

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRO-ORGANISMOS MULTIRRESISTENTES NA MICROBIOTA DE ESTUDANTES DURANTE A GRADUAÇÃO¹

EVALUATION OF THE PRESENCE OF MULTI-RESISTENT MICROORGANISM IN THE MICROBIOTA OF STUDENTS DURING THE UNDERGRADUATE COURSE

Jéssica Gracioli Wiethan² e Ana Paula Becker³

RESUMO

Este estudo aborda a possível transmissão de mecanismos de resistência bacteriana, partindo da microbiota normal de acadêmicos em contato com pacientes internados. Dessa forma, esta pesquisa objetiva avaliar as principais bactérias multirresistentes: *Staphylococcus aureus* - resistente à oxacilina (cefoxitina), e enterobactérias - resistentes aos carbapenêmicos (meropenem), a partir de *swab's* de pele e nasofaringe obtidos de acadêmicos do curso de Medicina em dois momentos da graduação. As amostras foram coletadas e incubadas em caldo TSB - suplementado com discos de Meropenem (10µg) e Cefoxitina (30µg) - a 37°C por 24h. Após a incubação, as amostras foram cultivadas em ágar Sal Manitol e ágar MacConkey. Do total de 43 amostras, 8 foram positivas para *S. aureus* resistente à oxacilina (MRSA). Nos acadêmicos do 1º semestre, foi constatada uma incidência de 16,6% de MRSA, enquanto que nos acadêmicos do 6º semestre, a incidência foi de 25% de amostras MRSA. A avaliação de mecanismos de resistência na microbiota de estudantes é uma ferramenta que auxilia nas medidas de conscientização, a fim de minimizar a transmissão cruzada nos ambientes que posteriormente esses alunos frequentarão.

Palavras-chave: antimicrobianos, bactérias, patógenos, resistência.

ABSTRACT

This study addresses the possible transmission of mechanisms of bacterial resistance, starting from the normal microbiota of academics in contact with hospitalized patients. Thus, this research aims to evaluate the main multiresistant bacteria: Staphylococcus aureus - resistant to oxacillin (cefoxitin), and enterobacteria - resistant to carbapenems (meropenem), from swabs of skin and nasopharynx obtained from Medicine students at two moments during their undergraduate course. The samples were collected and incubated in TSB broth supplemented with Meropenem (10µg) and Cefoxitin (30µg) - at 37°C for 24h. After incubation, the samples were cultured on Sal Manitol agar and MacConkey agar. Of the total of 43 samples, 8 were positive for oxacillin resistant S. aureus (MRSA). For the 1st semester students, an incidence of 16.6% of MRSA was observed, while for the 6th semester students, the incidence was 25% of MRSA samples. The evaluation of mechanisms of resistance in the student microbiota is a tool that assists in the measures of awareness, in order to minimize the cross-transmission in the environments where these students will work later.

Keywords: antimicrobials, bacteria, pathogens, resistance.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmica do curso de Biomedicina - Universidade Franciscana. E-mail: jewiethan@hotmail.com

³ Orientadora. Docente do curso de Biomedicina - Universidade Franciscana. E-mail: anapbecker1@gmail.com

INTRODUÇÃO

As bactérias da microbiota normal vivem como seres simbióticos, colonizando o corpo humano, não causando danos ao organismo e auxiliando nas funções do metabolismo. Na pele, o gênero *Staphylococcus spp* é mais predominante, em relação às outras bactérias (MENDES et al., 2016). Bacilos Gram negativos também são colonizantes, principalmente do intestino, e são chamados enterobactérias. O impasse dessa colonização por bactérias acontece no momento que o paciente necessita de internação prolongada em ambiente hospitalar, uso de aparelhos hospitalares, tais como cateteres e tubos endotraqueais, tornando o paciente suscetível a infecções por sua microbiota normal, bem como pela microbiota normal da equipe de saúde (MOREIRA et al., 2010).

Como se não bastasse, cepas desses micro-organismos tornaram-se resistentes aos tratamentos com antimicrobianos, devido ao uso indiscriminado destes medicamentos, que fez com que as bactérias evoluíssem, modificando sua estrutura, a ponto de se tornarem resistentes (MUNITA; ARIAS, 2016). Tal informação torna-se relevante mundialmente, devido à ameaça causada à saúde humana, frente a condutas terapêuticas de tratamentos. Neste contexto, a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2016, mencionou a resistência bacteriana aos antibióticos como uma das três mais importantes ameaças à saúde humana (SILVA, 2015).

Segundo Goulart et al. (2015) e Stuchi et al. (2013), cerca de 30 a 50% da população sadia está colonizada por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) nas fossas nasais e garganta, devido às condições favoráveis que estes locais oferecem à proliferação desses agentes. Estes micro-organismos começam a colonizar o corpo a partir do nascimento, seja ele por parto vaginal ou cesariana, e, posteriormente, por exposições ao ambiente, alimentação e contato com outros indivíduos (GRICE et al., 2008).

