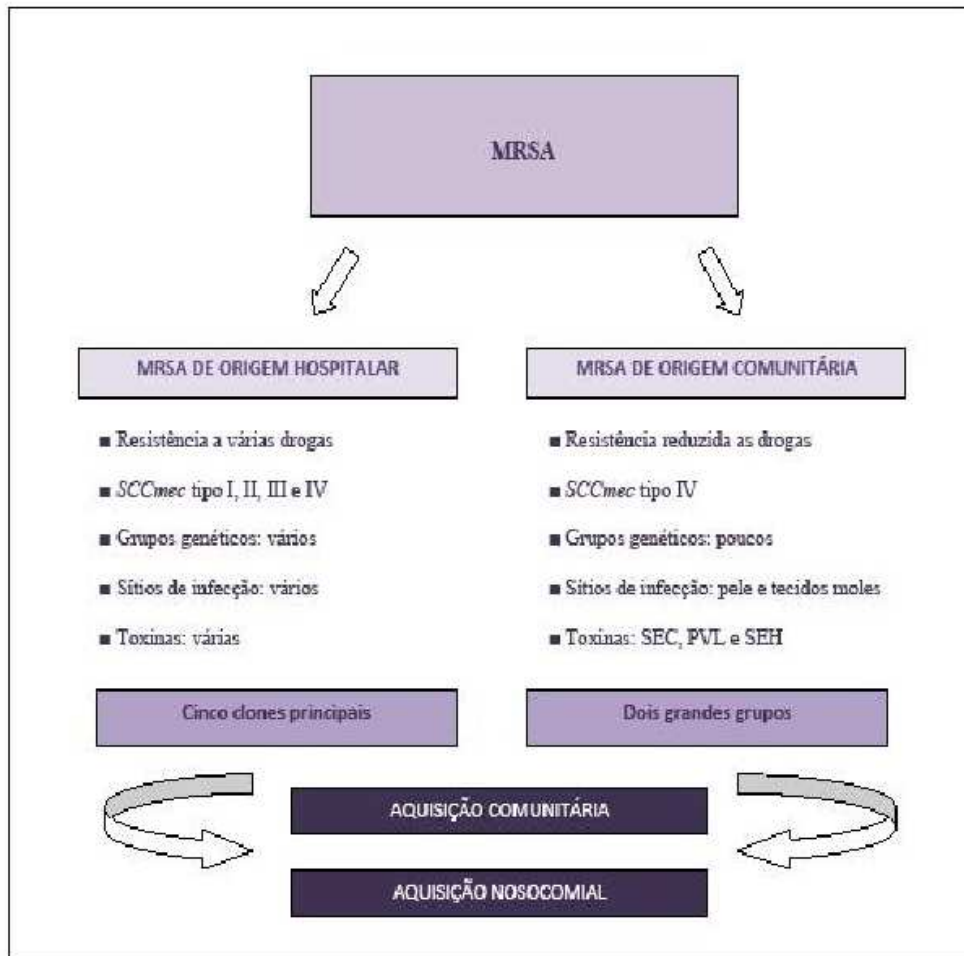
elementos *I*, *IV*, *V*, *VI* e *VII*, estão associados à resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, e os elementos *II* e *III* associados à resistência de múltiplas drogas.

Os *S. aureus* meticilino-resistentes (MRSA), no início, estavam presentes apenas em ambientes hospitalares, mas a partir de 1990 começaram relatos de MRSA associados à comunidade (CA-MRSA) em indivíduos sem fatores de risco (MIMICA e MENDES, 2007).

Existem outras enzimas e toxinas produzidas pelo *S. aureus* que participam dos mecanismos de patogenicidade e de resistência (Figura 2). As toxinas induzem uma resposta imune diferenciada para cada hospedeiro, determinando assim o grau de severidade da infecção (SANTOS *et al.*, 2007).

Saiid-Salim, Mathema e Kreiswirth (2003) pontuam que o *S. aureus* de origem hospitalar (HA-MRSA) apresenta algumas características que o diferencia do *S. aureus* de origem comunitária (CA-MRSA). O primeiro apresenta resistência a várias drogas, estão associados à produção de várias toxinas e envolvidos em infecções graves localizadas em vários sítios. O CA-MRSA ao contrário, possui uma resistência reduzida aos antimicrobianos, com a produção de poucas toxinas, e geralmente encontram-se envolvidos em infecções relacionados à pele e tecidos moles (Figura 2).

Figura 2 - *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar e comunitária



Fonte: SAIID-SALIM, MATHEMA e KREISWIRTH, 2003.

A susceptibilidade reduzida dos *S. aureus* a vancomicina (VISA) surgiu em 1996 no Japão, e em 2002, nos EUA, a primeira cepa resistente à vancomicina (VRSA) (MIMICA e MENDES, 2007; SAIID-SALIM, MATHEMA, KREISWIRTH, 2003; SANTOS *et al.*, 2007). No Brasil, em 2000, foi encontrada a primeira cepa resistente à vancomicina, em um hospital de Queimados no Rio de Janeiro (SANTOS *et al.*, 2007).

Poucos estudos têm sido realizados com relação à resistência do *S. aureus* à vancomicina (FRIDKIN *et al.*, 2003). Acredita-se que o mecanismo de resistência do *S. aureus* a este antimicrobiano pode estar relacionado ao envolvimento do gene Van, que determina a resistência a essa droga em *Enterococcus* sp com a transmissão por meio de

plasmídios, ou pelo espessamento da parede celular, com a produção de maiores quantidades de peptidoglicano e de monômeros de mureína (CUI *et al.*, 2006; SAIID-SALIM, MATHEMA e KREISWIRTH, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

3.3 Carreamento dos *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* está presente na pele e mucosas dos seres humanos, principalmente em fossas nasais. Indivíduos que carregam o *S. aureus* e não apresentam sintomatologia são genericamente conhecidos como “portadores são ou assintomáticos”, sendo considerados uma das principais fontes de transmissão tanto da infecção nosocomial quanto da comunidade (LU *et al.*, 2005; ONONUGA, OYI e ONAOLAPO, 2005; SANTOS e DARINI, 2002).

Observa-se que os principais sítios de colonização do *S. aureus* são o vestíbulo nasal, com cerca de 35%, seguido pela região perineal, com cerca de 20%; outras regiões também podem albergar esse micro-organismo, como as regiões umbilical, axilar e interpododáctila, que, juntas, apresentam entre 5% a 10% (CAVALCANTE *et al.*, 2006).

Com o decorrer dos anos, a partir do nascimento, há uma diminuição da prevalência nasal de *S. aureus*. Entretanto entre os recém-nascidos, até o décimo quinto dia de vida, essa taxa pode ser de até 100% (CARDOSO, 2007; CHAMBERS, 2001).

Indivíduo colonizado é uma importante fonte de transmissão de *S. aureus*, sobretudo para familiares, amigos e contactantes. Profissionais de saúde, por conviverem em ambiente hospitalar, podem albergar e disseminar estirpes multirresistentes (CHAMBERS, 2001), agravando a morbimortalidade por doenças estafilocócicas.

3.4 Testes antimicrobianos

Os testes de sensibilidade são indicados, principalmente, quando se acredita que o micro-organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos. Vários são os mecanismos de resistência: a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009c).

Existem vários testes para detecção de resistência aos diversos antimicrobianos, entre eles o teste de disco difusão, o teste de ágar diluição em meio sólido ou líquido para detecção da concentração inibitória mínima (CIM) e os E-test. Este é uma técnica nova, prática e rápida que não necessita de equipamentos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009c; FELIX JUNIOR, 2007; ETM, 2009).

