



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PATOGÊNESE DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA
RELACIONADA AO CATETER VENOSO CENTRAL POR *Staphylococcus
epidermidis* EM NEONATOS CRÍTICOS**

LÍCIA LUDENDORFF QUEIROZ

UBERLÂNDIA – MG
FEVEREIRO – 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LÍCIA LUDENDORFF QUEIROZ

**PATOGÊNESE DE INFECÇÕES DE CORRENTE SANGUÍNEA
RELACIONADA AO CATETER VENOSO CENTRAL POR *Staphylococcus
epidermidis* EM NEONATOS CRÍTICOS**

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

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas (orientadora)

Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (co-orientador)

Dra. Cristiane Silveira de Brito (co-orientadora)

UBERLÂNDIA - MG

FEVEREIRO – 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Q3p
2019

Queiroz, Lícia Ludendorff, 1980

Patogênese de infecções de corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos críticos [recurso eletrônico] / Lícia Ludendorff Queiroz. - 2019.

Orientadora: Rosineide Marques Ribas.

Coorientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.

Coorientadora: Cristiane Silveira de Brito.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1245>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. 2. Recém-nascido. 3. Cateteres. 4. Circulação sanguínea. I. Ribas, Rosineide Marques, 1974, (Orient.). II. Gontijo Filho, Paulo Pinto, 1939, (Coorient.). III. Brito, Cristiane Silveira de, 1980, (Coorient.). IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

CDU: 61

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lícia Ludendorff Queiroz

Patogênese de Infecções de Corrente Sanguínea relacionada ao cateter venoso central por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos críticos

Presidente da banca (orientador): Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas

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

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Dra. Daiane Silva Resende
Patos de Minas, Minas Gerais

Titular: Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia UFU, Uberlândia, Minas Gerais

Dedico este trabalho com todo meu amor aos meus pais por todo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a **Deus**, fonte de esperança, por me fazer forte e perseverante.

Aos meus pais, **Nelson e Shelley**, que são a base da minha educação pela dedicação e amor. Obrigada por estarem comigo a todo o momento (mesmo de longe).

Aos meus irmãos **Leonardo e Natália** pelo torcida e por me entenderem quando estive ausente me dedicando ao trabalho. Natália obrigada também pela ajuda e contruibuição nesse trabalho.

À minha prima-cumadre **Marina de Queiroz Faria**, pela contribuição e ajuda durante a finalização desse trabalho.

Aos familiares e amigos, que sempre torceram para que eu alcançasse meus objetivos.

À Prof.^a Dra. **Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro** que foi a minha primeira incentivadora na pesquisa e acreditou no meu potencial, você é parte disso.

À Prof.^a Dra. **Rosineide Marques Ribas**, por ter acreditado em mim e caminhado comigo, por toda paciência, ajuda, amizade e ensinamentos. Agradeço por me incentivar e acreditar em mim todo o tempo, sendo um exemplo de dedicação e doação à pesquisa científica e à docência. Meu respeito e admiração.

À amiga e co-orientadora **Cristiane Silveira de Brito**, por toda ajuda e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. **Paulo P. Gontijo Filho**, pela co-orientação, pelo exemplo profissional e pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

À Dra. **Daiane Resende** por permitir que eu continuasse com sua pesquisa me dando o suporte necessário.

Aos meus colegas técnicos e professores do Laboratório de Microbiologia UFU/DEMIC pelo apoio e compreensão nesse período.

Aos amigos e colegas do Laboratório MICROMOL/UFU por toda ajuda em especial à **Paola Amaral de Campos** e **Bruna Fuga Araújo** sem vocês eu não conseguiria.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, Dra. **Sabrina Royer** e Dra. **Helisângela de Almeida Silva** pelas grandes contribuições no artigo.

Agradeço ao Prof. **Dr. Jonny Yokosawa** do **Laboratório de Virologia**, em especial a **Dra. Thlema**, por disponibilizar equipamentos ao longo do trabalho.

Agradeço aos membros da banca examinadora: **Dra. Daiane Silva Resende** e **Dr. Geraldo Batista de Melo** por aceitarem com presteza nosso convite e pela contribuição na concretização deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicados, sempre dispostos a dividir conhecimentos, bem como emprestar reagentes e equipamentos, garantindo o bom desenvolvimento do nosso trabalho.

À agência de fomento **FAPEMIG**, pela verba que permitiu a realização desse trabalho.

À todos que de alguma forma me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui.

Muito Obrigada!

RESUMO

Introdução: As infecções de corrente sanguínea (ICS) hospitalares são responsáveis por frequências significativas de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), resultando em hospitalização prolongada e aumento nos custos hospitalares, principalmente em neonatos de baixo peso. **Objetivos:** O presente estudo propôs determinar a patogênese de infecções de corrente sanguínea relacionada ao cateter (ICS-RC) causadas por *Staphylococcus epidermidis* utilizando a técnica de PFGE (“*Pulsed Field Gel Electrophoresis*”) bem como avaliar os fatores de risco para mortalidade entre os neonatos com pesos ≤ 1500 gramas e >1500 gramas. Adicionalmente, foram determinados os fatores de risco para desenvolvimento de ICS causadas por *S. epidermidis* utilizando estudo caso x controles pareados. **Material e métodos:** O estudo incluiu neonatos da UTI do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia durante o período de Outubro de 2010 a agosto de 2012. Para o estudo da patogênese foram utilizadas amostras de *S. epidermidis* recuperadas do sangue, pele no sítio de inserção, canhão do cateter, assim como das mucosas da narina e intestino, a partir de 48 horas até 14 dias da utilização do Cateter ou até obtenção de cultura positiva para *S. epidermidis* e da ponta do cateter obtidas após sua remoção. Foi verificado a presença dos genes *mecA* e o ACME (*Arginine Catabolic Mobile Element*) por reação em cadeia da polimerase (PCR), em *S. epidermidis*. **Resultados:** No total, 125 neonatos desenvolveram ICS (27,0%), com 98 (78,4%) definidos como de natureza hospitalar, totalizando 124 episódios. A sepse precoce acometeu 20% dos neonatos com ICS com 48% de mortalidade, principalmente entre os neonatos com peso ≤ 1500 gramas. A presença de ventilação mecânica e sepse clínica foram os fatores associados com mortalidade entre os neonatos de maior peso. No estudo caso x controle pareados, todas as variáveis analisadas [Tempo de hospitalização ($P < 0,0001$), tempo de ventilação mecânica ($P = 0,0003$), tempo de nutrição parenteral ($P < 0,0001$), tempo de uso de CVC ($P < 0,0001$) e uso de antibióticos ($P < 0,0001$)], exceto uso de CVC foram significativos pela análise univariada. Do total de 53 amostras testadas na PCR, 67,9% foram positivas para o gene *mecA* (todas resistentes a oxacilina) com frequência maior entre as amostras de mucosa 39,9%. Somente 7,6% das amostras apresentavam genes para ACME (caracterizados como ACME tipo II), 17% associadas a pele. Entre 19 casos de ICS primária, a origem da infecção foi identificada em apenas 36,8% dos casos, onde duas foram caracterizadas como intralúmen definitiva, uma extralúmen definitiva e quatro tiveram a origem proveniente das mucosas, definidas como translocação. Na maioria (63,2%) dos casos não foi possível determinar a origem da infecção. A transmissão cruzada foi um evento frequente observado na Unidade. **Conclusão:** Apesar da importância clínica e epidemiológica das ICS em neonatos críticos e da amplitude do estudo, na maioria dos casos não foi possível determinar a origem do micro-organismo presente no sangue e embora tenha sido observada alta diversidade clonal entre as amostras de *S. epidermidis* a transmissão cruzada foi um evento comum.

Palavras-chave: Neonatos críticos, infecção de corrente sanguínea primária, cateter venoso central, patogênese, Elemento Catabólico Móvel de Arginina.

ABSTRACT

Introduction: The hospital bloodstream infections (BSI) are responsible for significant frequencies of morbidity and mortality in Neonatal Intensive Care Units (NICU), resulting in prolonged hospitalization and increased costs, especially in low birth weight infants. **Objective:** The present study proposed to determine the pathogenesis of catheter-related bloodstream infections (CR-BSI) caused by *Staphylococcus epidermidis* using the PFGE technique ("Pulsed Field Gel Electrophoresis ") as well as to evaluate the risk factors for mortality among neonates with weights ≤ 1500 grams and > 1500 grams. **Methods:** The study included neonates from the ICU of Hospital de Federal University of Uberlândia during the period from October 2010 to August 2012. For the study of the pathogenesis, were used samples of *S. epidermidis* recovered from blood, skin at the insertion site, hub, as well as the mucosa of the nostril and gut, from 48 hours to 14 days after the use of the Catheter or until obtaining a positive culture for *S. epidermidis* and catheter tip obtained after removal. In addition, were determined the risk factors for the development of BSI caused by *S. epidermidis* using case study x paired control. In addition to verifying the presence of *mecA* genes and ACME (Arginine Catabolic Mobile Element) by polymerase chain reaction (PCR), in *S. epidermidis*. **Results:** In total, 125 neonates developed BSI (27.0%), with 98 (78.4%) defined as hospital-type, totaling 124 episodes. Sepsis preterm affected 20% of newborns with BSI with 48% mortality, mainly in neonates weighing ≤ 1500 grams. The presence of mechanical ventilation and clinical sepsis were the factors associated with mortality among the heaviest neonates. In the case study x paired control, all variables analyzed [Hospitalization time ($P < 0.0001$), time of mechanical ventilation ($P = 0.0003$), parenteral nutrition time ($P < 0.0001$), CVC use time ($P < 0.0001$) and use of antibiotics ($P < 0.0001$), except CVC use were significant by univariate analysis. From the total of 53 samples tested in the PCR, 67.9% were positive for the *mecA* gene (oxacillin resistant) with higher frequency between the samples of mucosa 39.9%. Only 7.6% of the samples had genes for ACME (characterized as ACME type II), 17% associated with skin. Among 19 cases of primary BSI, the origin of the infection was identified in only 36.8% of the cases, where two were characterized as definitive intraluminal, one definitive extraluminal and four had the origin from the mucous membranes, defined as translocation. In the majority (63.2%) of the cases the origin of the infection could not be determined. The cross-transmission was a frequent event observed in the Unit. **Conclusion:** Despite the clinical and epidemiological importance of the BSI in the critical neonates and the magnitude of the study, in the majority of cases it was not possible to determine the origin of the microorganism present in the blood and although it has been observed high clonal diversity among the *S. epidermidis* samples, the cross-transmission was a common event.

