



Staphylococcus aureus e a atividade *in vitro* da clorexidina

Joice Maria Zanatta Festuccia¹; Denise de Andrade^{2,*}; Carolina Contador Beraldo³; Camila Megumi Naka Shimura⁴; Evandro Watanabe⁵

¹Enfermeira. Especialista em Prevenção e Controle de Infecção em Serviços de Saúde pela Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP (EERP-USP).

²Enfermeira. Professora Associada do Departamento de Enfermagem Geral e Especializada da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP (EERP-USP) e Coordenadora do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle da Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS).

³Enfermeira. Doutoranda pelo Programa de Enfermagem Fundamental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP (EERP-USP).

⁴Enfermeira. Mestranda pelo Programa de Enfermagem Fundamental da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto - USP (EERP-USP).

⁵Farmacêutico. Prof. Dr. do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP (FORP-USP).

RESUMO

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) constituem um problema grave e um desafio, exigindo ações efetivas de prevenção e controle. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade da clorexidina a 2% contra 29 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* por meio de duas diferentes técnicas microbiológicas: 1) Poço-difusão em camada dupla de ágar e 2) Diluição em ágar - Diluição Inibitória Máxima (DIM) / Concentração Inibitória Mínima (CIM). De acordo com a técnica do poço-difusão em camada dupla de ágar, as cepas de *S. aureus* foram sensíveis à clorexidina (média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento de 17,8mm). E, na técnica de diluição em ágar, as cepas de *S. aureus* exibiram sensibilidade a clorexidina (DIM de 1/81.920 e CIM de 0,24µg/mL). Em conclusão, ambas as técnicas microbiológicas empregadas *in vitro* foram consideradas adequadas para a avaliação da atividade antibacteriana da clorexidina contra cepas de *S. aureus*. Além disso, estudos adicionais são necessários, considerando que o uso da clorexidina *in vivo* pode resultar em reações adversas e consequentemente alterar ou não sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Antissepsia. Clorexidina. Infecção hospitalar. *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) constituem um problema grave e um desafio, exigindo ações efetivas de prevenção e controle. As infecções acarretam aumento nas taxas de morbimortalidade, bem como nos custos da assistência à saúde. A elevada

produção de conhecimento científico na área da saúde fornece subsídios para tomada de decisão clínica e, em contrapartida, traz desafios, entre eles o controle da infecção. Diversos fatores podem favorecer a transmissão microbiana. Destaca-se o não cumprimento dos princípios de assepsia como a falta de adesão na higienização das mãos (Brasil, 2007; Damasceno, 2010; Oliveira & Paula, 2011).

As superfícies inanimadas representam uma fonte de risco para transmissão direta de microrganismos aos pacientes, mas podem contribuir para a contaminação/infecção cruzada secundária, por meio das mãos dos profissionais de saúde.

Vale destacar que para os microrganismos causarem infecção, uma das barreiras ou revestimentos do organismo humano que eles têm que transpor é a pele. Sob o controle homeostático de formação e integridade, a pele humana é um órgão dinâmico, que é colonizada por diferentes tipos de microrganismos variáveis qualitativamente e quantitativamente nas diferentes áreas do corpo. Ainda, a pele pode servir como reservatório para transmissão microbiana por meio do contato direto ou indireto (Brasil, 2007). Assim, a microbiota normal ou transitória da pele de pacientes hospitalizados pode ser fonte para diferentes topografias infecciosas como a infecção do sítio cirúrgico (ISC) e a infecção da corrente sanguínea (ICS), entre outras (Marschall et al., 2008; O'Grady et al., 2011).

Para a antissepsia, substâncias ou produtos antissépticos com atividade antimicrobiana podem ser aplicados na pele e/ou mucosas e reduzir a carga microbiana. As tentativas de utilização desses agentes para prevenir as infecções e reduzir suas complicações datam da época de Hipócrates. Atualmente, os principais antissépticos são aplicados na higienização das mãos, no preparo pré-operatório da pele e em procedimentos invasivos como punções venosas centrais e arteriais, cateterismos vasculares e vesicais (Padovani et al., 2008).

É importante salientar as dificuldades na implementação efetiva da prática de higiene das mãos tendo a escolha adequada dos antissépticos, e a técnica de aplicação um dos agravantes (Mazzola et al., 2009).