Os métodos de diluição em caldo ou ágar, assim como o teste de disco difusão são igualmente aceitos para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009c).

Diversos são os antimicrobianos preconizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2009b) para a realização do Teste de Disco Difusão para *S. aureus*. Para sua realização, existe a necessidade de protocolos, padronizações e, particularmente, medidas do diâmetro do halo de inibição.

A utilização do E-test apresenta grande importância clínica, pois norteia o tratamento dos pacientes. Esse recurso consiste em uma fita estreita de material plástico que contém um gradiente com concentrações crescentes de antibiótico, que é colocada em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton de maneira semelhante ao teste de difusão em disco (FERREIRA, 1996).

A fita de E-test é utilizada na mesma temperatura, aplicada aos testes de difusão em discos, e sua principal vantagem é fornecer o valor da concentração inibitória mínima diretamente (ETM, 2009).

3.5 Estudo genotípico

Vários são os métodos genotípicos utilizados tanto para localização de genes específicos quanto para a realização de tipagem genética, os quais baseiam-se na análise da estrutura genética de um organismo, sendo menos sujeitos à variação natural, apesar de serem afetados por inserções ou deleções de DNA no cromossomo, por ganho ou perda de DNA extra cromossômico ou por mutações ao acaso que podem criar ou eliminar sítios de restrição para as endonucleases (TENOVER, 1997).

Com a tipagem genética é possível localizar amostras bacterianas geneticamente relacionadas que são indistintas umas das outras, ou amostras tão similares que se

presume serem derivadas de um ancestral comum, denominadas clones (TENOVER, 1997).

A técnica de PCR envolve basicamente um ciclo com três etapas: a desnaturação, o anelamento e a extensão. A primeira etapa ocorre mediante a elevação da temperatura e o anelamento através da queda da temperatura rapidamente, de 92°C ou 95°C a 35°C ou 60°C, dependendo do *primer* utilizado. A extensão ocorre a 72°C com a adição de nucleotídeos, utilizando como molde a sequência alvo (ANTONINI, MENEGHIN e URASHIMA, 2004).

O ciclo é repetido por várias vezes, na medida em que a quantidade de DNA da sequência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica, de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, produz-se mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência-alvo (ANTONINI, MENEGHIN e URASHIMA, 2004).

A técnica de PCR permite iniciar com quantidades mínimas de DNA e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse. A PCR apresenta uma facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade, o que torna essa técnica particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer micro-organismo vivo (ANTONINI, MENEGHIN e URASHIMA, 2004).

Os *primers* utilizados nas reações de PCR são sintetizados artificialmente, de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região-alvo (ANTONINI, MENEGHIN e URASHIMA, 2004). Existem inúmeros *primers* de sequência repetitiva que podem ser utilizados: RW3A, IS-256, REP-PCR.

O sequenciamento de DNA é uma técnica utilizada para tipagem de micro-organismos, com vantagens na velocidade, dados precisos e simplicidade na criação de base de dados em larga escala, entre elas se encontra a técnica de “Multilocus Sequence Typing” (MLST) um método molecular com alto poder discriminatório, que caracteriza isolados bacterianos com base nas sequências de fragmentos com aproximadamente 450 pb, de sete genes conservados (ENRIGHT *et al.*, 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Caracterização do estudo

Este estudo, do tipo transversal, foi desenvolvido na Universidade Estadual de Maringá (UEM), que oferece dezenas de cursos de graduação e pós-graduação. Destaca-se que o curso de Enfermagem tem duração de quatro anos, e aproximadamente 40 alunos por ano (UEM, 2009).

O curso de Graduação em Enfermagem possui 40 alunos por turma, e a população sujeito desta pesquisa foi composta por 40 acadêmicos do primeiro ano de Enfermagem, 32 acadêmicos do segundo ano e 29 acadêmicos do terceiro ano, totalizando 101 alunos.

O estudo foi realizado entre maio de 2008 e maio de 2009, utilizando para a análise dos dados o método de proporções e frequências simples.

As amostras foram coletadas em períodos diferentes para cada ano. Os alunos do primeiro ano de graduação foram submetidos a uma coleta antes de iniciarem o Estágio Curricular em ambiente hospitalar. Os demais alunos, no momento da coleta, já haviam iniciado Estágio em ambiente hospitalar.

Participaram da pesquisa os acadêmicos de Enfermagem que concordaram em participar e que no momento da coleta não apresentavam sinais e sintomas clínicos de infecção, como febre, tosse produtiva e coriza.

Os acadêmicos foram orientados quanto aos objetivos da pesquisa, e sendo esclarecidos de suas dúvidas referentes ao anonimato das informações, para posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e em seguida foram convidados a responder um questionário estruturado (Anexo 2), numerado segundo a ordem de entrega.

4.2 Procedimentos

4.2.1. Coleta de material biológico

O material foi obtido através da fricção de um *swab* estéril em ambos os vestibulos nasais, e posteriormente depositado em tubos contendo caldo de Soja

Tripticaseína (TSB) enriquecido com 6,5% de Cloreto de Sódio, em estufa a 37° C por 24 horas.

4.2.2 Semeadura

Após o armazenamento por 24 horas em estufa a 37° C, o material foi semeado na superfície de placas de Petri (90X15 mm) contendo Agar Manitol Salgado (AMS), (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA), com e sem oxacilina, em uma concentração de 4 µg/ml e incubado por 24-48 horas a 37° C. Em todas as fases da semeadura foram utilizadas amostras controle de *S. aureus* da *American Type Culture Collection* (ATCC), sendo uma amostra sensível (ATCC 25923) e uma resistente à oxacilina (ATCC 43300).

Colônias suspeitas de pertencerem a *S. aureus* foram submetidas ao teste de Coloração de Gram (DIAS FILHO *et al.*, 2001) e aquelas identificadas como cocos Gram positivo agrupados em cachos de uva foram transferidas para um caldo com TSB adicionado 6,5% de NaCl. Após seis horas de incubação foi realizado o Teste de Coagulase em tubo (KONEMAN *et al.* 2008).

Para o teste da coagulase utilizou-se plasma de coelho liofilizado (Coagulo-Plasma LB, Laborclin produtos para laboratório Ltda., Pinhais Paraná, Brasil), considerado positivo após formação de um coágulo, cujas leituras foram realizadas em 30 minutos, quatro horas e 12 horas (KONEMAN, *et al.*, 2008).

4.2.3 Estocagem

Após os testes de identificação, as colônias foram semeadas em placas contendo Agar Mueller Hinton (AMH) (Becton Dicksenson and Company, BD Diagnostic Systems, USA) e incubadas por 48 horas em estufa a 37° C, e em seguida por 24 h em temperatura ambiente. Essas placas, posteriormente, foram raspadas com alças e as colônias estocadas em um meio TSB com glicerol (20%), e congeladas em freezer a – 20° C para estudos posteriores.

4.3 Suscetibilidade aos antimicrobianos

4.3.1 Teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O CIM foi realizado para a oxacilina e para a vancomicina, através do método de agar diluição, utilizando-se de diferentes concentrações de antimicrobianos, iniciando pela metade da menor concentração da cepa padrão utilizada (ATCC 29213). Um controle positivo também foi utilizado, a ATCC 33591.

Para a preparação do antimicrobiano foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\underline{\text{Peso (mg)} = \text{Vol. do solvente (ml)} \times \text{Conc. Da solução estoque (mg/ml)}}$$

$$\text{Potência do antibiótico (\mu\text{g/ ml})}$$

A solução estoque do antimicrobiano foi esterilizada por filtração em membrana Millipore® de 0,22 μm de diâmetro e mantida resfriada até diluição. As concentrações testadas iniciaram se em 256 μg/ml para a oxacilina e 32 μg/ml para a vancomicina.