Keywords: Critical neonates, primary bloodstream infection, central venous catheter, pathogenesis, Arginine Catabolic Mobile Element

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rotas de contaminação do cateter..... 15
- Figura 2.** Fluxograma dos casos de Infecção de Corrente Sanguínea em neonatos críticos incluídos no estudo..... 27
- Figura 3.** Perfil clonal de *S. epidermidis* isolados de ICS-RC e sítios incluídos nas análises de patogénese baseadas em PFGE..... 37
- Figura 4.** Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 49 amostras de *S. epidermidis* recuperadas do sangue e canhão do CVC de baseado na eletroforese em campo Pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (similaridade $\geq 80\%$)..... 38

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Seqüências dos “primers” utilizados na reação de PCR para a detecção do ACME.....	24
Tabela 1. Fatores de Risco para mortalidade de neonatos críticos com $\leq 1500g$ e $>1500g$	29
Tabela 2. Fatores de risco para Infecção de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada em neonatos com ≤ 1.500 gramas e >1.500 gramas.....	30
Tabela 3. Sucesso de variáveis pareadas de pacientes com infecção da corrente sanguínea por <i>Staphylococcus epidermidis</i> , casos e seus controles, em UTI Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil.....	31
Tabela 4. Mortalidade em 36 pares de pacientes, com infecção da corrente sanguínea causada por <i>Staphylococcus epidermidis</i> e seus respectivos controles no Hospital de Clínicas de UTI Neonatal da Universidade Federal de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil.....	32
Tabela 5. Fatores de risco de neonatos críticos com infecção de corrente sanguínea por <i>S. epidermidis</i> (caso) versus controles, pareado.....	32
Tabela 6. Frequência do gene <i>mecA</i> , genes para ACME e clones de acordo com o sítio de isolamento do <i>S. epidermidis</i>	33
Tabela 7. Isolados de <i>S. epidermidis</i> de neonatos incluídos nas análises de patogênese de infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central.....	34
Tabela 8. Patogênese da infecção da corrente sanguínea causada por <i>S. epidermidis</i> em neonatos com cateter venoso central.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC: American Type Culture Collection
- ACME: Arginine Catabolic Mobile Element
- BHI: Brain Heart Infusion
- CDC: Center of Disease Control
- CVC: Cateter venoso central
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- DU: Densidade de uso
- EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid
- HC-UFU: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
- ICS: Infecção de Corrente Sanguínea
- ICS-RC: Infecção de Corrente Sanguínea Relacionada ao Cateter
- IRAS: Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
- mec: "Methicillin Resistance"
- MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina
- MRSE: *Staphylococcus epidermidis* Resistente a Meticilina
- NHSN: National Healthcare Safety Network
- NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance System
- OD: Densidade óptica
- PICC: Cateter Central de Inserção Periférica
- PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
- SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome
- SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativa
- TSA: Trypticase Soy Agar
- TSB: Trypticase Soy Broth
- UTIN: Unidade de Terapia Intensiva Neonatal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	19
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
3.1. Hospital	20
3.2. Desenho do estudo	20
3.3. Definições	21
3.4. Identificação das amostras de <i>S. epidermidis</i>	22
3.5. PCR para detecção do gene <i>mecA</i>	22
3.6. Extração do DNA genômico	22
3.7. Detecção do gene <i>mecA</i>	23
3.8. Caracterização do ACME.....	24
3.9. Extração do DNA genômico	24
3.10. Detecção e tipagem do ACME.....	24
3.11. Tipagem molecular por PFGE (Pulsed Field Gel Eletrophoresis)	24
3.12. Análise estatística.....	26
3.13. COMITÊ DE ÉTICA	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE I ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO	53
ANEXO I	68
ANEXO II	69
ANEXO III.....	70
ANEXO IV.....	73

1. INTRODUÇÃO

As infecções de corrente sanguínea (ICS) hospitalares são responsáveis por frequências significativas de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) (POSFAY-BARBE et al., 2008), resultando em hospitalização prolongada e aumento nos custos hospitalares (WEI et al., 2005). Neonatos internados em UTIs apresentam maior susceptibilidade às infecções em função predominantemente da presença de dispositivos invasivos, imaturidade de sistema imune e disfunção de órgãos (MEHTA et al., 2014). Um estudo americano mostrou que 11,4% dos pacientes em UTINs desenvolveram ICS, com cerca da metade (45,7%) associados a neonatos prematuros, com extremo baixo peso ao nascer [$<1000\text{g}$ (gramas)] (STOVER et al., 2001). Outro estudo em Taiwan revelou taxa de ICS semelhante (SU et al., 2007) ao estudo anterior, com taxas um pouco mais elevadas do que observado por Geffers e colaboradores em 2008 na Alemanha, em que 40% dos neonatos com extremo baixo peso desenvolveram ICS.

É importante salientar que existem inúmeros fatores de risco adicionais que tornam os neonatos ainda mais susceptíveis ao desenvolvimento de infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter (ICS-RC), entre eles podemos destacar a duração do cateterismo, a colonização no sítio de inserção do cateter, a manipulação frequente do canhão do cateter, o tipo de curativo utilizado, bem como fatores relacionados a gravidade e doença de base do paciente. Vale enfatizar que em neonatos com peso inferior a 1500g (gramas) cerca de 20% deles desenvolvem esse tipo de infecção (GARLAND et al., 2008), e a literatura mostra que aproximadamente 25,0% da população total de recém nascidos da UTIN são constituídos por esses pacientes (DE OLIVEIRA et al., 2010).

A maioria destas infecções está relacionada a presença de cateteres venosos centrais (CVCs), cuja utilização é frequente, com finalidade de administração de nutrientes e medicamentos por longos períodos de tempo e acesso direto ao sistema vascular (PERLMAN et al., 2007; SERRANO et al., 2007). O CVC é o procedimento invasivo mais utilizado no atendimento ao neonato crítico (PERLMAN et al., 2007; SERRANO et al., 2007). Mas o uso destes dispositivos também está associado com risco considerável de infecção (SAFDAR e MAKI, 2004), mais alto em países em desenvolvimento, com taxa média de 16,1 por 1000 CVC-dias. Em países desenvolvidos como os Estados Unidos a

taxa esta em torno de 6,6 por 1000 CVC-dias (PITTET et al., 2008). No Brasil, apesar de poucos estudos, a incidência dessas infecções é mais elevada do que em hospitais nos Estados Unidos ou Europa com frequência de 22,7 por 1000 CVC-dias (PESSOA-SILVA et al., 2007).

Atualmente as UTINs têm optado pelo uso preferencial do PICC (Cateter Central de Inserção Periférica) pelo fato de poderem permanecer por muitos dias e estarem associados a baixo risco de ICS-RC, quando comparado a outros tipos de CVCs (VERGUNTA et al., 2005). Entretanto a literatura mostra que quando esses cateteres (PICC) são inseridos em neonatos de muito baixo peso pode não haver diferenças significativas entre as taxas de ICS associadas ao cateter (SAFDAR et al., 2004; SAFDAR et al. 2005).

Os estudos mostram que em países industrializados os cocos Gram-positivos estão relacionados frequentemente com infecções em neonatos, com percentuais que variam de 55,0% a 75,0% dos casos (STOLL et al., 2002). Dentro desse grupo o principal patógeno responsável por ICS em neonatos em países desenvolvidos é o *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), seguido pelo *Staphylococcus aureus* (AZIZ et al., 2005; BARTUAL et al., 2005; SHAH e PADBURY, 2014). O destaque é a espécie *Staphylococcus epidermidis*, resultante da presença deste micro-organismo na microbiota da pele e o seu potencial de formar biofilmes no cateter (BECKER et al., 2014). Já em países de baixa e média renda observa-se predominância de bacilos Gram-negativos, dos quais a *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. e *Echerichia coli* são os micro-organismos mais frequentes causadores de infecção. A UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) apresenta característica de UTI de países desenvolvidos, considerando que o *S. epidermidis* é o principal agente de ICS nos neonatos. (RESENDE et al, 2011). O *S. epidermidis* pode colonizar facilmente a mucosa desses pacientes, e translocar para o sangue. Como a pele do neonato é mais fina e não é totalmente queratinizada, o micro-organismo pode penetrar mais facilmente. Essa colonização da pele pode dificultar a interpretação das hemoculturas, e os pesquisadores tem utilizado uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para minimizar esse problema (SRIVASTAVA; SHETTY, 2007).

Como mencionado, o CVC está entre os dispositivos mais importantes no atendimento de excelência ao neonato crítico, portanto a patogênese das infecções

relacionadas aos CVC é multifatorial e complexa. Os cateteres venosos podem ser colonizados por via hematogênica, a partir de infecções em outros sítios, nas bacteremias secundárias, translocação da mucosa intestinal ou através da infusão de fluidos (contaminação intrínseca) (GARLAND et al., 2008).