Todavia, o uso de antissépticos representa uma problemática agravada, principalmente, pela diversidade de produtos no mercado, e contracenando com a variedade de recomendações de uso. No Brasil, as várias formulações antissépticas indicadas devem atender a legislação vigente (RDC Nº 2.616) que regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, apresentando em suas formulações os diferentes princípios ativos como iodo, álcoois, clorexidina (Brasil, 1998).

O gluconato de clorexidina, objeto deste estudo, é uma bisbiguanida catiônica, que foi desenvolvida na Inglaterra no início dos anos 1950, e introduzida nos EUA, nos anos 70. A forma digluconato é solúvel em água, a sua atividade antibacteriana está atribuída a ruptura da membrana citoplasmática microbiana, resultando em precipitação ou coagulação de proteínas e ácidos nucleicos. A atividade antibacteriana imediata, durante o seu tempo de aplicação, acontece mais lentamente que os álcoois, sendo a clorexidina considerada desinfecção de nível intermediário. Entretanto, o seu efeito de substantividade ocorre em torno de seis horas, pela forte afinidade com os tecidos, torna-se o melhor entre os antissépticos disponíveis e, ainda é pouco provável a sua inativação por matéria orgânica como o sangue (Bambace et al., 2003; Brasil, 2007). A clorexidina apresenta boa atividade contra bactérias gram-positivas, menor atividade contra bactérias gram-negativas e fungos, mínima ação contra microbactéria e não é esporicida. Tem atividade *in vitro* contra vírus envelopados, mas atividade substancialmente menor contra vírus não envelopados (Brasil, 2007).

Por apresentar uma constituição catiônica, a atividade antimicrobiana da clorexidina pode ser incorporada a uma variedade de produtos empregados na área da saúde como sabões, ânions inorgânicos, surfactantes não iônicos, cremes para as mãos e antissépticos bucais (Brasil, 2007). Ainda, estudos com o emprego de substâncias naturais têm sido desenvolvidos com a finalidade de aprimorar a eficácia de antissépticos (Karpanen et al., 2010).

Considerando os estudos relacionados ao uso da clorexidina como antisséptico, as lacunas e controvérsias a serem esclarecidas, como a concentração, o grau de seletividade concomitante à diversidade de microrganismos nos serviços de saúde, este estudo tem como finalidade avaliar, *in vitro*, a atividade da clorexidina contra cepas de *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa 29 cepas de *Staphylococcus aureus* foram isoladas de secreção respiratória, ferida do sítio cirúrgico e hemocultura, provenientes de pacientes hospitalizados com infecção, em um hospital de ensino do interior do estado de São Paulo com aproximadamente 600 leitos. As cepas foram estocadas em tubos de ensaio com ágar Mueller Hinton (Difco, Sparks, MD, USA) e apresentavam perfis variados de sensibilidade aos antibióticos. Ainda, a amostra do produto químico antimicrobiano, (gluconato

de clorexidina a 2%), também foi proveniente da referida instituição hospitalar.

A padronização dos inóculos bacterianos foi realizada a partir de culturas recentes (37°C por 24h) e puras das cepas em tubos com ágar Mueller Hinton inclinado. Aliquotas foram transferidas para tubos com solução salina a 0,85% para obtenção de turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland (~10⁸UFC/mL).

Para a técnica do poço-difusão em camada dupla de ágar, inicialmente, a camada base de 12mL de ágar Mueller Hinton foi distribuída em placas de Petri (20x100mm) esterilizadas. Após solidificação do meio, confeccionou-se a camada *seed* (semeada) com a transferência de 8mL de ágar Mueller Hinton a cerca de 45°C com 1% de inóculo bacteriano padronizado (~10⁸UFC/mL). No meio de cultura solidificado foram confeccionados, com auxílio de canudos esterilizados, cinco poços com diâmetros de 5mm. Em apenas um dos poços adicionou-se 20µL de clorexidina a 2%, enquanto que nos demais foram analisados outros produtos não relatados neste trabalho. As placas foram pré-incubadas em temperatura ambiente (25°C) por 2 horas para permitir a difusão da clorexidina no meio de cultura. Decorrido o período de pré-incubação, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa, com papel de filtro absorvente entre a tampa e o fundo das placas, com intuito de evitar o contato da água de condensação com o meio de cultura. A leitura dos diâmetros dos halos de inibição foi realizada com auxílio de régua milimétrica e expressa em milímetros (Grove & Randal, 1955, Utyama et al., 2006, Maekawa et al., 2012).