O teste foi realizado em Agar Muller-Hinton, preparado em quantidade suficiente para se realizar todas as diluições dos antimicrobianos. Em seguida foi aliquotado 19 ml em cada tubo, esterilizados em autoclave, mantidos em banho-maria até atingirem a temperatura de aproximadamente 50° C, para que não ocorresse a degradação do antimicrobiano.

Após o resfriamento dos tubos contendo AMH, a eles foram acrescentados 1 ml do antimicrobiano (já anteriormente diluído nas concentrações utilizadas), totalizando 20 ml; em seguida, os tubos foram homogeneizados e distribuídos em placas de Petri.

As amostras analisadas foram anteriormente submetidas à incubação por 24 horas em AMH. Para o preparo do inóculo foi utilizada como referência uma suspensão de concentração referente ao tubo 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), em seguida retirados 100 μl dessa suspensão e colocados em tubos contendo 900 μl de caldo Mueller-Hinton, e desses distribuídos 200 μl de cada suspensão bacteriana em placas de Elisa de 96 poços.

Para a aplicação das amostras nas placas de AMH, contendo as diferentes concentrações do antimicrobiano, foi utilizado um aplicador de 28 pinos. A viabilidade

das amostras foi testada inoculando em placa-controle, sem antimicrobiano. Posteriormente, inoculada nas placas contendo os antimicrobianos, na sequência crescente das concentrações.

No final da série, as amostras foram novamente inoculadas em uma placa controle sem antimicrobiano, para se avaliar a contaminação durante o procedimento. Após a secagem, estas foram incubadas a 37° C por 24 horas, e sua leitura comparada àqueles propostos pelo documento M07-A8 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009b).

4.3.2 Teste de disco difusão

A realização deste teste foi baseada nas recomendações do documento M07-A8 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2009b), que preconiza as seguintes drogas: penicilina G 10U, oxacilina 1 µg, cefoxitina 30 µg, eritromicina 15 µg, clindamicina 2 µg, trimetropina sulfametoxazol 1,25/23,75 µg, vancomicina 30 µg, telitromicina 15 µg, linezolida 30 µg, tetraciclina 30 µg, doxiciclina 30 µg, rifampicina 5 µg, gentamicina 10 µg, ofloxacina 5 µg e teicoplanina 30 µg.

Inicialmente, preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente à escala 0,5 de MacFarland, e inoculada na superfície de placas de ágar Muller-Hinton, em seguida, depositados os discos com uma pinça estéril. Utilizou-se para controle a cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

As placas foram incubadas a 37° C durante 24 horas, e em seguida comparados os diâmetros dos halos com os descritos na Tabela 2C, M2-A9, do Clinical and Laboratory Standards Institute (2009b).

4.4 Reação em cadeia da polimerase

4.4.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras de *S. aureus*, foi utilizada metodologia proposta por Doyle e Doyle (1987), e as amostras foram plaqueadas em AMH, após um crescimento de 24-48 horas, as colônias foram transferidas para *eppendorf* contendo Tris-EDTA (TE) e centrifugadas a 8000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* suspenso em 600 µl de Cetyl Trimethylammonium Bromide (CTAB) e 40 µl de de CIA,

em seguida aquecidos em banho-maria a 65°C por minutos para a lise da parede bacteriana.

Posteriormente, foi acrescentado 800 µl de CIA e centrifugado a 12000 rpm por 5 min. Cerca de 600 µl do sobrenadante foram transferidos para um outro *ependorf*, com o mesmo volume de isopropanol gelado, e deixado em freezer a -20° C *overnight* para a precipitação do DNA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos, a uma temperatura de 4° C. Eliminou-se o sobrenadante, sendo realizada nova centrifugação após acrescentar 200 µl de etanol 70%. Eliminado o etanol e após serem secados os tubos de *ependorf* foram acrescentados 200 µl de TE e armazenados em freezer a -20° C. A presença do DNA genômico foi detectada em gel de eletroforese a 2% por 40 minutos a 100 volts.

4.4.2 Genotipagem

A tipagem genética foi realizada através da técnica de PCR, com a utilização dos oligonucleotídeos (*primers*) RW3A (5' TCGCTCAAACAACGACACC 3') conforme metodologia proposta por DEL VECCHIO *et al.* (1995), Van Belkun *et al.* (1995) e Reinoso *et al.* (2007), com algumas alterações.

Para a reação com 25 µl foram utilizados como reagentes 9,35 µl de água Milli Q estéril, 2,5 µl de Tampão 10X, 0,4 µl de Taq polimerase 5U/L, 3,0 µl de dNTP 200 µM, 3,0 µl de Cloreto de Magnésio, 2,25 µl de DMSO, 1,5 µl de primer a 50 pmol, e 3,0 µl de DNA. As reações foram realizadas em termociclador com a seguinte ciclagem: 94° C por 5 minutos, 40 ciclos de: 93° C por 1 minuto, 37° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, e por fim, 72 °C por 8 minutos, permanecendo a 4° posteriormente.

4.4.3 Reação de amplificação para o gene *mecA*

As amostras de *S. aureus* identificadas como resistentes à oxacilina foram submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gene *Mec A*. Foram utilizados os seguintes *primers*: MRS1 5' TAGAAATGACTCCG 3' e MRS2 5' TTGCGATCAATGTTACCGTAG 3'. A reação foi realizada conforme metodologia proposta por DEL VECCHIO *et al.* (1995) e Siripommongcolchain *et al.* (2002), com algumas alterações.

Para a reação com 25 µl foram utilizados como reagentes: 12,1 µl de água Milli Q estéril, 2,5 µl de Tampão 10X, 0,4 µl de Taq polimerase 5U/L, 1,5 µl de dNTP 200 µM, 1,5 µl de Cloreto de Magnésio, 1,5 µl de cada primer a 50 pmol, e 3,0 µl de DNA. As reações foram realizadas em termociclador com a seguinte ciclagem: 95° C por 10 minutos, 30 ciclos de: 95° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos, 72° C por 1 minuto, e por fim, 72° C por 10 minutos, como controle foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 33591, por ser resistente à oxacilina.

4.5 Eletroforese

A eletroforese dos produtos amplificados foram realizadas em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio, a 90 volts, por 3 horas para a tipagem genética, e por 1 hora para a visualização de um fragmento de 154 pares de bases (DEL VECCHIO *et al.*, 1995), que indica a presença do gene *MecA*. A análise dos padrões de bandas na tipagem foi realizada visualmente e o grau de similaridade entre as amostras foi determinado através do programa NTSYS que proporciona o dendograma.

4.6 Comitê de Ética

Para a realização desta pesquisa, foram respeitados todos os preceitos contidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, que disciplina as pesquisas com Seres Humanos. O presente Projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP) da UEM, sob o parecer 536/2008 (BRASIL, 1996) (Anexo 3).

5. RESULTADOS

Excluído: --Quebra de página--

Dentre as 101 amostras coletadas, verificou-se uma positividade de 90,1% (91/101) para o *S. aureus*. Houve uma predominância do sexo feminino (94,5%), e a idade variou entre 17 e 33 anos, com 61,5% entre 17 e 20 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Características dos estudantes de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008

Características	N	%
-----------------	---	---

Sexo		
Feminino	86	94,5
Masculino	05	5,5
Idade		
Até 20 anos	56	61,5
Entre 21 e 25 anos	25	27,5
Acima de 25 anos	08	8,8
Não informado	02	2,2

A distribuição da frequência segundo os anos de graduação mostrou que no primeiro ano 100% (40/40) dos acadêmicos eram portadores; no segundo, foram 84,4% (27/32), e no terceiro 82,8% (24/29).