Os dados disponíveis sugerem que a maioria das infecções resulta da colonização da pele no sítio de inserção (75,0-90,0%), considerada a principal fonte para colonização e infecção de cateter de curta duração, do canhão do cateter (66,0%), e migração destes por vias extralúmen e intralúmen nos CVCs de curta (≤ 7 dias) e longa duração (> 7 dias), respectivamente (CRUMP et al., 2000). Entretanto, em pacientes com ICS, o fluido infundido contaminado, também pode funcionar como fonte de colonização da ponta de cateter nas bacteremias primárias (GARLAND et al., 2005). Vale reforçar que em neonatos prematuros a permeabilidade intestinal é maior e juntamente com a ausência de uma microbiota normal bem estabelecida, pode levar a translocação deste micro-organismo do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (DONNELL et al., 2002). O desenvolvimento da microbiota do neonato inicia no momento do nascimento e é influenciado por vários fatores como: tipo de parto, idade gestacional, tipo de alimentação e uso de antibióticos (HAMMERMAN; BIN NUN; KAPLAN, 2004).

Resumindo, as quatro vias principais e bem descritas pelas quais o micro-organismo pode acessar a ponta dos cateteres são: extraluminar, intraluminar, hematogênica ou via infusões contaminadas. As rotas de contaminação do cateter estão representadas na figura 1.

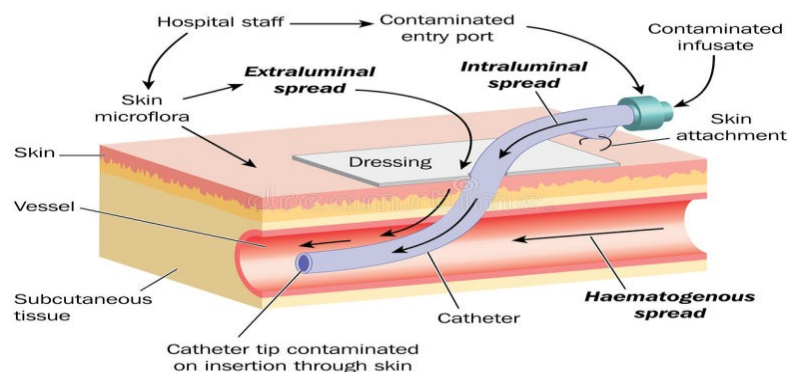


Figura 1. Rotas de contaminação do cateter.
Fonte: (LEGGER, 2019)

Para melhor conhecimento da patogênese das ICS-RC é fundamental determinar a similaridade genética das linhagens de micro-organismos recuperados do canhão e sítio de inserção do CVC, além das mãos dos profissionais de saúde (MARTIN-LOZANO et al, 2002).

O uso de técnicas moleculares representa um potencial discriminatório adicional, principalmente em infecções onde o patógeno pode fazer parte da microbiota normal, como é o caso dos SCN. Além de possuírem especificidade e sensibilidade mais refinadas, são capazes de estabelecer relações genéticas entre as amostras obtidas durante a pesquisa da patogênese das ICS-RC (O'GRADY et al., 2002). O “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) é considerado o padrão ouro em estudos epidemiológicos, devido a sua alta capacidade discriminatória (MIRAGAIA et al., 2008).

Além disso, progressos recentes na análise genômica e epidemiologia molecular, mostram a enorme flexibilidade que o *S. epidermidis* tem de gerar novas linhagens fenotípicas e genotípicas. Este micro-organismo possui grande capacidade de aquisição de genes incluindo determinantes de resistência aos antimicrobianos, genes de virulência e recombinação genética (OTTO et al., 2012; CHONG et al., 2016). A frequência de amostras de *S. epidermidis* com resistência aos beta-lactâmicos em UTIN no mundo todo é elevada, com cerca de 60-85% comportando-se como do fenótipo MRSE (Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*) (DIEKEMA et al., 2001; BECKER et al., 2014). Esta resistência é conferida pelo gene *mecA*, que codifica a proteína ligante de penicilina PBP2a, com baixa afinidade com a meticilina, e faz parte de um cluster de genes associados a elementos móveis existentes no seu genoma, assim como no de *S. aureus*, denominado “Staphylococci Chromosomal Cassette (SCC*mec*)” (CHAMBERS, 1997; GORDON et al., 2012). Um diagnóstico mais preciso para sepse em neonatos é de extrema importância como medida de prevenção, uma vez que pode reduzir o uso desnecessário de antibióticos (KILBRIDE, 2003). O uso desnecessário desses medicamentos leva a alterações tanto na microbiota endógena quanto patogênica, favorecendo sem dúvida a seleção de micro-organismos multirresistentes (ROGUES et al., 2007).

Além do SCC*mec*, outros elementos SCC tem sido descritos em estafilococos que transportam genes importantes de sobrevivência ou virulência, como “arginine catabolic mobile element” (ACME), operon que está ligado ao aumento da capacidade desta espécie

colonizar a pele humana e as superfícies mucosas (DIEP et al., 2006; BARBIER et al., 2010). ACME foi identificado primeiramente em amostras de MRSA USA300 e parece ter sido transferido de amostras de *S. epidermidis* para o *S. aureus*. Este alótipo é encontrado em *S. epidermidis* em alta frequência. Particularmente associado ao complexo clonal CC2, de origem hospitalar (DU et al., 2013). O ACME é composto por dois grandes grupos de genes: O cluster *arc* (ARCC-ArgR) e o cluster *opp3* (*opp3A-opp3E*). De acordo com a presença /ausência desses dois grupos, três tipos ACME têm sido relatado até agora: ACME tipo I (possuindo tanto clusters *arc* e *opp3*), tipo II (que possui apenas o conjunto de *arc*) e tipo III (possuindo apenas o cluster *opp3*) (DIEP et al., 2006; BARBIER et al., 2010). Em contraste aos estudos realizados com *S. aureus*, a presença e função ACME no SCN ainda não foram esclarecidas o suficiente (MIRAGAIA et al., 2007; BARBIER et al., 2010).

Embora o *S. epidermidis* tenha alta diversidade genética, alguns pulsotipos de *S. epidermidis* resistente à meticilina foram definidos por PFGE (MIRAGAIA et al., 2002; NUNES et al., 2005). O sucesso destes clones pode ser explicado pelas vantagens de colonização, tais como a produção de biofilme e síntese de proteínas extracelular, ou por fatores envolvidos na interação com mecanismos de defesa do hospedeiro (OTTO, 2009). No entanto, não é claro o quanto esses genótipos podem disseminar clonalmente ou se genes de virulência são transferidos horizontalmente entre as estirpes.

As infecções hospitalares causadas por *S. epidermidis*, principalmente a sepse em neonatos, representam um peso significativo em termos de morbidade e custos em unidades críticas de hospitais de países desenvolvidos e em muitas unidades críticas de países em desenvolvimento, como a existente no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). A presença cada vez maior de amostras resistentes à meticilina/oxacilina é uma realidade e resulta em dificuldades no tratamento destas infecções. Embora intervenções para controle destas infecções sejam usualmente simples, efetivas e de baixo custo em países desenvolvidos, o mesmo não acontece naqueles em desenvolvimento em decorrência particularmente de problemas sociais, precariedade do sistema de saúde e poucos recursos humanos (DE SOUSA et al., 2018).

Considerando a magnitude do problema de infecção, o CDC (Center of Disease Control) criou o “National Nosocomial Infection Surveillance System” (NNISS) com a finalidade de monitorar as IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde)

(NOGUEIRA JUNIOR et al., 2014), passando essa vigilância epidemiológica a ser realizada pelos serviços de controle de infecção em todo o mundo (FARHAT, 2000). Embora com custo financeiro mais elevado, a vigilância mais recomendada é aquela preconizada pelo NHSN (National Healthcare Safety Network) sendo utilizada em muitos países (DUDECK et al., 2011). Em síntese, é um sistema de vigilância prospectivo, em que os fatores de risco são relacionados as infecções, permitindo maior comparação entre as taxas de infecção em diferentes hospitais (ROSENTHAL et al, 2012). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária é o órgão que recebe as informações dos programas de vigilância epidemiológica dos serviços de controle de infecção dos estados brasileiros. Entretanto nessa área ainda há muito trabalho a ser realizado para que os resultados possam ser mais otimistas.

O conhecimento da patogênese de ICS-RC é essencial para a elaboração de estratégias mais eficazes de prevenção e controle dessas infecções. Contudo, poucos estudos têm conseguido determinar quais vias levam a essas infecções, bem como tem utilizado técnicas moleculares para melhor esclarecê-las. Com essa pesquisa poderemos caracterizar por epidemiologia molecular a patogênese de ICS-RC causadas por *S. epidermidis* em neonatos críticos. Além disso, permite ainda verificar se as amostras isoladas têm relação com clones emergentes e poderá fornecer subsídios para políticas de prevenção e controle dessas infecções. Adicionalmente, para avaliar possíveis novas estratégias para combater e tratar estas infecções, é preciso compreender a relação entre os estilos de vida comensal e infeccioso desta bactéria, para isso há a necessidade de investigação mais precisa dos determinantes que garantam a sobrevivência de *S. epidermidis* no seu habitat natural, o qual irá incluir mais notavelmente o desenvolvimento e capacidade de colonização da pele, bem como seus fatores de virulência.

Estratégias de prevenção de ICS-AC (associadas à CVCs) são baseadas no conhecimento da patogênese dessas infecções e medidas que diminuem o risco de colonização da pele e do canhão do cateter, as quais tem impacto significativo na redução das taxas das mesmas (CICALINI et al., 2004).