Segundo Perna et al. (2015), os índices de infecção estão elevados em hospitais de ensino ou universitários, devido à diversidade de doenças, longos períodos de internação, superlotação dos hospitais, e contato direto com profissionais atuantes nesses locais, incluindo estudantes em aprendizado. Além da transmissão do gênero *Staphylococcus*, outras bactérias se destacam em relação a surtos em hospitais, devido ao seu grande potencial de resistência a antimicrobianos. A família das enterobactérias, segundo Kaiser et al. (2016), é responsável por 30 a 35% dos casos de septicemias e corresponde a 70% das infecções urinárias.

As enterobactérias podem possuir genes que codificam enzimas (carbapenemases), que, por sua vez, conferem resistência aos carbapenêmicos, como exemplo, a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (PERNA et al., 2015). A resistência aos carbapenêmicos, apesar de descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae*, não é exclusiva deste gênero, pelo contrário, cada vez mais têm sido diagnosticados casos de diversos tipos de enterobactérias produtoras de carbapenemases (tais como *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella spp*, *Enterobacter spp* e *Enterobacter cloacae*) (DIENSTMANN et al., 2010). Essas não são as únicas a terem o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, mas

são importantes devido ao modo de transmissão e surtos em hospitais e Unidades de Tratamento Intensivo (ARNOLD et al., 2011).

Diante do exposto, faz-se necessário avaliar a presença dos principais mecanismos de resistência em cocos gram positivos (resistência à oxacilina em *S. aureus*) e bacilos gram negativos (resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias) (SILVA, 2015) em estudantes da graduação, a fim de compreender sua disseminação como microbiota normal e, principalmente, conscientizá-los da importância da realização de tratamento de possíveis futuros transmissores de micro-organismos multirresistentes aos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética, sendo aprovado sob o número CAAE: 76669617.3.0000.5306. Este projeto foi executado entre os meses de outubro e dezembro de 2017. Participaram da pesquisa estudantes do curso de Medicina do então Centro Universitário Franciscano, que estavam matriculados no sexto semestre e no primeiro semestre letivo de 2017. O critério de inclusão foi estar matriculado em alguma das disciplinas do segundo semestre de 2017 (agosto/dezembro 2017). Foram excluídos da pesquisa, os estudantes que não concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Após o esclarecimento do projeto e a aceitação dos alunos a participarem da pesquisa, foram coletadas amostras biológicas da cavidade nasal e interdigital (pele). A coleta foi realizada com *swabs* estéreis e incubados em caldo tryptic soy broth (TSB) (BD®). Do total de alunos matriculados (83), 54 alunos concordaram em participar e assinaram o TCLE, porém foram coletadas 43 amostras, lembrando que o aluno participante poderia desistir a qualquer momento da pesquisa.

O material foi transportado ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Franciscano, onde, foram adicionados discos de meropenem (10µg) e cefoxitina (30µg) (LB®) e imediatamente incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras foram semeadas em ágar macconkey (Himedia®), para as amostras dos swabs interdigitais, e ágar sal manitol (Himedia®) para as amostras dos swabs nasais e incubadas novamente a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras que tiveram crescimento em ágar sal manitol e macconkey, foram repicadas e semeadas em ágar muller hington (Kasvi®) com disco de meropenem (10µg) e cefoxitina (30µg), respectivamente, por 24hs a 37°C. A resistência de *Staphylococcus* à oxacilina foi avaliada com disco de cefoxitina (30µg), os halos foram interpretados de acordo com o *Clinical & Laboratory Standards Institute* 2015 (M100-S25) (CLSI, 2015) e as amostras classificadas como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ou *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os 83 alunos matriculados, 54 alunos concordaram em participar da pesquisa, porém foram coletadas 43 amostras. Após a incubação em TSB suplementado com discos de antibióticos, e semeadura nas placas com ágar sal manitol e macconkey, foram obtidos os resultados demonstrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Resultados dos alunos matriculados no 1º semestre do curso de Medicina. A coluna “Amostra” indica a identificação do aluno e os sinais de positivo “+” e negativo “-“ indicam a presença ou ausência do micro-organismo na amostra do aluno em cada meio (Ágar MacConkey para Enterobactérias e Ágar Sal Manitol para MRSA).

1º Semestre		
Amostras	Ágar MacConkey	Ágar Sal Manitol
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
Controle + KPC	+	-
Controle + MRSA	-	+

Para a confirmação do mecanismo de resistência, as amostras positivas em ágar sal manitol foram repicadas em ágar muller hinton com disco de cefoxitina (30µg), por 24h a 37°C (Figura 1). Dos exemplares coletados, 8 mostraram-se resistentes à cefoxitina, representando um total de 18,6% das amostras. O restante demonstrou-se sensível à incubação com o disco de antibiótico.