Todas as amostras foram sensíveis à vancomicina, sendo que o CIM variou entre 0,5 µg/ml e 2 µg/ml.

Foi possível observar que 87,5% das amostras resistentes à oxacilina apresentaram a CIM em relação à vancomicina de 2µg/ml, e apenas uma apresentou a CIM de 1 µg/ml.

Em relação à oxacilina, oito amostras foram resistentes pelo teste de Agar diluição para determinação da CIM. A Tabela 2 apresenta a distribuição acumulativa da CIM para oxacilina nos diferentes anos da graduação, demonstrando um aumento da concentração com o decorrer dos anos de graduação na medida em que ocorria maior exposição ao ambiente hospitalar.

Tabela 2 – Distribuição acumulativa da concentração inibitória mínima nos diferentes anos de graduação relacionado à oxacilina, Maringá, 2008

µg/ml	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	CIM ₅₀	CIM ₉₀	Total
1º ano	10	18	05	03	02	-	-	-	01	-	-	01	0,25	01	40
2º ano	05	15	01	04	01	01	-	-	-	-	-	-	0,25	01	27
3º ano	-	11	06	02	-	01	01	-	-	03	-	-	0,5	64	24
Total	15	44	12	09	03	02	01	-	01	03	-	01	0,25	02	91

CIM₅₀: valor da concentração inibitória mínima em que se localizam cinquenta por cento das amostras

CIM₉₀: valor da concentração inibitória mínima em que se localizam noventa por cento das amostras

Com relação ao antibiograma, observou-se um aumento da resistência bacteriana com o decorrer dos anos de graduação. Mesmo sendo amostras oriundas da comunidade, houve amplo espectro de resistência e alto percentual de amostras

resistentes às diversas drogas, especialmente a penicilina, telitromicina e a eritromicina, que ultrapassa os 80%. A Tabela 3 mostra a distribuição da resistência aos antimicrobianos dos *S. aureus* isolados de acadêmicos de Enfermagem nos diferentes anos do curso de Graduação da Universidade Estadual de Maringá, 2008.

Destacou-se a alta prevalência de amostras resistentes de *S. aureus* entre alunos do primeiro ano do curso, que são aqueles que tiveram pouca exposição ao ambiente hospitalar. O percentual de resistência à cefoxitina (62,2%) e teicoplanina (5%) e também a várias outras drogas entre os alunos do primeiro ano foi superior àqueles obtidos para os demais grupos.

Das 12 amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina pelo método de disco difusão, oito foram confirmadas pelo método de Agar diluição para determinação da CIM, três amostras apresentaram um CIM próximo ao ponto de corte de 4 µg/ml, e apenas uma amostra apresentou um CIM de 0,25 µg/ml.

Não foram identificadas amostras de *S. aureus* resistentes à vancomicina e linezolide através do teste de disco difusão. O documento M07-A8 do CLSI (2009), que preconiza diâmetro dos halos de resistência e sensibilidade para os diferentes antimicrobianos, não determina para a vancomicina e para o linezolide com qual diâmetro as amostras poderiam ser consideradas resistentes.

Tabela 3 – Distribuição da resistência aos antimicrobianos dos *S. aureus* isolados de acadêmicos de Enfermagem nos diferentes anos do curso de graduação da Universidade Estadual de Maringá, 2008

Antimicrobianos	1º ano	2º ano	3º ano	Total
Penicilina	33/40 (82,2)	26/27 (92,6)	24/24 (100)	80/91 (87,9)
Oxacilina	4/40 (10,0)	2/27 (7,4)	6/24 (25,0)	12/91 (13,2)
Cefoxetina	25/40 (62,2)	8/27 (29,6)	6/24 (25,0)	39/91 (42,9)
Eritromicina	26/40 (65,0)	26/27 (96,3)	23/24 (95,8)	75/91 (82,4)
Clindamicina	15/40 (37,5)	21/27 (77,8)	19/24 (79,2)	55/91 (60,4)
Trimetropin/sulfametoxazol	24/40 (60,0)	23/27 (85,2)	18/24 (75,0)	65/91 (71,4)
Vancomicina	----	----	----	----
Telitromicina	37/40 (92,5)	26/27 (96,3)	23/24 (95,8)	86/91 (94,5)
Linezolide	----	----	----	----

Tetraciclina	22/40 (55,0)	20/27 (74,1)	18/24 (75,0)	60/91 (65,9)
Doxiciclina	16/40 (40,0)	15/27 (55,6)	12/24 (50,0)	43/91 (47,3)
Rifampicina	17/40 (42,5)	13/27 (48,1)	11/24 (45,8)	41/91 (45,1)
Gentamicina	4/40 (10,0)	15/27 (55,6)	13/24 (54,2)	32/91 (35,2)
Ofloxacina	25/40 (62,5)	18/27 (66,7)	13/24 (54,2)	56/91 (61,5)
Teicoplanina	2/40 (5,0)	0	0	2/91 (2,2)

Entre as oito amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina pelo CIM, 100% (8/8) apresentaram resistência à penicilina, ao trimetropim e à tetraciclina; 87,5% (7/8) resistência à eritromicina e à telitromicina, e 75% (6/8) resistência à clindamicina e à doxiciclina. Uma das amostras apresentou resistência a quase todas as drogas, sendo sensível apenas à teicoplanina e à gentamicina. A Tabela 4 mostra a distribuição da resistência aos antimicrobianos das oito amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina isoladas de acadêmicos do Curso de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, 2008.

O método de disco difusão apresentou 12 amostras resistentes à oxacilina, sendo que apenas oito tiveram essa resistência confirmada pelo teste de CIM. Comparando-se os dois métodos, constatou-se que das quatro amostras não confirmadas pelo teste de CIM três estavam próximas do ponto de corte para a resistência.

Tabela 4 – Distribuição da resistência aos antimicrobianos das oito amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina isoladas de acadêmicos do Curso de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, 2008

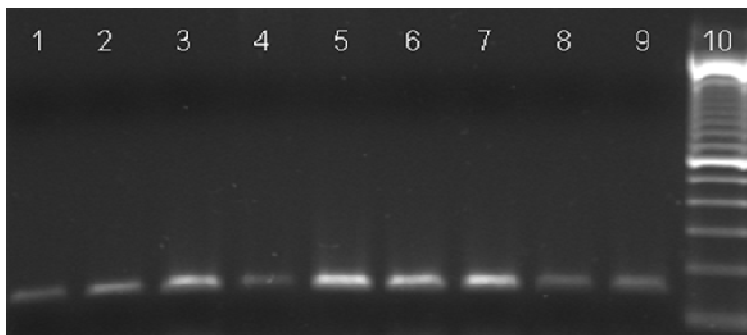
Amostras	PEN	CEF	ERI	CLI	TRI	TEL	LIN	TET	DOX	RIF	GEN	OFL	TEI
18	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S
34	R	S	S	S	R	I	S	R	I	S	I	R	S
61	R	R	R	R	R	R	-	R	R	S	R	S	S
82	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	S	R	S
87	R	R	R	S	R	R	-	R	R	S	S	S	I
90	R	S	R	R	R	R	-	R	R	S	S	S	I
91	R	R	R	R	R	R	-	R	R	S	R	S	S
94	R	S	R	R	R	R	-	R	S	R	R	R	S

R: resistente; S: sensível; I: intermediário; PEN: penicilina; CEF: cefoxetina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; TRI: trimetropin/sulfametoxazol; VAN: vancomicina; TEL: telitromicina; LIN: linezolida; TET: tetraciclina; DOX: doxiciclina; RIF: rifampicina; GEN: gentamicina; OFL: ofloxacina; TEI: teicoplanina.