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de realizar estudos que permitam esclarecer a patogênese de ICS em neonatos críticos e compreender melhor a adaptabilidade ao hospedeiro e disseminação de genes em *S. epidermidis*, são propostos os seguintes objetivos:

- Determinar os fatores de risco para o desenvolvimento de ICS por *S. epidermidis* em neonatos críticos bem como a mortalidade atribuída através de um estudo casos versus controles pareados;
- Verificar o papel potencial da colonização da pele no sítio de inserção do CVC, do canhão, das pontas do cateter e da mucosa intestinal na patogênese das ICS-RC por *S. epidermidis*;
- Determinar a frequência de resistência das amostras de *S. epidermidis* à oxacilina, bem como a presença do gene *mecA*;
- Determinar a distribuição dos tipos de ACME dentre as amostras de *S. epidermidis*;
- Determinar a patogênese de ICS-RC causadas por *S. epidermidis* utilizando a técnica de PFGE.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Hospital

O estudo foi realizado no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), em conjunto com profissionais do laboratório de microbiologia do hospital e laboratório de microbiologia da Universidade. O HC-UFU, situado na região do Triângulo Mineiro, caracteriza-se como instituição de ensino, com 530 leitos, que oferece nível terciário de atendimento. Hoje a UTIN compreende 15 leitos e faz parte do Berçário de Alto Risco da instituição.

3.2. Desenho do estudo

Foram avaliadas amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue, ponta e canhão do CVC, pele e mucosas de neonatos hospitalizados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do HC-UFU recuperadas durante o período de outubro de 2010 a agosto de 2012. Foi realizado monitoramento diário em busca de infecção de corrente sanguínea associada ao uso de CVC com o preenchimento de uma ficha epidemiológica baseada no NHSN com dados epidemiológicos e demográficos de cada neonato incluído no estudo (Anexo I), sendo incluídos apenas aqueles com autorização dos respectivos responsáveis através de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II).

As técnicas de coleta, cultivo e isolamento dessas amostras estão descritas no anexo III. Essa etapa do estudo foi realizada pela pesquisadora Dra. Daiane Resende Silva.

Foi realizado estudo caso x controles pareados para determinar os fatores de risco para desenvolvimento de ICS causada por *S. epidermidis*, bem como a mortalidade atribuída nesses casos. As variáveis de pareamento foram: Idade gestacional não excedendo 2 semanas, sexo, peso ao nascer não excedendo 150 gramas, tempo de risco não excedendo 10 dias e apgar em 5 minutos ± 2 . O tempo de risco foi considerado para os controles como sendo o tempo total de internação compatível com o tempo do caso que é o tempo de internação até o primeiro episódio de sepse por *S. epidermidis*.

Definição de caso: Neonatos com ICS por *S.epidermidis*.

Definição de controles: Neonatos sem infecção.

3.3. Definições

ICS-RC primária: identificada quando se obteve hemocultura positiva para o mesmo micro-organismo presente na ponta do cateter ou no intestino e foi observada ausência clínica e microbiológica de outra fonte de infecção, com sintomatologia (ÖNCÜ et al., 2003; DIGIOVINE et al., 1999) (temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ e com sinais clínicos de sepse, incluindo apneia, instabilidade da temperatura, letargia, intolerância alimentar, agravamento do desconforto respiratório ou instabilidade hemodinâmica) (CHONG et al., 2016).

ICS-AC: Bacteremia com critério microbiológico, manifestações clínicas de sepse, mas sem confirmação laboratorial do micro-organismo na ponta do CVC (MAHIEU et al., 2001).

ICS-RC definitiva: Para neonatos com ICS sem nenhuma fonte identificada, definiu-se ICS-RC definitiva quando a cultura de uma amostra de sangue periférico é positiva para o mesmo organismo que está colonizando a pele no sítio de inserção, canhão ou ponta do cateter com sangue confirmado por subtipagem molecular (GARLAND et al., 2008).

Provável intralúmen / extralúmen: quando uma amostra de sangue periférico foi positiva para *S. epidermidis*, e a concordância por especiação foi obtida entre aqueles recuperados da cultura da ponta do cateter, canhão ou do sítio de inserção do cateter, sem a subtipagem molecular. Quando o mesmo micro-organismo foi detectado no canhão e no sítio de inserção, as datas de isolamento foram consideradas.

Translocação: A translocação microbiana foi determinada se os micro-organismos isolados da hemocultura fossem indistinguíveis daqueles transportados no reto ou narina dentro de duas semanas antes do episódio da ICS. Quando o mesmo micro-organismo também estava presente na ponta do cateter ou no sítio de inserção, foram consideradas datas de isolamento.

Determinação da patogênese: ICS-RC foi classificada como adquirido extraluminalmente quando se observaram similaridades entre os isolados recuperados da ponta do cateter, amostras de sangue e amostras de sítio de inserção. A ICS-RC foi classificada como adquirida por via intraluminal se a similaridade fosse demonstrada apenas entre os isolados recuperados de amostras de canhão, pontas de cateter e sangue. Caso os resultados sugerissem mais de uma via de aquisição, a patogênese da ICS foi classificada como indeterminada.

Densidade de Uso de CVC: foi obtida dividindo-se o número de CVC/dia pelo número de pacientes/dia no mesmo período. (BRACHINE et al., 2018).

3.4. Identificação das amostras de *S. epidermidis*

No momento da coleta as amostras de *S. epidermidis* foram incluídas na patogênese identificadas bem como sua resistência determinada no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU pelo sistema automatizado Vitek II® (Biomérieux, França). Todas as amostras obtidas foram preservadas em tubos contendo BHI “Brain Heart Agar” acrescidos de glicerol 15% e mantidos a -80°C. As amostras de pele e mucosas foram identificadas por técnicas clássicas padronizadas.(AnexoIII)

3.5. PCR para detecção do gene *mecA*

3.6. Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico das amostras de *S. epidermidis* foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. Os *S. epidermidis* foram cultivados em ágar BHI a 35° C por 24 horas. Duas a três colônias da cultura foram suspensas em 500µL de água milli-Q e centrifugadas por 10 minutos a 5000xg (7.500rpm) para obtenção do pellet. O pellet foi suspenso em 180µL da solução de lisozima (20 mg/mL de lisozima; 20mM Tris-HCl, ph 8,0; 2mM EDTA; 1,2% Triton) e foi incubado por 30 minutos a 37° C. Em seguida, adicionou-se 20µL de proteinase K e 200µL do tampão AL e agitou-se em vortex. A mistura foi incubada a 56° C por 30 minutos e, em seguida, mais 15 minutos a 95° C, e então centrifuga brevemente para remoção das gotas da tampa. Adicionou-se 200µL do tampão AL na amostra, homogeneizou-se por vortex por 15 segundos, e incubou-se a 70° C por 10 minutos. A solução foi centrifugada brevemente, adicionando-se 200µL de etanol (96-

100%) e homogeneizando por vortex por 15 segundos seguidos de outra centrifugação breve.

A mistura foi aplicada à coluna Mini spin QIAamp e centrifuga-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. A coluna foi transferida para um tubo limpo e o conteúdo filtrado foi descartado. Adiciona-se a coluna 500µL de tampão AW1 e centrifuga-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. A coluna foi novamente transferida para outro tubo descartando o filtrado. Adicionou-se 500µL de tampão AW2 à coluna e centrifugou-se a velocidade máxima 20.000xg (14.000rpm) por 3 minutos. A coluna foi colocada em outro tubo, o filtrado descartado e novamente centrifugou-se por 1 minuto na velocidade máxima para se eliminar contaminação com o tampão AW2.

Para eluição do DNA, a coluna foi transferida a outro tubo e então adicionado 100µL de tampão AE (tampão de eluição), incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida, centrifugou-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. O processo foi repetido, adicionando-se 100µL de tampão AE prolongando a incubação por 5 minutos seguindo-se outra centrifugação. O DNA extraído foi será então conservado a -20 ° C até a utilização.

3.7. Detecção do gene *mecA*

A determinação do gene *mecA* foi realizada utilizando-se o método de PCR endpoint descrito por Kondo et al. (2007). A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, programado de acordo com as seguintes etapas: Pré-desnaturação a 95°C/5min, 30 ciclos desnaturação (94°C/1min); anelamento (58°C/30s) e extensão (72°C/1min). Finalmente, foi feita uma extensão final (72°C/10min). A eletroforese foi corrida a 90 V por cerca de 90 minutos em agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE 0,5X. O gel foi corado com 5µL de SYBR® Safe (AppliedBiosystems) para cada 100 mL de tampão e então visualizado usando um transluminador. Os “primers” utilizados na reação de PCR para identificação do *mecA* foram: MRS₁ (5'-TAG AAA TGA CTG AAC GTC CG-3') e MRS₂ (5'-TTG CGA TCA ATG TTA CCG TAG-3') tamanho do amplicon (pb) 154 (IORIO et al., 2011).

3.8. Caracterização do ACME

3.9. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico das amostras de *S. epidermidis* foi realizada conforme descrito no item 3.6.

3.10. Detecção e tipagem do ACME

Os genes *ACME-arcA* e *ACME-opp3AB* foram usados como marcadores dos clusters *ACME-arc* e *ACME-opp3* respectivamente. A reação em cadeia da polimerase foi realizada para as amostras de *S. epidermidis* selecionadas neste trabalho, seguindo o protocolo descrito por Barbier et al. (2010). Os *primers* utilizados estão descritos quadro 1. A amplificação foi realizada no *Eppendorf Mastercycler*, sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, 10 ciclos com desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55.5 °C por 30 segundos, extensão a 68°C por 30 segundos e extensão final a 68°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada como descrito no item 4.5.2. ACME foi classificado como tipo I quando houvesse a presença dos clusters *ACME-arcA* e *ACME-opp3AB*, tipo II quando houvesse apenas a presença do locus *ACME-arcA* e tipo III quando houvesse apenas a presença do *ACME-opp3A*. A amostra de *S. aureus* USA300-FPR3757 foi utilizada como controle positivo.