Do total de 43 amostras 18 eram do 1º semestre e 25 do 6º semestre. Nos acadêmicos do 1º semestre, encontramos 16,6% de MRSA enquanto que nos acadêmicos do 6º semestre encontramos 25% de amostras MRSA (Figura 2). Além disso, foi encontrada uma amostra nos alunos do 6º semestre com crescimento em caldo TSB suplementado com carbapenêmicos. Ao fazer o repique desse isolado para testes de identificação e antibiograma foi observado não se tratar de Enterobactéria (TSI negativo para glicose) e por isso não foi realizado o teste de bloqueio enzimático para identificação de possível KPC.

Tabela 2 - Resultados dos alunos matriculados no 6º semestre do curso de Medicina. A coluna “Amostra” indica a identificação do aluno e os sinais de positivo “+” e negativo “-“ indicam a presença ou ausência do micro-organismo na amostra do aluno em cada meio (Ágar MacConkey para Enterobactérias e Ágar Sal Manitol para MRSA).

6º Semestre		
Amostras	Ágar MacConkey	Ágar Sal Manitol
19	-	+
20	-	-
21	-	+
22	-	+
23	-	-
24	-	-
25	-	+
26	-	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	+
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	-	-
36	-	+
37	-	-
38	-	-
39	-	-
40	+	+
41	-	+
42	-	+
43	-	+
Controle + KPC	+	-
Controle + MRSA	-	+

Figura 1 - Halo de inibição de cefoxitina para os isolados resistentes em ágar sal manitol. De acordo com o órgão padronizador (CLSI, 2015), halo inferior à 24 mm significa resistente ao antimicrobiano.

Resistência a cefoxitina

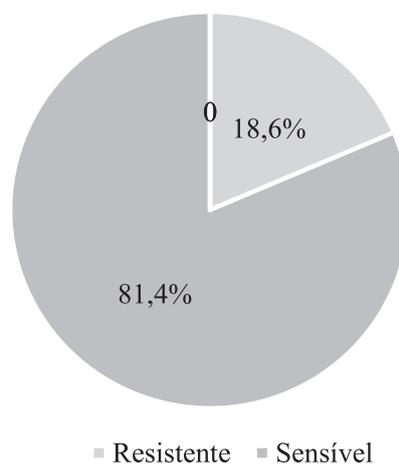
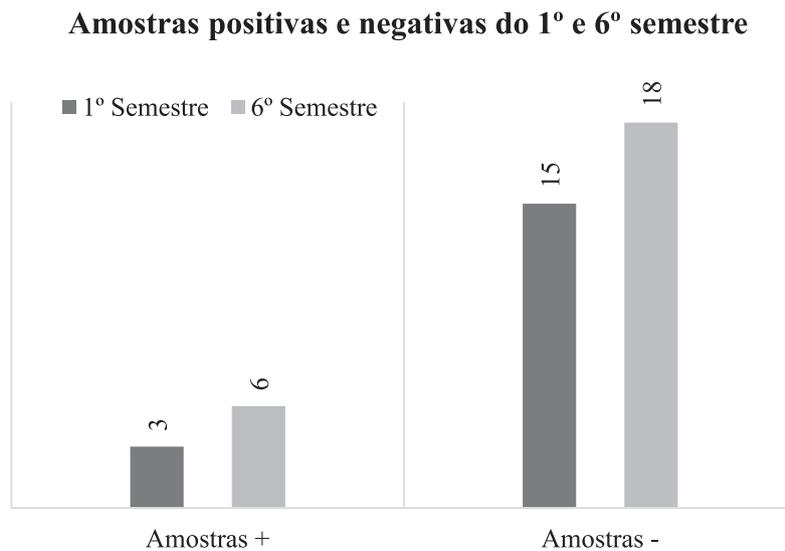


Figura 2 - Resultados das amostras dos alunos do 1º e 6º semestre do curso de Medicina.



Nesta pesquisa, foi verificada uma incidência de 18% de MRSA nas fossas nasais dos estudantes de Medicina da Instituição. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Gauer e da Silva (2016), onde a principal bactéria isolada das mãos da equipe de funcionários de um posto de saúde também foi a *S. aureus*.

A análise realizada por Neves (2007), na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, demonstrou um maior percentual de amostras positivas para *S. aureus* coletadas das fossas nasais, assim como constatado neste trabalho, avaliando também o tempo de exposição aos hospitais e laboratórios. O período de realização da pesquisa foi maior, bem como o número de alunos participantes, o que não foi possível neste estudo, pois os acadêmicos do sexto semestre são os mais antigos do curso no momento da pesquisa. Os resultados obtidos por Neves (2007) apresentaram uma prevalência de MSRA mais alta que o presente estudo, visto que participaram da pesquisa alunos do 1º ao 6º ano do curso de Medicina, enquanto que nesta pesquisa, participaram estudantes do 1º e 6º semestres.