As amostras resistentes à oxacilina pelo método do CIM foram submetidas à técnica de PCR e todas apresentaram o gene *MecA*. Duas amostras foram isoladas de acadêmicos do primeiro ano; uma foi procedente de acadêmico do segundo ano e cinco de acadêmico do terceiro. A Figura 3 indica os resultados da técnica de PCR utilizada para detecção do gene *MecA* entre oito amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes isoladas de acadêmicos de graduação de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

As amostras de *S. aureus* resistentes à oxacilina foram submetidas à tipagem genética através da técnica de PCR, utilizando o *primer* RW3A. Os resultados foram inseridos no programa Numerical Taxonomy System (Exeter Software) e o dendograma apontou que, das oito amostras, quatro tinham um grau de similaridade superior a 84% e duas tiveram similaridade de 100%. Na Figura 4, visualiza-se o grau de similaridade entre as oito amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes isolados de acadêmicos de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

Figura 3 - Resultados da técnica de PCR utilizada para detecção do gene *mecA* entre 8 amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes isoladas de acadêmicos de graduação de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná



Canaleta 10: marcador de peso molecular (100pb DNA ladder, Invitrogen); canaletas 9: controle positivo ATCC 33591; canaletas 8,7,6,5,4,3,2,1: amostras de *S. aureus* isoladas dos estudantes de graduação em enfermagem.

As duas amostras de *S. aureus* com similaridade de 100% foram isoladas de alunos do terceiro ano de Graduação em Enfermagem. Com relação à CIM da oxacilina, uma apresentou 64 µg/ml e outra 8 µg/ml. As outras duas amostras com similaridade superior a 84%, uma pertence a um aluno do terceiro ano e outra a um aluno do primeiro ano de graduação, com CIM de 4 µg/ml e 256 µg/ml respectivamente.

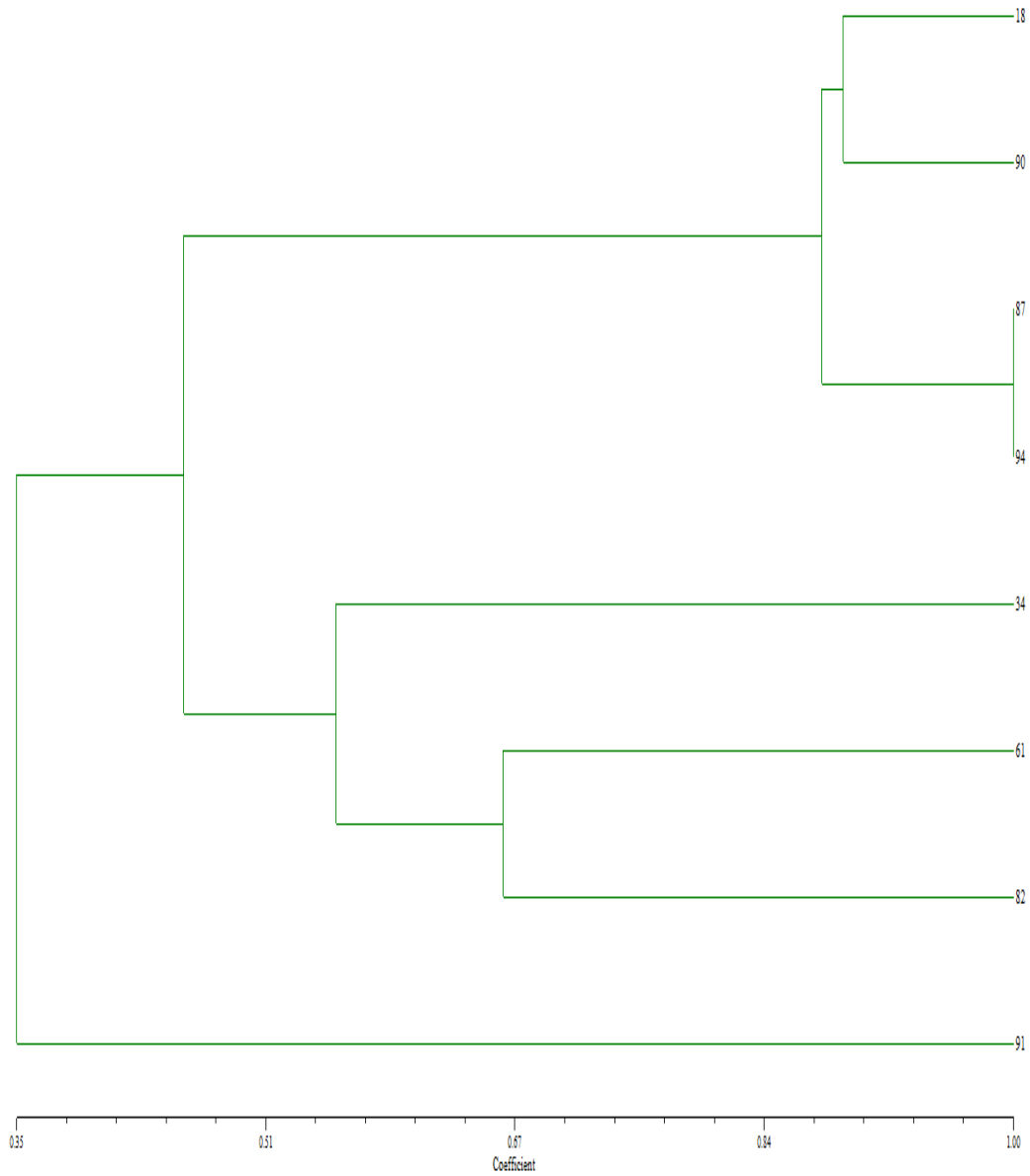


Figura 4 - Grau de similaridade obtido pelo programa NTSYS das oito amostras de *S. aureus* oxacilina resistentes isolados de acadêmicos de Enfermagem da Universidade Estadual de Maringá, Paraná

6. DISCUSSÃO

O Curso de Enfermagem apresenta um perfil de alunos característico, composto principalmente pelo sexo feminino e por uma população jovem. Os alunos de Enfermagem nas universidades públicas com faixa etária entre 17 e 19 anos representam uma clientela de 48% (SPÍNDOLA, MARTINS e FRANCISCO, 2008).

As infecções nosocomiais por *S. aureus* são de grande relevância, particularmente quando essas infecções têm os profissionais de saúde como os potenciais veiculadores, e poucos estudos têm sido desenvolvidos a esse respeito no Brasil (PALOS, 2006).

Estudo realizado em Goiás em um hospital-escola, entre 2000 e 2001, verificou que 60,2% dos casos de infecção hospitalar era provocada por MRSA (GUILARDE *et al.*, 2006).

O *S. aureus* está presente na pele e mucosas dos seres humanos, sobretudo nas fossas nasais. Indivíduos que albergam *S. aureus* e não apresentam sintomatologia são genericamente conhecidos como “portador são” e considerados uma das principais fontes de transmissão da infecção tanto nosocomial quanto comunitária (LU *et al.*, 2005; ONONUGA, OYI e ONAOLAPO, 2005; SANTOS e DARINI, 2002).

Em se tratando de portador assintomático, especificamente o estudante, durante a prática acadêmica hospitalar, é difícil a aplicação de medidas de prevenção e controle, devido, principalmente, à proximidade física entre o prestador da assistência e o paciente (SANTOS e DARINI, 2002).

A prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* entre estudantes de Enfermagem investigados neste estudo foi de 90,1%, configurando-se como alta em

consonância com alguns autores, que relatam que entre grupos de indivíduos que trabalham em ambiente hospitalar essa taxa geralmente varia entre 30% e 70%, podendo atingir até 90% (MANDELL, BENNETT e DOLIN, 2005; SANTOS, 2000).