Quadro 1. Sequências dos “primers” utilizados na reação de PCR para a detecção do ACME

Gene alvo ^{1,2}	Primer	Sequências (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>arcA-F</i>	F	GAGCCAGAAGTACGCGAG	671
	R	CACGTAACTTGCTAGAACGAG	
<i>opp3-F</i>	F	GCAAATCTGTAAATGGTCTGTT	1183
	R	GAAGATTGGCAGCACAAAGTG	

F = Forward; R = Reverse

Referência: SALGUEIRO, V. C. et al. (2017)

3.11. Tipagem molecular por PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

O protocolo experimental utilizado nesse estudo para tipagem molecular pela técnica de PFGE foi formulado a partir das metodologias propostas por Goering (2010) e McDougal et al. (2003). Foram utilizadas amostras de *S. epidermidis* obtidas a partir da corrente

sanguínea do neonato e daqueles detectados concomitantemente na ponta, no sítio de inserção, no canhão do CVC usado pelo mesmo e das mucosas do intestino e narina dos neonatos. As amostras inicialmente foram cultivadas em meio de ágar BHI a 37°C, por 24 horas. Cinco colônias de cada amostra teste de *S. epidermidis* foram inoculadas em 3mL de caldo TSB e incubada *overnight* (16-18 horas) a 37°C, sob agitação vigorosa a 200rpm. Após o período de incubação, a medida da densidade óptica (OD) da suspensão bacteriana resultante foi ajustada para 0,9 - 1,10 (OD_{640nm}). Uma alíquota de 200 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo *ependorf*, centrifugada a 12.000xg, 4°C por 2 minutos e o sobrenadante completamente descartado.

O precipitado foi gentilmente ressuspensionado em 200µL do tampão de lise - EC (6mM Tris HCl, 1M NaCl, 100 mM EDTA, Brij 58 0,5%, deoxicolato de sódio 0,2%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%). Imediatamente, 200 µL de Agarose *low melting point* (Ludwig Biotecnologia, Brasil) 2% (p/v) preparada em tampão EC e previamente equilibrada a 55°C foram adicionadas a suspensão celular, seguido por 30 µL de lisostafina (solução estoque a 1mg/mL diluído em água miliQ). A solução foi rapidamente homogeneizada, dispensada em moldes e mantida à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos até a solidificação.

Os blocos de Agarose foram removidos e transferidos para tubos contendo 10mL de tampão EC e incubados a 37° C, sob leve agitação (50rpm), durante 1h. Após a incubação, o tampão EC foi substituído por tampão Tris-EDTA (TE, 10mM Tris HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) e os tubos novamente incubados a 55°C, sob agitação a 50rpm por 1h. O TE foi então descartado, substituído por uma nova solução do tampão e os tubos incubados *overnight*, a 37°C, sob agitação a 50rpm. A etapa de lavagem se repetiu por pelo menos mais 2 vezes, a 37°C, sob agitação a 50rpm durante h cada. Os blocos foram então estocados a 4°C, em tampão TE, até a digestão enzimática.

Para digestão do DNA, uma pequena parte do bloco de Agarose (~2 mm) foi incubada em 4 µL da solução tampão da enzima *SmaI* 10X (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e mantida a 25° C por 4h. Essa solução foi desprezada, e uma nova solução acrescida de 30U da enzima de restrição *SmaI* foi adicionada em cada tubo. A reação foi incubada a 25° C por 10h.

A eletroforese foi realizada em gel de Agarose 1% (Agarose Campo Pulsado, Agargen, Brasil) preparado em TBE 0,5X. Os blocos de Agarose já digeridos foram colocados diretamente nos poços somente após a solidificação do gel. A corrida eletroforética foi realizada no aparelho CHEF DR®III (BioRad, Estados Unidos), utilizando-se a solução tamponante TBE 0,5X, nas seguintes condições: pulso inicial de 5 segundos e final de 40

segundos, ângulo de 120°, 200 V (6V/cm), a temperatura de 12° C durante 21 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL sob leve agitação por 45 minutos, e então visualizado usando um transluminador e posteriormente fotografado. Os padrões de banda foram analisados por intermédio da comparação visual entre as amostras e foram classificados em pertencentes a um único clone quando apresentarem o mesmo tamanho e número de bandas, subclones quando apresentarem diferenças de uma a seis bandas e clones diferentes quando apresentarem mais de seis bandas de diferença. Além disso, as bandas foram analisadas pelo programa BioNumerics 7.5 software (Applied Maths, Bélgica), usando o coeficiente Dice de similaridade e o método de “*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*” (UPGMA) para análise dos agrupamentos (dendrogramas).

3.12. Análise estatística

As análises estatísticas para análise univariada e multivárias foram realizadas pelo Software GraphPad considerando como significativo resultados $P \leq 0,05$.

3.13. COMITÊ DE ÉTICA

As amostras de *S. epidermidis* foram recuperadas de pacientes com diagnóstico positivo de sepse, hospitalizados na UTI Neonatal do HC-UFU, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFU sob o número de protocolo 464/10 (Anexo IV).

4. RESULTADOS

Durante o período de estudo de Outubro/2010 a Agosto/2012 foi realizada vigilância epidemiológica da incidência de ICS em neonatos críticos da UTI N do HC- UFU, através da metodologia do NHSN. 89 neonatos foram excluídos da pesquisa por não serem caracterizados como pacientes novos. Assim, 462 neonatos foram incluídos nesta avaliação dos quais 125 (27,0%) tinham ICS. A sepse clínica de origem hospitalar foi a que apresentou maior número de casos (n=98). A sepse precoce acometeu 20,0% dos neonatos com ICS. Foram observados 124 episódios de infecção entre aqueles neonatos com sepse clínica, dos quais 42 (42,4%) foram por *S. epidermidis*. A mortalidade total foi relativamente baixa (26,4%) sendo maior entre os neonatos com sepse precoce (48,0%). Essas informações estão descritas no fluxograma abaixo (Figura 2).

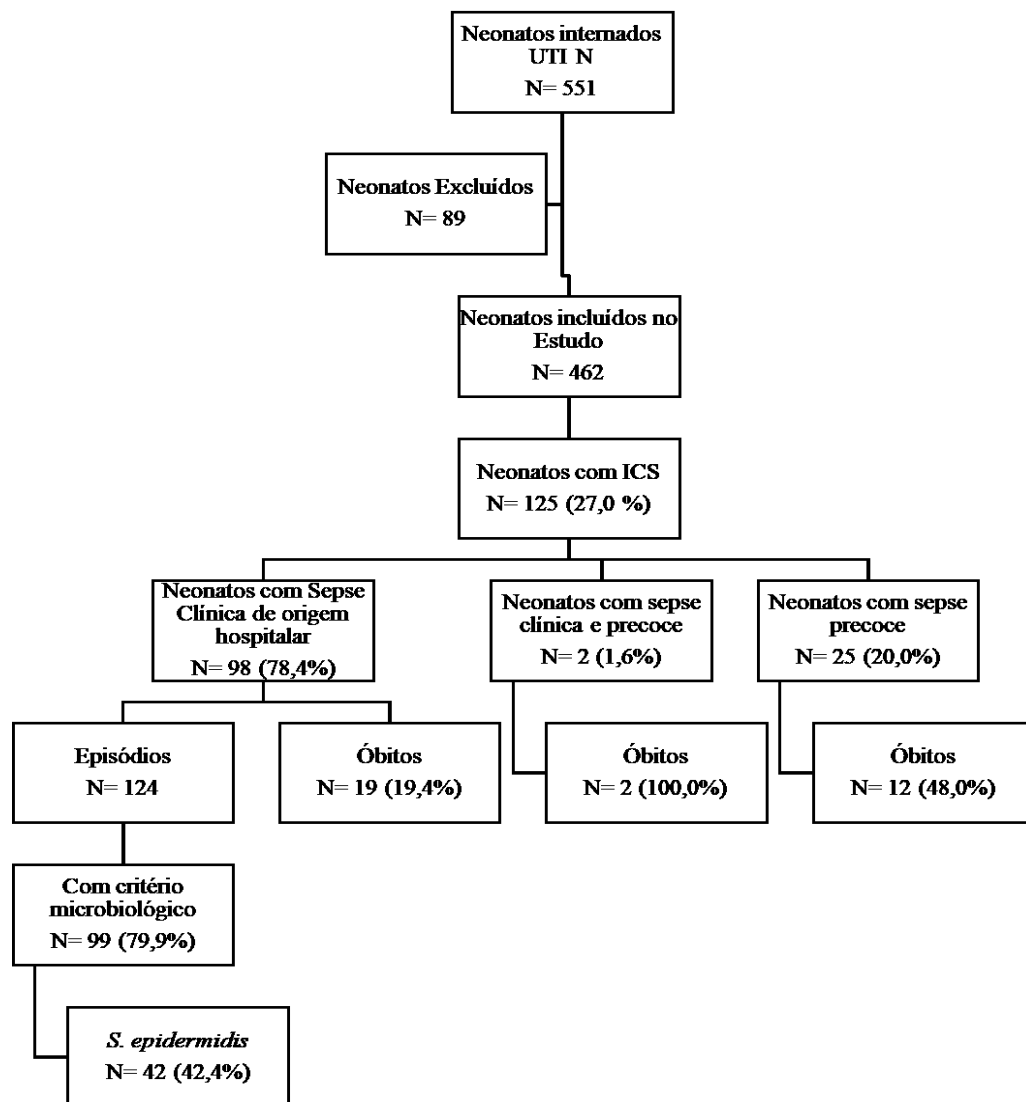


Figura 2: Fluxograma dos casos de Infecção de Corrente Sanguínea em neonatos críticos incluídos no estudo.