Referente aos alunos do primeiro semestre, que ainda não entraram na rotina hospitalar, esta pesquisa encontrou 3 amostras positivas em ágar Sal Manitol, indicando a colonização por *S. aureus*. Ao contrário dos resultados da presente pesquisa, no estudo de Neves (2007), não foi observada a colonização por *S. aureus* nos estudantes do primeiro ano de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Ainda sobre o estudo de Neves (2007), nos alunos do sexto semestre foram encontradas 18 amostras positivas para *S. aureus*, corroborando com este estudo, onde também se observou um aumento do número de casos colonizantes por *S. aureus* nas fossas nasais.

Diferentemente de Goulart et al. (2015), onde o maior percentual de bactérias isoladas a partir de swabs nasais foram negativas para *S. aureus*, este estudo encontrou o maior percentual das amostras positivas em amostras de *S. aureus*.

De acordo com Custódio et al. (2009), os bacilos Gram-negativos são pouco comuns nas mãos dos profissionais de saúde, podendo ser usualmente adquiridos no hospital, sendo raramente microbiota normal. Portanto, é natural que tenhamos encontrado, na presente pesquisa, apenas uma amostra positiva para bacilo Gram negativo (que não se tratava de Enterobactéria) nos acadêmicos do sexto semestre, mais expostos a procedimentos hospitalares.

CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, foi constatada a importância da avaliação da microbiota dos acadêmicos, visto que esses podem vir a ser potenciais transmissores de micro-organismos resistentes. Além disso, pode-se verificar, nessa população, que a microbiota normal possui mecanismos de resistência, fator esse adquirido ao longo da exposição dessa população a ambientes contaminados, onde estudantes do 6º semestre frequentam há mais tempo e por isso possuem mais mecanismos de resistência. Junto a isso, esse tipo de pesquisa auxilia nas medidas de conscientização, a fim de minimizar a transmissão cruzada nas instituições de saúde.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) - Producing Bacteria. **Southern Medical Journal**, Baltimore, v. 104, p. 40-45, 2011.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. ed. EUA: CLSI, 2015.

CUSTÓDIO, Janaína et al. Avaliação microbiológica das mãos de profissionais da saúde de um hospital particular de Itumbiara, Goiás. **Revista de Ciências Médicas**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 7-11, 2009.

DIENSTMANN, Rosabel et al. Phenotypic research on *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme in Enterobacteriaceae from hospitals. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-27, 2010.

GAUER, Daiana; SILVA, Gabriela Kniphoff da. Qualitative and quantitative analysis of the hands microbiota from the employees of a health center. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Univates, v. 49, n. 2, p. 206-212, 2016.

GOULART, Maria Eduarda de Azevedo et al. *Staphylococcus aureus* nasal swab of isolated in a military hospital. **Revista Saúde**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 05-28, 2015.

GRICE, Elizabeth A. et al. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 18, n. 2, p. 1043-1050, 2008.

KAISER, Thaís Dias Lemos et al. Detecção de betalactamase de espectro estendido em isolados de enterobactérias provenientes de um hospital da região de Santa Teresa-ES. **Arquivos de Ciência da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 01, p. 3-7, 2016.

MENDES, Rafael R. et al. Perfil bacteriológico das mãos de profissionais de saúde no centro cirúrgico e no pós-operatório do Hospital Geral de Palmas, Tocantins. **Revista de Patologia de Tocantins**, v. 3, n. 1, p. 44-62, 2016.

MOREIRA, Rafael de Oliveira et al. Nível de contaminação por micro-organismos das superfícies, materiais e equipamentos de clínicas odontológicas da cidade de Muriaé (MG). **Revista Científica da Faminas**, v. 6, n. 01, p. 49-61, 2010.

MUNITA, Jose M.; ARIAS, Cesar. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

NEVES, Maria Aparecida das. **Colonização das fossas nasais de acadêmicos de Medicina por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina, relacionada ao tempo de exposição no ambiente hospitalar**. 2007. 143f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências Médicas, Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2007.

PERNA, Thaíssa Daulis Gonçalves da Silva et al. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *Klebsiella* em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, Universidade Federal de Juiz de Fora, v. 13, n. 2, p. 119-123, 2015.

SILVA, Alisson Igo dos Santos. **Avaliação das bactérias isoladas em amostras biológicas em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Universitário Lauro Wanderley de João Pessoa**. 2015. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

STUCHI, Rosamary Aparecida Garcia et al. Contaminação bacteriana e fúngica dos telefones celulares da equipe de saúde num hospital em Minas Gerais. **Revista Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 12, n. 4, p. 760-767, 2013.