A utilização de TSB enriquecido com NaCl para cultivo inicial incrementa o isolamento de *S. aureus*, conforme já demonstrado em outros estudos (CARDOSO, 2007; COOKSON, WEBSTER e PHILIPS, 1987; SAUTTER, BROWN e MATTMAN, 1988).

Alguns autores afirmam que tanto os profissionais de saúde que prestam assistência direta aos pacientes quanto os funcionários administrativos apresentam uma positividade semelhante para os *S. aureus* (SANTOS, 1987; VOSS, 2004). Palos (2006) obteve uma prevalência de 84,7% entre profissionais e 9,7% de resistência à oxacilina.

A distribuição da frequência de carregamento nasal de *S. aureus*, de acordo com a periodicidade do curso, indicou que no primeiro ano 100% (40/40) eram portadores; no segundo, foram 84,4% (27/32); no terceiro, 82,8% (24/29). Esperava-se que a taxa de carregamento nasal entre alunos do primeiro ano do curso em relação aos demais fosse menor, pois além de serem procedentes da comunidade, não mantêm Estágio em hospitais e unidades básicas de saúde. Essa expectativa, contudo, não se confirmou.

As amostras de *S. aureus* isoladas de estudantes de graduação saudáveis foram, inicialmente, avaliadas quanto à susceptibilidade à oxacilina e à vancomicina, através de método Agar difusão para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O antibiograma foi realizado pelo método de disco difusão, conforme recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (2009a).

Entre as 91 amostras de *S. aureus* isoladas, oito (8,8%) se mostraram resistentes à oxacilina e a faixa de crescimento bacteriano se deu entre 4 µg/ml e 256 µg/ml. Esse percentual de resistência é expressivo em se tratando de indivíduos assintomáticos, porque a oxacilina é um importante marcador de resistência para outros antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas (MANDELL, BENNETT e DOLIN, 2005).

Nesse estudo, foi possível observar um aumento da resistência dos *S. aureus* à oxacilina no decorrer dos anos de graduação, demonstrando a íntima relação existente entre a exposição do indivíduo ao ambiente hospitalar, aos diferentes antimicrobianos lá utilizados e à flora nasal de *S. aureus*. Os alunos do terceiro ano de Enfermagem já

estiveram presente nesse ambiente por dois anos, o que justifica em parte a diferença na resistência em relação aos demais anos de graduação.

Com relação ao *S. aureus* resistente à oxacilina, Huang *et al.* (2005) verificaram uma prevalência de 1,9% entre estudantes e Wang *et al.* (2004) obtiveram uma positividade de 8,3% entre profissionais. Taxas importantes de resistência à oxacilina entre indivíduos assintomáticos da comunidade também têm sido observadas por alguns autores (CHARLEBOIS *et al.*, 2002; MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

Estudos realizados por Eveillard *et al.* (2004); Wagenvoort, De Brauwer e Toenbreker (2005) e Kuehnert *et al.* (2006) demonstraram a relação de transmissão entre os profissionais de saúde e seus familiares, sendo uma importante fonte de transmissão. Os profissionais de saúde, por estar em ambiente hospitalar, podem disseminar micro-organismos resistentes, entre eles o *S. aureus* resistente à oxacilina (CHAMBERS, 2001).

Neste estudo, pelo método de disco difusão, verificou-se que 12 amostras foram resistentes à oxacilina, sendo que apenas oito tiveram essa resistência confirmada pelo teste de CIM. Comparando-se os dois métodos, constatou-se que das quatro amostras não confirmadas pelo teste de CIM três estavam próximas do ponto de corte para a resistência. A partir desses resultados, fica evidente a correta proposição do Clinical and Laboratory Standards Institute (2009b), que preconiza a necessidade de se correlacionar os resultados dos testes de disco difusão com os resultados do teste de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), empregando-se cepas-padrão (ATCC) reconhecidamente sensíveis e resistentes.

O *S. aureus* de origem comunitária, conforme alguns autores, apresenta uma taxa de sensibilidade entre 85% e 100% a drogas como clindamicina, gentamicina, ciprofloxacina, Trimetropin/sulfametoxazol e vancomicina. Maiores taxas de resistência foram encontradas nas amostras isoladas neste estudo, possivelmente por se tratar de alunos em Estágio Curricular em unidades de saúde e, portanto, mais susceptíveis à aquisição de cepas resistentes (SANTOS *et al.*, 2007).

As opções terapêuticas para o tratamento dos *S. aureus* resistentes à oxacilina diminuem a cada dia, ficando limitada, atualmente, ao uso da vancomicina e da linezolida, porém com relatos de resistência em alguns casos isolados (SAIID-SALIM, MATHEMA e KREISWIRTH, 2003; SANTOS *et al.*, 2007).

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Português (Brasil)

Vários autores relatam a importância de políticas de restrição do uso de antimicrobianos, evitando, assim, seu uso inadequado ou desnecessário e reduzindo a probabilidade do surgimento e propagação de cepas resistentes ou com sensibilidade reduzida aos glicopeptídeos (COIA *et al.*, 2006; GUILARDE, *et al.*, 2006).

Todas as amostras avaliadas neste estudo foram sensíveis à vancomicina. A susceptibilidade reduzida dos *S. aureus* à vancomicina (VISA) surgiu em 1996 no Japão, e em 2002, nos EUA, foi identificada a primeira cepa resistente (VRSA) (MIMICA e MENDES, 2007; SANTOS *et al.*, 2007). No Brasil, em 2000, foi encontrada a primeira cepa resistente à vancomicina, em um hospital de Queimados no Rio de Janeiro (SANTOS *et al.*, 2007), entretanto essa disseminação ainda não se configurou em nosso meio, sendo restrita a casos isolados.

O perfil genotípico das amostras de *S. aureus* apresenta grande importância; através da amplificação de determinados genes e subsequente análise genética dos fragmentos podem ser obtidas informações da filogenia e da sistemática microbiana de uma maneira rápida e eficiente (KLUYTMANS, VAN BELKUM e VERBRUGH, 1997). A técnica pode ser utilizada para a ampliação simultânea dos genes *mecA* e *femA* e do gene da termonuclease extracelular e PBP2 (MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

As medidas de prevenção para aquisição de infecção por *S. aureus* incluem a descontaminação nasal. Um agente tópico bactericida vem sendo utilizado para a erradicação em fossas nasais, axilas, virilhas e em mão de pacientes e trabalhadores da saúde. Por meio dessa medida é possível reduzir as taxas de infecção entre aqueles pacientes que serão submetidos a cirurgias (DOEBBELING, 1993; MANDELL, BENNETT e DOLIN, 2005), e também entre aqueles imunocomprometidos (FELIX JUNIOR, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA, 2007).

O uso de mupirocin deve ser de forma restrita a casos em que seja absolutamente necessário, para se evitar a disseminação da resistência a esse antimicrobiano (COIA *et al.*, 2006), tornando-se indispensável que um programa de vigilância contínua de MRSA seja realizado regularmente nos serviços de saúde (CUI *et al.*, 2006).

O *S. aureus* resistente à oxacilina deixou de ser um problema hospitalar e passou a ser encontrado em indivíduos que vivem na comunidade e que não apresentam fator de risco, fazendo-se necessária a escolha apropriada dos antimicrobianos para seu

devido tratamento (FRIDKIN *et al.*, 2005; SAIID-SALIM, MATHEMA e KREISWIRTH, 2003).