A Diluição Inibitória Máxima (DIM) / Concentração Inibitória Mínima (CIM) da clorexidina foi efetuada pela técnica de diluição em ágar em duplicata. Em tubos de ensaio (20x200mm) com 2mL de água destilada esterilizada foram obtidas diluições duplas seriadas por meio da transferência de 2mL da clorexidina a 2%. Após o preparo das diluições, 18mL de ágar Mueller Hinton a cerca de 45°C foram adicionados em cada tubo com 2mL das diluições do produto. A solução resultante de 20mL foi homogeneizada e vertida em placa de Petri (20x100mm) esterilizada. Decorrida a solidificação do meio de cultura com as diferentes diluições (1/10 a 1/163.840) / concentrações (0,12 a 2000µg/mL) de clorexidina, as cepas foram semeadas em sua superfície com auxílio de um inoculador multipontual de Steers. Este dispositivo é constituído de duas pequenas chapas metálicas, uma contendo 25 orifícios/poços, onde foram adicionados 200µL de cada inóculo bacteriano padronizado (~10⁸UFC/mL) e a outra com 25 hastes de metal, que se encaixam nos poços e funcionaram como inoculadores. As placas foram incubadas a 37°C por 24h e a DIM / CIM foi definida como a maior diluição / menor concentração da clorexidina capaz de inibir o crescimento bacteriano (Steers et al., 1959; Watanabe et al., 2008).

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (nº 7485/98).

RESULTADOS

Os resultados dos halos de inibição e das DIMs / CIMs estão expressos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Atividade antibacteriana da clorexidina a 2% contra cepas de *Staphylococcus aureus* pela técnica do poço-difusão em camada dupla de ágar:

<i>Staphylococcus aureus</i> N (%)	Halos de inibição (mm)
2 (6,9)	16,0 – 16,5
14 (48,2)	17,0 – 17,5
9 (31,0)	18,0 – 18,5
2 (6,9)	19,0 – 19,5
2 (6,9)	20,0
Média	17,8

Tabela 2. Diluição inibitória máxima / concentração inibitória mínima da clorexidina contra cepas de *Staphylococcus aureus* pela técnica de diluição em ágar:

Clorexidina		<i>Staphylococcus aureus</i>			
		Cepas inibidas		Dados cumulativos	
DIM	CIM (µg/ml)	No	%	No	%
1/163.840	0,12	2	6,9	2	6,9
1/81.920	0,24	27	93,1	29	100,0
1/40.960 a 1/10	0,49 a 2000	29	100	29	100,0

DIM, diluição inibitória máxima; CIM, concentração inibitória mínima.

DISCUSSÃO

O *Staphylococcus aureus*, que é um dos patógenos humano mais importante para classificar as espécies *Staphylococcus*, são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte de mamíferos. São cocos gram-positivos, catalase positivos que formam arranjos semelhantes a “cachos de uva”, anaeróbios facultativos, são capsulados, possuem peptidoglicano na parede celular, proteína A, adesinas, enzimas extracelulares, leucocidinas e hemolisinas, alguns dos atributos de que lhe confere virulência. A característica isolada mais importante para classificar as espécies do gênero *Staphylococcus* é determinada pela prova da coagulase, que avalia a capacidade de produção da enzima. A incidência deste microrganismo é elevada em casos de infecção hospitalar (Ratti & Sousa, 2009; Trabulsi & Alterthum, 2008). Considerando sua notável capacidade de versatilidade epidemiológica e nos padrões de resistência, sua vigilância em diferentes regiões é deveras importante (Caraciolo et al., 2012).

O problema se agrava ainda mais quando se depara com a realidade da multirresistência. Em 1946, nos Estados Unidos da América, cerca de 5% de estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos microrganismos isolados em hospitais norte-americanos; em 1950 atingia 50% e em 1959 era de cerca de 80% (Bauer et al., 1960).