A tabela 1 mostra os fatores de risco para mortalidade de neonatos críticos com peso $\leq 1500\text{g}$ e $>1500\text{g}$. No total, a maioria dos neonatos tinha idade gestacional < 37 semanas (74,2%), estavam em uso de CVC por mais de oito dias (54,3%) e estavam hospitalizados por mais de sete dias (64,5%). Observou-se que 38,3% dos neonatos tinham peso $\leq 1500\text{g}$ com mortalidade total de 22,6%. Nesse grupo, a mortalidade foi associada significativamente com a sepse precoce em neonatos com uso de ventilação mecânica. Já nos neonatos com mais de 1500g somente 9,8% deles evoluíram para o óbito e foi associado estatisticamente ao uso de ventilação mecânica e a presença de sepse.

A tabela 2 avalia os fatores de risco associados principalmente ao tempo de hospitalização para desenvolvimento de ICS laboratorialmente confirmada em 74 neonatos críticos, discriminando entre pacientes com peso $\leq 1500\text{g}$ e $>1500\text{g}$. Embora nenhum dos fatores avaliados tenha sido significativo pela análise univariada, observou-se que independentemente do peso dos neonatos eles permaneceram internados por um período superior a 15 dias até o diagnóstico do primeiro episódio de sepse, e no grupo com $>1500\text{g}$ observou-se também tempo longo de hospitalização até o diagnóstico de sepse por *S. epidermidis* (21,8 dias). O tempo de hospitalização total e de uso de CVC também foi extremamente estendido.

Tabela 1. Fatores de Risco para mortalidade de neonatos críticos com $\leq 1500\text{g}$ e $>1500\text{g}$

Fatores de Risco	Total neonatos N=462 (%)	Neonatos $\leq 1500\text{g}$ N= 177 (38,3%)		* <i>p</i>	Neonatos $>1500\text{g}$ N= 285 (61,7%)		* <i>p</i>
		Óbito	Alta		Óbito	Alta	
		N=40 (%)	N=137 (%)		N=28 (%)	N=257 (%)	
Idade gestacional < 37 semanas	343 (74,2)	39 (97,5)	136 (99,3)	0,4	8 (28,6)	160 (62,3)	0,009
CVC ≥ 8 dias	251 (54,3)	19 (47,5)	123 (89,8)	<0,0001	13 (46,5)	96 (37,4)	0,4137
Nutrição Parenteral	217 (47,0)	30 (75,0)	117 (85,4)	0,15	6 (21,4)	64 (24,9)	0,81
Ventilação Mecânica	162 (35,1)	24 (60,0)	57 (41,6)	0,04	18 (64,3)	63 (24,5)	<0,0001
Tempo hospitalização ≥ 7 dias	298 (64,5)	9 (22,5)	128 (93,4)	<0,0001	17 (60,7)	144 (56,0)	0,69
Sepse	125 (27,0)	22 (55,0)	56 (40,9)	0,14	11 (39,3)	36 (14,0)	0,0019
Sepse por S,epidermidis	37 (29,6)	4 (18,2)	18 (32,1)	0,79	3 (27,3)	12 (33,3)	0,17
Sepse precoce	27 (21,6)	12 (54,5)	8 (14,3)	0,001	2 (18,2)	5 (13,9)	0,14
Sepse clínica	26 (20,8)	2 (9,1)	17 (30,4)	0,25	0	7 (19,4)	1

CVC: Cateter venoso central **p* = $\leq 0,05$

Tabela 2. Fatores de risco para Infecção de corrente sanguínea laboratorialmente confirmada em neonatos com ≤ 1.500 gramas e > 1.500 gramas

Fatores de risco	Total de pacientes	Pacientes	Pacientes	P
	N= 74 (%)	≤ 1.500 gramas N= 41 (%)	> 1.500 gramas N= 33 (%)	
Tempo de hospitalização até diagnóstico de sepse (X \pm SD, dias)	15,6	15,4 \pm 9,97	15,9 \pm 12,50	0,8446
Tempo de hospitalização até diagnóstico de sepse por <i>S. epidermidis</i> (X \pm SD, dias)	18,7	15,8 \pm 10,37	21,8 \pm 14,15	0,1012
Tempo de hospitalização (X \pm SD, dias)	41,8	39,7 \pm 19,43	44,5 \pm 57,29	0,3637
Tempo de uso de CVC (X \pm SD, dias)	33,2	33,1 \pm 15,07	33,3 \pm 27,17	0,4398
Mortalidade total	19	10 (25,6)	9 (27,2)	0,7952 (0,8602)
Número de episódios de sepse	96*	52	44	
Episódios de Sepse por <i>S. epidermidis</i>	42 (43,7)	23 (44,2)	19 (43,2)	1,0000 (1,044)
Episódios de Sepse por outro micro-organismo	54 (56,3)	29 (55,8)	25 (56,8)	1,0000 (0,9583)

*3 episódios foram mistos; CVC: Cateter venoso central.

Na tabela 3 encontram-se as taxas de sucesso no pareamento das variáveis consideradas nesse estudo para análise dos fatores de risco para ICS por *S. epidermidis* (casos) e neonatos sem infecção (controles). Entre as variáveis consideradas para o pareamento incluiu-se idade gestacional com diferença não excedendo duas semanas, sexo, peso ao nascer não excedendo 150g, tempo de risco não excedendo 10 dias e Apgar nos primeiros 5 minutos não excedendo uma variação de 2. A taxa de sucesso das variáveis usadas no pareamento entre casos e controles foi de 89,4% e as variáveis idade gestacional e tempo de risco tiveram uma taxa de 100% no sucesso do seu pareamento. Somente a variável sexo apresentou taxa de sucesso de pareamento de 66,7%.

Tabela 3. Sucesso de variáveis pareadas de pacientes com infecção da corrente sanguínea por *S. epidermidis*, casos e seus controles, em UTI Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil

Variáveis	Total de Pares (N)	Número de Pares Alcançados	Sucesso alcançado (%)
Idade Gestacional com diferença não excedendo 2 semanas	36	36	100
Sexo	36	24	66,7
Peso ao nascer não excedendo 150g	36	33	91,7
Tempo de Risco* não excedendo 10 dias	36	36	100
Apgar em 5 minutos \pm 2	36	32	88,9
Total	180	161	89,4

* Tempo da internação até a ICS (casos)

Embora a mortalidade não tenha sido elevada entre os pacientes deste estudo, foi feita análise da mortalidade atribuída a ICS por *S.epidermidis* nos 36 pares de pacientes (tabela 4). A taxa de mortalidade no grupo caso foi de 16,7% (6/36) enquanto três controles morreram, correspondendo uma taxa de 8,3% (3/36), assim, a taxa de mortalidade atribuível a ICS-RC por *S. epidermidis* foi 8,3% (3/36).

Tabela 4. Mortalidade em 36 pares de pacientes, com infecção da corrente sanguínea causada por *Staphylococcus epidermidis* e seus respectivos controles no Hospital de Clínicas de UTI Neonatal da Universidade Federal de Uberlândia, Estado de Minas Gerais, Brasil

Casos	Controles		
	Óbitos	Sobreviveram	Total
Óbitos	3	3	6
Sobreviveram	6	24	30
Total	9	27	36

Entre todos os pacientes com ICS por *S. epidermidis*, a maioria (96%) resistente a oxacilina, todas as variáveis analisadas [Tempo de hospitalização ($P < 0,0001$), tempo de ventilação mecânica ($p=0,0003$), tempo de nutrição parenteral ($P < 0,0001$), tempo de uso de CVC ($P < 0,0001$) e uso de antibióticos ($P < 0,0001$)], exceto uso de CVC foram significativos pela análise univariada. Apesar de 94,4% dos pacientes estarem em uso de CVC não houve diferença significativa entre caso e controle, entretanto vale ressaltar que o tempo de hospitalização (30,6 dias), nutrição parenteral (14,5 dias) e CVC (23,1 dias) foram extremamente longos na população estudada. Foi observada alta utilização de CVC em ambos os grupos de neonatos (Tabela 5).

Tabela 5. Fatores de risco de neonatos críticos com infecção de corrente sanguínea por *S. epidermidis* (caso) versus controles, pareados.

Fatores de risco	Total	Caso	Controle	*p	OR (IC)
	n= 72 (%)	N= 36 (%)	N=36 (%)		
Tempo hospitalização total, d, Média ± DP	30,6 ± 20,6	43,0 ± 21,8	18,2 ± 8,5	<0,0001	ND
Tempo VM, d, Média ± DP	6 ± 9,5	8,0 ± 11,7	3,1 ± 5,3	0,003	ND
Tempo NP, d, Média ± DP	14,5 ± 13,1	20,3 ± 14,9	8,6 ± 7,6	0,0003	ND
Tempo CVC, d, Média ± DP	23,1 ± 16,2	33,0 ± 16,1	13,3 ± 8,7	<0,0001	ND
Uso de CVC	68 (94,4)	36 (100,0)	32 (88,9)	0,11	10,1 (0,52-195,1)
Uso de Antibiótico	59 (81,9)	36 (100,0)	23 (63,9)	0,0001	41,9 (2,4-740,1)
DU CVC	0,76	0,77	0,73	ND	ND

*p= ≤0,05 VM: Ventilação mecânica; NP: Nutrição parenteral; CVC: Cateter venoso central; DU: Densidade de uso; OR: "Odds ratio"; DP: Desvio padrão ND: Não determinado.