7. CONCLUSÃO

- Foi verificada uma alta prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* entre estudantes de Graduação em Enfermagem na Universidade Estadual de Maringá.
- 90,1% apresentaram positividade para *S. aureus*, sendo 100% no primeiro ano de graduação, 84,4% no segundo ano, e 82,8% no terceiro ano.
- A taxa de resistência à oxacilina foi de 8,8% pelo método de Agar diluição e de 13,2% pelo método de disco difusão.
- Não houve concordância na identificação de resistência à oxacilina pelos dois métodos para todas as amostras de *S. aureus*.
- Todas as amostras avaliadas se mostraram sensíveis à vancomicina pelos dois métodos adotados.
- Todas as oito amostras resistentes à oxacilina pelo método de CIM apresentaram o gene *mecA*.
- Das oito amostras resistentes à oxacilina pelo CIM 100% apresentaram resistência à penicilina, trimetropin/sulfametoxazol e à tetraciclina.
- A tipagem genética demonstrou que quatro amostras de *S. aureus* tiveram uma similaridade superior a 84%, e duas com 100%.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de *S. aureus* multirresistentes nos vestíbulos nasais de portadores são ou assintomáticos, entre estudantes de Enfermagem, é uma ameaça e uma importante fonte de transmissão do micro-organismo, considerando que esses estudantes estarão desempenhando atividades acadêmicas junto aos pacientes.

Os objetivos desta pesquisa foram verificar a prevalência de carreamento nasal de *S. aureus* entre estudantes de Enfermagem, identificar o perfil fenotípico e genotípico das amostras isoladas e dessa forma contribuir para uma melhor compreensão da epidemiologia desse microorganismo no contexto hospitalar.

Os resultados demonstraram uma alta prevalência de *S. aureus* entre os estudantes, com uma alta frequência de amostras multirresistentes particularmente à oxacilina, e carreamento de elemento genético *mecA* responsável por perpetuação dessa resistência.

A identificação do estudante de Enfermagem como portador de *S. aureus* multirresistentes proporciona a informação necessária para a construção de estratégias de prevenção de infecções hospitalares.

REFERÊNCIAS

- ANTONINI, S. R. C.; MENECHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 49f.
- BRAGA, A. C. P. V. et al. **Módulo 4 – Gran-positivos: *Staphylococcus* spp.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_sta.htm>. Acesso em: 13 out. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 196/96** - Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF: MS/FIOCRUZ, 1996.
- BROWN, D. F. J. et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 56, p. 1000-1018, Nov. 2005.
- CARDOSO, M. P. **Aquisição nasal de *Staphylococcus aureus* por recém-nascidos saudáveis**. 2007. 65f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- CAVALCANTE, S. M. M. et al. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol**, São Paulo, v.9, n.4, p.436-446, 2006.
- CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.
- CHARLEBOIS, E. D. et al. Population-Based Community Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Urban poor of San Francisco. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.34, p. 425-433, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 10. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009a.
- _____. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility testing**: nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009b.
- _____. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. eighth edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009c.
- COIA, J.E. et al. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 63s, p. s1-s44, 2006.

COOKSON, B. D.; WEBSTER, M.; PHILIPS, I. Control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, London, v.1, n°. 8534, p. 696, 1987.

COOKSON, B. D. et al. Evaluation of Molecular Typing Methods in Characterizing a European Collection of Epidemic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains: the HARMONY Collection. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 45, n°. 6, p. 1830–1837, 2007.

CUI, L. et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, D.C., v. 50, n. 2, p. 428-438, 2006.

DEL VECCHIO, V. G. et al. Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 33, n. 8, p. 2141-2144, 1995.

Formatado: Inglês (EUA)

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Genet. Evol.**, Amsterdam, v. 8, p. 747-763, 2008.

Formatado: Português (Brasil)

DIAS FILHO, B. P. et al. **Manual de aulas práticas: Enfermagem**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas, 2001.

DOEBBELING, B. N. Elimination of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in health care workers: analysis of six clinical trials with calcium mupirocin ointment. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, n° 3, p. 466-474, 1993.

DOYLE, J.J.; J.L. DOYLE. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, Irvine, v.19, p. 11-15, 1987.

ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**, Washington, D.C., v. 99, n°. 11, p. 7687-7692, 2002.

ENRIGHT, M. C. et al. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 38, n. 3, p. 1008 – 1015, 2000.

ETM. **Etest® Technical Manual**. Disponível em: <www.abbiobios.com/pdf/etm_index.htm>. Acesso em: 10 dez. 2009.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

EVEILLARD, M. et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among hospital employees: prevalence duration, and transmission to households. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v. 25, n°. 2, p. 114-20, 2004.

FELIX JUNIOR, L. F. **Infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina: revisão da literatura**. 2007. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência)-Hospital Regional Asa Sul, Brasília, DF, 2007.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, M. L. S. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

FRIDKIN, S. K. et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 36, p. 429-439, 2003.

_____. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 352, n.º 14, p. 1436-1444, 2005.

GUILARDE, A. O. et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and predictors for death in Brazilian teaching hospital. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 63, p. 330-336, 2006.

Formatado: Inglês (EUA)

GUZMÁN-BLANCO, M. et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin América. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.34, n. 4, p. 304-308, 2009.

HESHIKI, Z. et al. Flora bacteriana nasal: estudo entre médicos residentes dos Hospitais Universitários de Londrina – Paraná. **Semin., Cienc. biol. saude**, Londrina, v. 23, p. 3-10, jan./dez. 2002.

HIDRON, A. I. et al. Risk factors for colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in patients admitted to na urban hospital: emergence of community-associated MRSA nasal carriage. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.41, n.º 2, p. 159-166, 2005.

HIGUCHI, W. et al. Structure and specific detection of Staphylococcal cassette chromosome *mec* type VII. **Biochem Biophys Res. Commun**, New York, v.377, n.3, p. 752-756, 2008.

HONG, F. A. N.; GORAN, H. Use of cefoxitin-based selective broth for improved detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC., v. 44, n.º 2, p. 592-594, 2006.

HUANG, Y. C. et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in school children without identifiable risk factors in northern Taiwan. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Taiwan, v. 24, n.º 3, p. 276-278, 2005.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, DC, v. 10, n.º 3, p. 505-520, 1997.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008.

KUEHNERT, M. J. et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 193, p. 172-179, 2006.

LEISER, J. J., TOGNIM, M. C. B.; BEDENDO, J. Infecções hospitalares em um Centro de Terapia Intensiva de um Hospital de Ensino no Norte do Paraná. **Cienc. Cuid. Saude**, Maringá, v.6, n° 2, p. 181-186, 2007.

LU, P. et al. Risk factors and molecular analysis of community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC , v. 43, n. 1, p. 132-139, 2005.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

MARTINS, L. T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. cap.18, p. 149-156.

MAXWELL. J. G. et al. Long-term study of nasal staphylococci among hospital personnel. **Amer. J. Surg.**, New York, v. 118, n° 6, p. 849-854, 1969.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. V. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 399-406, 2007.

MOREIRA, M. et al. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 263-268, 1998.

MOURA, J. P.; GIR, E. Conhecimento dos profissionais de enfermagem referente à resistência bacteriana a múltiplas drogas. **Acta Paul. Enferm.**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 351-356, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Taxonomy Browser**. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/>. Acesso em: 20 dez. 2006.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus aureus* SPP. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 207-213, 2007.

ONONUGA, A.; OYI, A. R.; ONAOLAPO, J. A. Prevalence and susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates among healthy women in Zaria, Nigéria. **Afr. J. Biotechnol.**, Nairobi, v. 4, n. 11, p. 1321-1324, 2005.