A literatura é vasta de dados sobre a ocorrência de *Staphylococcus aureus* sendo que o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina acomete diversos países a cada ano, notavelmente no México (24,1-80,0%) e na Venezuela (19,0-69,8%). No período de 2004 a 2010, 3126 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de 66 instituições da América Latina apresentaram resistência à meticilina (46,9%) (Garza-González & Dowzicky, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) lança a Aliança Mundial para a Segurança do Paciente como ação estratégica para incrementar a segurança no que tange o crescimento exponencial da casuística de resistência microbiana. Nesse sentido a Aliança Mundial para a Segurança do Paciente como ação estratégica para incrementar a segurança dos pacientes e profissionais está em plena campanha de conscientização da problemática.

Em relação à clorexidina, a avaliação da atividade antibacteriana realizada neste estudo demonstrou que ambas as técnicas foram adequadas para o propósito, e que a susceptibilidade do *S. aureus* (Tabela 1 e 2) foi maior do que a relatada em outros estudos (Ayhan et al., 1999; Aykan et al., 2013; Kanazawa et al., 2004).

Na escolha de um produto antimicrobiano “ideal” deve ser considerado o espectro de ação antimicrobiana, microrganismos envolvidos, fatores que interferem na atividade germicida, incluindo aqueles relacionados ao odor, aceitação pelo usuário, as propriedades físico-químicas, a toxicidade, ao custo e a regulamentação governamental vigente. Sem dúvida que, muito mais que utilizar produtos químicos no combate de microrganismos resistentes nas instituições de saúde, se faz necessário conhecer sua eficácia em diferentes situações (Darouiche et al., 2010). Vale acrescentar que em situação real de assistência não existe uma postura uníssona entre os profissionais de saúde para escolha das substâncias antimicrobianas e, o problema se agrava ainda mais quando se avalia a forma de uso. Isto em muito se deve a uma diversidade de informações científicas que podem gerar distorções e à inoperância dos órgãos oficiais de fiscalização. Em linhas gerais essa situação corrobora o fato de que os próprios profissionais desconhecem o mecanismo de ação das substâncias que utilizam em suas práticas diárias.

Nesse sentido, a capacitação dos profissionais de saúde representa um fator preponderante, uma vez que os habilitam a compreender a situação de risco e a tomar decisões adequadas em prol do rompimento da cadeia de infecção. Daí, a importância de investimentos contínuos, em cursos de treinamento ou de atualização. Convém lembrar que o êxito das ações profissionais depende, dentre outros fatores, da formação intelectual, da integração entre as normas propostas pelos serviços à prática individual. Portanto, torna-se imprescindível o treinamento, a supervisão e a vigilância.

Mesmo diante da vasta literatura, o uso da clorexidina como antisséptico, considerando às diferentes interações microbianas que se estabelecem, há lacunas e controvérsias a serem esclarecidas.

Assim, estudos adicionais são necessários, considerando que o uso da clorexidina *in vivo* pode resultar em reações adversas e consequentemente alterar ou não sua atividade antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Izabel Yoko Ito (*in memoriam*) pelo suporte na realização dessa e de diversas outras pesquisas na área da microbiologia.

À FAPESP pelo financiamento dessa pesquisa.

ABSTRACT

Evaluation of in vitro activity of chlorhexidine against Staphylococcus aureus

Healthcare-associated infections constitute a serious challenge and require effective prevention and control actions. The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* activity of 2% chlorhexidine against 29 hospital strains of *Staphylococcus aureus* using two microbiological methods: 1) well-diffusion in double-layer agar and 2) agar dilution – maximum inhibitory dilution (MID)/minimum inhibitory concentration (MIC). The well-diffusion in double-layer agar revealed that the strains of *S. aureus* were susceptible to chlorhexidine (mean diameter of growth inhibition zone: 17.8 mm). The agar dilution method also demonstrated that the strains of *S. aureus* were susceptible to chlorhexidine (MID: 1/81,920; MIC: 0.24 µg/mL). Based on the present findings, both *in vitro* microbiological methods are adequate for the evaluation of the antibacterial activity of chlorhexidine against strains of *S. aureus*. Additional studies are needed, as the use of chlorhexidine *in vivo* may result in adverse reactions, with a possible change in antimicrobial activity.