Do total de 53 amostras testadas na PCR, 67,9% foram positivas para o gene *mecA*, (todas resistentes a oxacilina) com frequência maior entre as amostras de mucosa 39,9%. Somente 7,6% das amostras apresentavam genes para ACME (caracterizados como ACME tipo II), 17,0% associadas a pele. Observou-se múltiplos clones entre as 49 amostras avaliadas pelo PFGE dos quais predominou o clone A (28,6%). Este clone não foi observado entre as amostras recuperadas da pele no sítio de inserção (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência do gene *mecA*, genes para ACME e clones de acordo com o sítio de isolamento do *S. epidermidis*

Sítio	Total de amostras testadas N= 53 (%)		Amostras testadas pelo PFGE N=49 [Clones (n)]
	Amostra positiva para o gene <i>mec A</i> N= (%)	Amostra positiva para genes de ACME N = (%)	
Sangue	10 (27,8)	1 (25)	14 [A(4); B,D,E,F,G,H,I,O,P,Y (10)]
Mucosas	14 (39,9)	0	15 [A(4); C(2); B,E,G,M,Q,R,S,V(8)]
Pele no sítio de inserção	5 (13,9)	1(25)	6 [B,G,J,N,U,W(6)]
Canhão do CVC	5 (13,9)	2(50)	9 [A(3); B,D,E,F,K,X (6)]
Ponta do CVC	2 (5,5)	0	5 [A(3); L,T(2)]
Total/clone predominante (%)	36 (67,9)	4 (7,6)	A (28,6%)

CVC: Cateter vascular central; ACME: arginine catabolic mobile element; PFGE : Pulsed field electrophoresis gel

Um total de 19 neonatos (49 amostras) com ICS primária por *S. epidermidis* foram incluídos no estudo de coorte de patogênese de ICS-RC. Todos os micro-organismos isolados dos diferentes sítios estão detalhados na Tabela 7. Cinco neonatos foram excluídos dessas análises moleculares, pois suas amostras não cresceram em cultura ou não formaram bandas de PFGE visíveis. Além do sangue, as amostras de *S. epidermidis* também foram identificadas em 9 (47,4%) pontas de CVC, 14 (73,7%) canhão do CVC, 11 (57,9%) sítio de inserção, 14 (73,7%) mucosa intestinal e 14 (73,7%) amostras de narina. Do total, oito amostras não foram cultivadas, 13 não cresceram em cultura e 11 cresceram outros micro-organismos.

Tabela 7. Isolados de *S. epidermidis* de neonatos incluídos nas análises de patogênese de infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central

Pacientes	Sangue Periférico	Sítio de Isolamento				
		Ponta CVC	Canhão	Sítio de Inserção	Intestino	Narina
1	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
13	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>
15	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG
20	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. epidermidis</i>
22	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
26	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NR	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
29	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>
37	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
45	<i>S. epidermidis</i>	NR	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
47	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NR	NR
49	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>
51	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
52	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
57	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
62	<i>S. epidermidis</i>	NR	<i>S. epidermidis</i>	NR	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
69	<i>S. epidermidis</i>	NEG	NR	NR	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
75	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	NEG	<i>E. faecalis</i>
82	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
86	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>

CVC: Cateter Venoso Central; NR: Não Realizado; NEG: Cultura Negativa

Os resultados da patogênese de ICS-RC causadas por *S. epidermidis*, submetidas ou não ao PFGE, estão resumidos na Tabela 8. Entre 19 casos de ICS primária, a origem da infecção foi identificada em apenas 36,8% dos casos, onde duas foram caracterizadas como intralúmen definitiva, uma extralúmen definitiva e quatro tiveram a origem proveniente das mucosas, definidas como translocação. Na maioria (63,2%) dos casos não foi possível determinar a origem da infecção. No momento da pesquisa, o principal CVC utilizado foi o PICC e a duração do CVC, tempo de cateterização até a ICS e o tempo de nutrição parenteral até a ICS em geral foram bastante longos.

Tabela 8. Patogênese da infecção da corrente sanguínea causada por *S. epidermidis* em neonatos com cateter venoso central

Paciente Infectado	Tipo de CVC	Duração do CVC (dias)	Tempo de cateterização até a ICS(dias)	Tempo de Nutrição parenteral até a ICS (dias)	Concordância de Isolados (sítios) ^a	Rota de aquisição ^b
1	Umbilical	9	9	9	Canhão, intestino, sangue	Definitivo Intralúmen
13	Flebotomia	33	22	22	Intestino, sangue	Translocação
15	PICC	30	13	11	Não concordante	Indeterminado
20	PICC	22	17	17	Ponta, narina, sangue	Translocação
22	PICC	47	45	42	Canhão, intestino	Indeterminado
26	PICC	63	39	46	NR	Provável Intralúmen
29	PICC	16	18	17	Canhão, sangue	Definitivo Intralúmen
37	PICC	31	15	13	Não concordante	Indeterminado
45	PICC	22	18	5	Canhão, Intestino, narina, sangue	Translocação
47	PICC	20	20	37	NR	Indeterminado
49	PICC	48	16	4	Não concordante	Indeterminado
51	PICC	34	4	31	NR	Provável Intralúmen
52	PICC	30	10	6	Pele, narina, sangue	Definitivo Extralúmen
57	PICC	20	12	10	Ponta, Intestino, narina, sangue	Translocação
62	PICC	47	13	0	Não concordante	Indeterminado
69	PICC	15	15	9	NR	Provável Translocação
75	PICC	25	7	0	Não concordante	Indeterminado
82	PICC	12	11	7	NR	Provável Intralúmen
86	Umbilical	9	8	7	Não concordante	Indeterminado

a - Subtipagem molecular por eletroforese em gel de campo pulsado foi utilizada para determinar a concordância de todos os isolados de *S. epidermidis*; b- Para definições, consulte Métodos; CVC: Cateter Venoso Central; ICS: Infecção de Corrente Sanguinea; PICC: Cateter Central de Inserção Periférica; NR: Não Realizado

PFGE foi usado para documentar a concordância entre as amostras de *S. epidermidis* em 14 dos 19 casos de ICS-RC (Figura 3). Foram obtidos 26 perfis genotípicos diferentes, apresentando um coeficiente de similaridade acima de 80%. A detecção de um clone prevalente na unidade (clone A) foi observada em 28,6% das amostras. Os clones (B, C, D, E, F e G) foram detectados em frequências menores, porém em “clusters”. Observou-se a transmissão cruzada na UTIN avaliada (Figura 4), em que amostras de sangue e canhão do mesmo clone foram identificadas em pacientes diferentes.

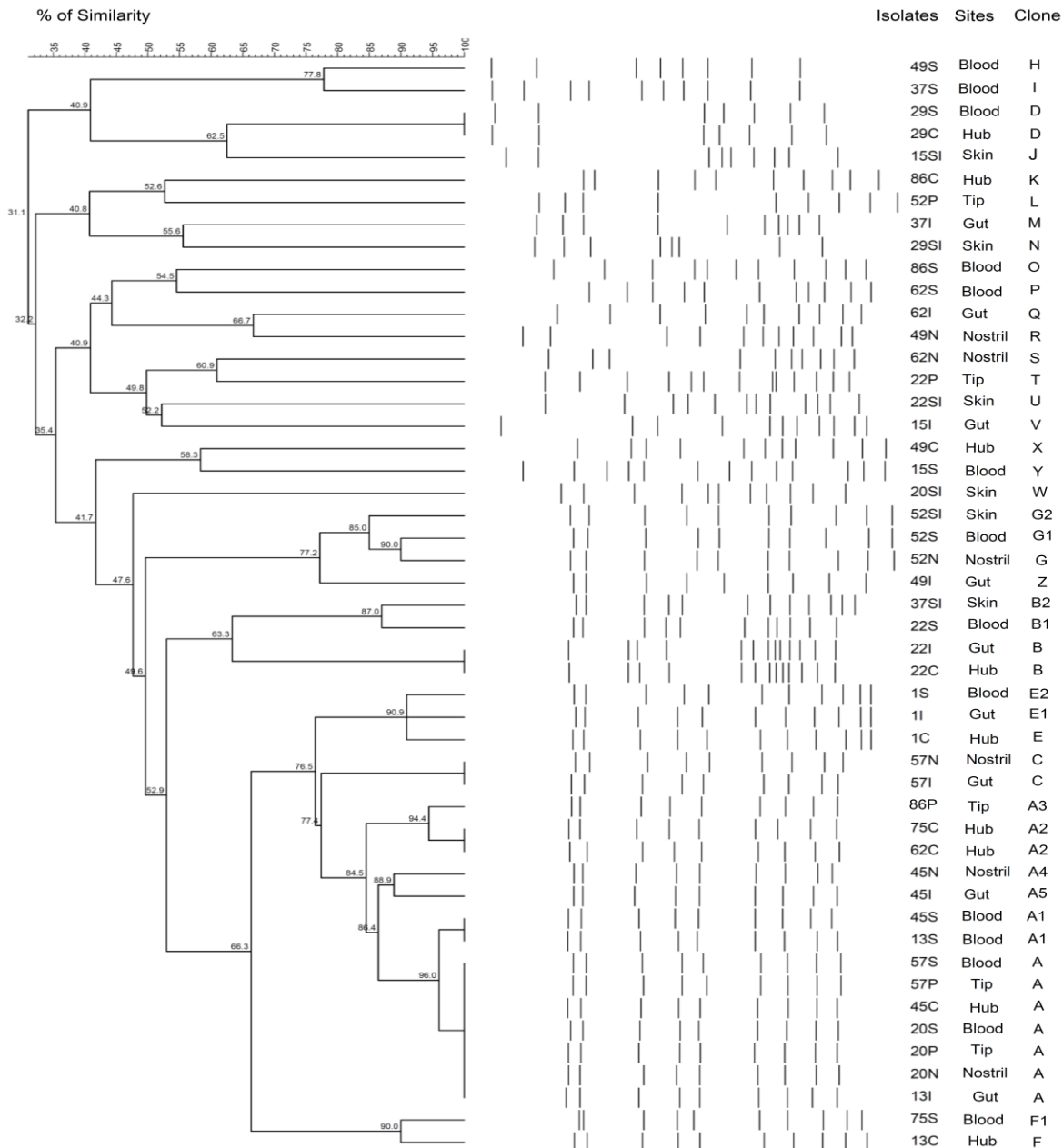


Figura 3. Perfil clonal de *S. epidermidis* isolados de ICS-RC e sítios incluídos nas análises de patogênese baseadas em PFGE