PALOS, M. A. P. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (MRSA) em profissionais de saúde e as interfaces com as infecções

nosocomiais. 2006. 184 f. Tese (Doutorado em Enfermagem)-Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

PRATES, K. A. **Detecção de Portadores de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em uma comunidade estudante universitária.** 2008. 33 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.

REINOSO, E. et al. rep-PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Argentina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 44, p. 115-121, 2007. Suplemento.

RICARDO, S. B. Emergência de *S. aureus* Meticilina-Resistente (MRSA) na comunidade. **Prática Hospitalar**, São Paulo, n. 34, p. 131-134, 2004.

Formatado: Inglês (EUA)

SAIID-SALIM, B.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: na emerging pathogen. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v. 24, n° 6, p. 451-455, 2003.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, B. M. O.; DARINI, A. L. C. Colonização por *Staphylococcus aureus* em portadores são relacionados de uma creche de Hospital Universitário. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 160-172, 2002.

SANTOS, B. M O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. **Rev. Latino-am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 67-73, 2000.

_____. **Prevalência de portadores sãos de *Staphylococcus aureus* em pessoas de diferentes categorias em enfermagem de um hospital geral escola.** 1987. 201f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1987.

SAUTTER, R. L.; BROWN, W. J.; MATTMANL. H. The use of a selective staphylococcal broth vs direct plating for the recovery of *Staphylococcus aureus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v.9, n° 5, p. 204-205, 1988.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. **Uso profilático de antimicrobianos.** [2009]. Disponível em: http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=884&tipo_detalhe=S. Acesso em: 15out. 2009.

SHOPSIN, B. et al. Prevalence of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. **J. Infect. Dis.**, New York, v. 182, p. 359-362, 2000.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M. O. et al. (Org.). **Técnicas básicas em Biologia Molecular.** Brasília, DF: Ed. da UnB, 2003.

SIRIPOMMONGCOLCHAIN, T. et al. Evaluation of different primers for detecting *MecA* genes by PCR in comparison with phenotypic methods for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, Bangkok, v. 33, n° 4, p. 758-763, 2002.

SOUZA, M.V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Rev. patol. trop.** Goiania, v.34, n. 1, p. 27-36, 2008.

SPÍNDOLA, T.; MARTINS, E. R. C.; FRANCISCO, M. T. R. Enfermagem como opção: perfil de graduandos de duas instituições de ensino. **Rev. Bras. Enferm.**, Rio de Janeiro, v.612, n.2, p.164-169, 2008.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TENOVER, F. C. et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Chicago, v.18, n.6, p.426 – 439, 1997.

TENOVER, F. C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 32, p. 407-415, 1994.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Bactérias. In: TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ. Graduação. Disponível em: <<http://www.pen.uem.br/html/modules/tinyd0/index.php?id=17&secao=cursos&campus=maringa>>. Acesso em: 10 set. 2009.

Formatado: Inglês (EUA)

VAN BELKUM, A. et al. Multicenter Evaluation of Arbitrarily Primed PCR for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. **J. Clin. Microbiol.** Washington, DC, v. 36, n° 3, p. 1537-1547, 1995.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

VANNUFFEL, P. et al. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus species* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 33, n° 11, p. 2864-2867, 1995.

VIEIRA, R.G. L., SANTOS, B. M. O. Riscos biológicos em laboratório de análises clínicas de uma Universidade Privada. **Nursing**, São Paulo, v. 10, no 112, p. 406-411, set. 2007.

VON EIFF, C. et al. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, n° 1, p. 11-16, 2001.

VOSS, A. Preventing the spread of MRSA. Common sense and observational studies are of benefit. **BMJ**, London, v. 329, n° 4, p. 538-539, Sep. 2004.

WANG, J. T. et al. Molecular epidemiology and control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a teaching hospital. **Formos Méd. Assoc.**, Tawan, v. 103, n° 1, p. 32-36, Jan. 2004.

WAGENVOORT, J. H. T.; DE BRAUWER, M. L. H.; TOENBREKER, H. M. J. Risk of re introduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital by intrafamilial spread from to healthcare workers. **J. Hosp. Infect.**, London, v. 59, p. 67-76, 2005.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estamos realizando uma pesquisa intitulada “Aquisição nasal de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de enfermagem saudáveis”, a qual deverá ser realizada em três etapas sendo: uma coleta realizada no período anterior à entrada do aluno no hospital e duas posteriores a sua inclusão no hospital através do Estágio Supervisionado. Os resultados da pesquisa destinar-se-ão à elaboração de trabalho de caráter científico e possível publicação, sendo garantido o anonimato dos participantes.

Estamos disponíveis para fornecer-lhe informações quando julgar necessário, nos comprometendo a proporcionar respostas adicionais sobre qualquer dúvida que por ventura venha a ter e informações atualizadas durante o desenvolvimento do estudo, mesmo que isto possa afetar a sua vontade de continuar participando.

A sua retirada deste processo de pesquisa poderá ocorrer quando considerar conveniente, sendo que isto não lhe acarretará nenhum dano pessoal e/ou profissional.

Informo que não haverá riscos, nem danos ou custos de qualquer natureza caso concorde em participar do estudo, assim como não receberá pagamento pela participação. O presente projeto está em concordância com as exigências da Resolução 196/96, que regulamenta a realização de pesquisa com seres humanos.

Em caso de reclamação e/ou denúncia, procure o pesquisador João Bedendo pelo telefone (0xx44) 3261-4511, da Universidade Estadual de Maringá, e/ou o Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Maringá, na Pró-Reitoria de Pós-Graduação, pelo telefone (0xx44) 3261-4444.

Eu, _____, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE em participar desta pesquisa.

_____ Data: ____/____/____

Assinatura do participante.

Eu, Pesquisadora _____,
declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo.

ANEXO 2

Formulário de Identificação do Acadêmico

Acadêmico	RA: _____	
Data de Nascimento	___/___/_____	
Sexo	MASCULINO ()	FEMININO ()
Trabalha em alguma instituição de saúde atualmente?	SIM ()	NÃO ()
Trabalhou em alguma instituição de saúde nos últimos 5 anos?	SIM ()	NÃO ()
Apresenta atualmente algum sinal ou sintoma de doença?	SIM ()	NÃO ()
Está fazendo uso de antimicrobiano atualmente? Quanto tempo? _____	SIM ()	NÃO ()

ANEXO 3

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos


Registrado na CONEP em 10/02/1998



GOVERNO DO
PARANÁ

CAAE Nº. 0221.0.093.000-08

PARECER Nº. 536/2008

Pesquisador (a) Responsável: João Bedendo	
Centro/Departamento: CCS/DEN	
Título do projeto: Aquisição nasal de Staphylococcus aureus entre estudantes de enfermagem saudáveis.	
<p>Considerações:</p> <p>O Projeto estava em Pendência por não constar Autorização do responsável do Laboratório de Microbiologia e pelo não esclarecimento da fonte de recurso para utilização da medicação e do material.</p> <p>Em anexo Autorização do Responsável pelo Laboratório para a realização deste estudo, assim como a liberação de todo material a ser utilizado no Projeto.</p> <p>Parecer: Após as Autorizações solicitadas, somos de parecer FAVORÁVEL à Aprovação do presente Projeto.</p>	
Situação: APROVADO	
CONEP: (X) para registro () para análise e parecer Data: 17/10/2008	
O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: Fevereiro/2009	
<p>O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº. 196/96 e complementares do CNS/MS, na 162ª reunião do COPEP em 17/10/2008.</p>	 Prof. Dr. Ieda Harumi Higashi Presidente do COPEP

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro do seu CAAE.
 Bloco 10 sala 01 – Avenida Colombo, 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá - PR
 Fone-Fax: (44) 3261-4444 – e-mail: copep@uem.br