Keywords: Antibacterial activity. Antisepsis. Chlorhexidine. Cross infection. *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS

- Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J*. 1999;32(2):99-102.
- Aykan SB, Çağlar K, Engin ED, Sipahi AB, Sultan N, Yalınay Çirak M. Investigation of the Presence of Disinfectant Resistance Genes *qacA/B* in Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates and Evaluation of Their *In Vitro* Disinfectant Susceptibilities. *Mikrobiyol Bul*. 2013;47(1):1-10.
- Bambace AMJ, Barros EJA, Santos SSF, Jorge AOC. Eficácia de soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. *Rev Biociênc*. 2003;9(2):73-81.
- Bauer AW, Perry DM, Kirby WMM. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. *JAMA*. 1960;17(3):475-80.
- Brasil. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n. 2.616, de 12 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país [Internet]. *Diário Oficial da União*, Brasília, 13 maio 1998. [citado 2012 jan. 15]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm.
- Brasil. Ministério da Saúde. Segurança do Paciente: Higienização das Mãos [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. [citado 2012 jan. 15]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/index.htm.
- Caraciolo FB, Maciel MAV, Santos JB, Rabelo MA, Magalhães V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de infecções de pele e tecidos moles de pacientes ambulatoriais de um hospital universitário em Recife - PE, Brasil. *An Bras Dermatol*. 2012;87(6):857-61.
- Damasceno QS. Características epidemiológicas dos microorganismos resistentes presentes em reservatórios de uma unidade de terapia intensiva. [Dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais; 2010.
- Darouiche RO, Wall MJ, Itani KM, OttersonMF, Webb AL, Carrick MM, Miller HJ, Awad SS, Crosby CT, Mosier MC, Alsharif A, Berger DH. Chlorhexidine –Alcohol versus Povidine – Iodine for surgical-site Antisepsis. *N Engl J Med*. 2010;362(1):18-26.
- Garza-González E, Dowzicky MJ. Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. *Braz J Infect Dis*. 2013;14(1):13-19.
- Grove DC, Randal WA. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. New York: Medical Encyclopedia; 1955.
- Kanazawa K, Ueda Y. Bacterial activity of chlorhexidine gluconate against recent clinical isolates of various bacterial species in Japan. *Jpn J Antibiot*. 2004;57(5):449-64.
- Karpanen TJ, Conway BR, Worthington T, Hilton AC, Elliott TSJ, Lambert PA. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. *BMC Infect Dis*. 2010;10(278):1-6.
- Maekawa LE, Nassri MR, Ishikawa CK, Martins C, Chung A, Koga-Ito CY. *In vitro* antimicrobial activity of AH Plus, EndoREZ and Epiphany against microorganisms. *Indian J Dent Res*. 2012;23(4):469-72.
- Marschall J, Mermel LA, Classen D, Arias KM, Podgorny K, Anderson DJ, Burstin H, Calfee DP, Coffin SE, Dubberke ER, Fraser V, Gerding DN, Griffin FA, Gross P, Kaye KS, Klompas M, Lo E, Nicolle L, Pegues DA, Perl TM, Saint S,

- Salgado CD, Weinstein RA, Wise R, Yokoe DS. Strategies to prevent central line-associated bloodstream infections in acute care hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(Suppl 2):22-30.
- Mazzola PG, Jozala AF, Novaes LCL, Moriel P, Penna TCV. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. *Braz J Pharm Sci*. 2009;45(2):241-8.
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *CID*. 2011;52(9):162-93.
- Oliveira AC, Paula, AO. Monitorização da adesão à higienização das mãos: uma revisão de literatura. *Acta Paul Enferm*. 2011;24(3):407-13.
- Padovani CM, Graziano KU, Goveia VR. Avaliação microbiológica das diferentes formulações anti-sépticas, polivinilpirrolidona-iodo e clorexidina, após contaminação intencional das almotolias. *Rev Latino-am Enferm*. 2008;16(6).
- Ratti RP, Sousa CP. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009;30(2):137-43.
- Steers E, Foltz EL, Graves VS. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother*. 1959;9:307-11.
- Trabulsi LR, Alterthum F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu; 2008.
- Utyama IKA, Watanabe E, Andrade D, Ito IY. Atividade antimicrobiana *in vitro* do ácido acético e dos vinagres branco e tinto sobre bactérias hospitalares. *Rev Cien Méd biol*. 2006;5(2):111-6.
- Watanabe E, Tanomaru JM, Nascimento AP, Matoba-Júnior F, Tanomaru-Filho M, Ito IY. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an *in vitro* study. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(4):275-9.

Recebido em 25 de março de 2012

Aceito para publicação em 20 de março de 2013