Dendrograma

Dendrograma

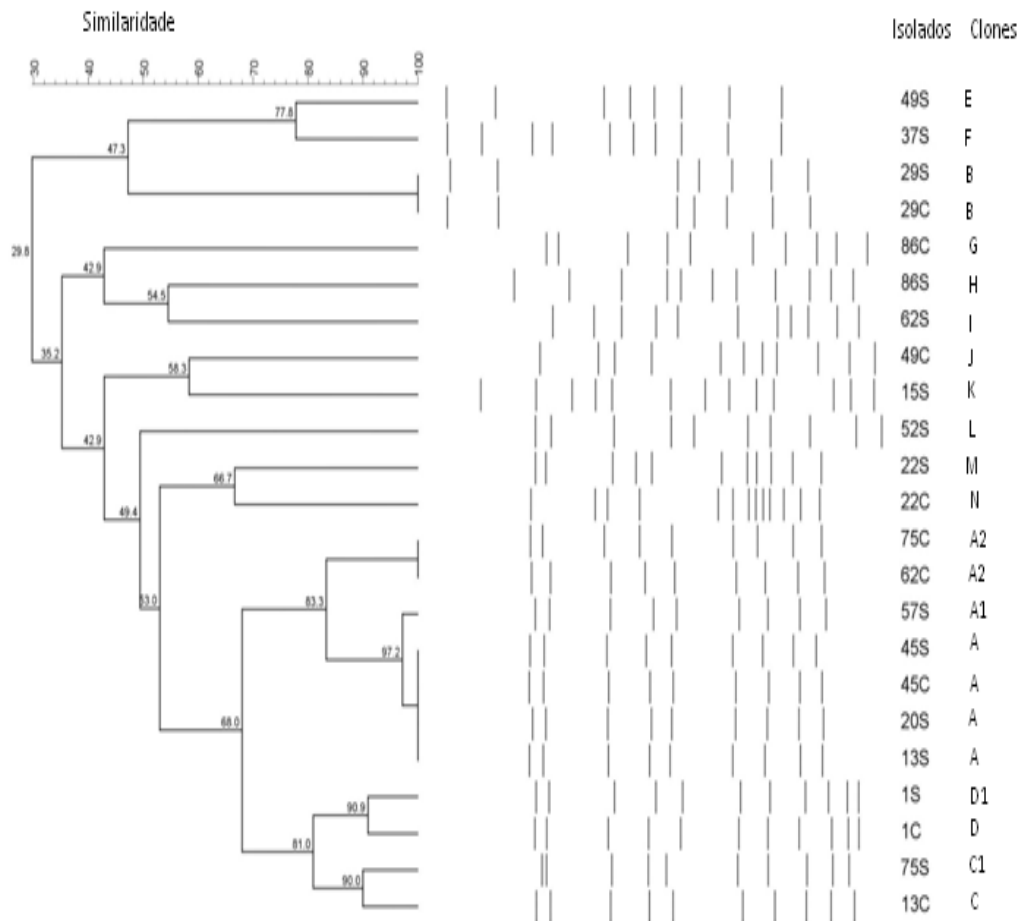


Figura 4. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais de DNA de 49 amostras de *S. epidermidis* recuperadas do sangue (S) e canhão (C) do CVC de baseado na eletroforese em campo Pulsado (PFGE). A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (similaridade $\geq 80\%$)

5. DISCUSSÃO

Em relação a neonatos críticos, a infecção de corrente sanguínea associada ao cateter continua sendo o evento adverso mais frequente nesses pacientes em todo o mundo e esse problema está associado ao aumento do tempo de internação e dos custos, além de contribuírem para o pior prognóstico dos pacientes (SCHWAB et al., 2007). Porém, em muitos países de baixa e média renda, a efetividade das políticas de controle existentes é muito mais difícil, principalmente porque os recursos financeiros são pouco utilizados e, muitas vezes, o uso pouco criterioso de antimicrobianos associado à ausência de laboratórios de microbiologia tornou-se outro obstáculo importante ao controle de infecções (LYNCH et al., 2007; ALLEGRANZI et al., 2011; ALP et al., 2011; VILAR-COMPTE et al., 2017). Pode-se acrescentar a esse cenário a escassez de sistemas nacionais de vigilância epidemiológica de IRAS e de pesquisas da sua prevalência e incidência efetivas (NOGUEIRA JUNIOR et al., 2014).

Entre os principais fatores de risco que predispõe as infecções de corrente sanguínea relacionada ao cateter em neonatos críticos estão: idade gestacional, baixo peso ao nascer, uso de antimicrobianos, uso de nutrição parenteral, presença de ventilação mecânica, tempo de cateterização e hospitalização prolongada (AURITI et al., 2003). O nosso trabalho confirmou através do pareamento entre casos e controles que o risco de ICS por *S. epidermidis* em neonatos críticos é significativamente maior naqueles que apresentam maior tempo de hospitalização total, tempo de ventilação mecânica, tempo de nutrição parenteral, tempo de uso de CVC e o uso de antibióticos. A literatura mostra que existem dificuldades no pareamento destes pacientes nos estudos caso x controle (KUNG et al., 2016) em função dos fatores de risco mencionados anteriormente, que caracterizam os pacientes como mais susceptíveis e dificultam o pareamento dos controles. No nosso estudo, apenas uma das crianças infectadas por *S. epidermidis* ficou sem o controle, permitindo que 97,3% da população com ICS por esse micro-organismo fosse avaliada. Entre as 180 variáveis passíveis de pareamento houve sucesso em 161 (89,4%).

Outro aspecto que deve ser considerado é a mortalidade entre neonatos com menos de 1500 gramas com ICS. Os recém-nascidos de baixo peso apresentam maior risco de mortalidade (ILIODROMITI et al., 2017) com taxas de mortalidade atribuível de 4 a 20%. (TAYLOR et al., 2015). No mesmo estudo, a mortalidade atribuída a ICS por *S. epidermidis* foi de (3/36) 8,3%. Embora essa taxa não tenha sido muito elevada nós consideramos extremamente relevante, uma vez que o *S. epidermidis* sendo resistente a oxacilina é um patógeno considerado importante nessa população de pacientes (QIN et al., 2017).

Em países industrializados, as espécies de SCN destacam-se como principais agentes de ICS hospitalar neonatal, principalmente aquelas associadas ao CVC, sendo *S. epidermidis* o patógeno mais frequente isolado nesta infecção. Infecção neonatal por SCN é raramente fatal, entretanto, causa morbidade significativa, e pode ser ainda mais graves se uma cepa resistente com alta capacidade de formação de biofilme colonizar um dispositivo médico invasivo (WU et al., 2015). No nosso estudo, o *S. epidermidis* foi o principal agente recuperado dessas infecções corroborando com a literatura do que ocorre em países desenvolvidos (POSFAY-BARBE et al., 2008) e portanto, a equipe avaliou a frequência de ACME e a patogênese associada a esse micro-organismo.

O elemento móvel catabólico de arginina (ACME) é uma ilha genômica em estafilococos que pode contribuir para uma patogenicidade aumentada (DIEP et al., 2006). Foi descoberto pela primeira vez na comunidade *S. aureus* resistente a meticilina (CA-MRSA) USA300 e em *S. epidermidis* ATCC12228 (SHORE et al., 2011). Tem sido sugerido que o catabolismo da l-arginina contribui para otimizar a vida estafilocócica na pele humana ácida, o que pode explicar a alta prevalência de ACME em SCN tipicamente colonizadores da pele, tais como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Ao contrário de outros estudos, encontramos baixa prevalência (7,6%) de ACME nas amostras de *S. epidermidis* testadas. Entretanto, das quatro amostras positivas, três (17%) foram recuperadas de amostras associadas a pele. De acordo com a literatura, uma maior prevalência de ACME foi encontrada em amostras de *S. epidermidis* consideradas como contaminantes (mais provavelmente derivados da pele) em comparação com isolados causadores de doença invasiva (BARBIER et al., 2010). Alguns estudos epidemiológicos de *S. epidermidis* não encontraram associação entre ACME e amostras causadoras de doença, mas detalhes clínicos não foram apresentados (MIRAGAIA et al., 2009). Nosso estudo também não identificou associação entre a presença de ACME e infecções neonatais por *S. epidermidis*. Entretanto, mais estudos devem ser conduzidos com um número maior de amostras para que essa associação possa ser ou não comprovada.

O conhecimento da patogênese de infecção de corrente sanguínea relacionada ao cateter é essencial para definir melhor a adoção de estratégias efetivas de prevenção e controle dessas infecções. Contudo, poucos estudos aplicando técnicas moleculares têm sido utilizados para determinar a origem e potencial rota de disseminação de micro-organismos da ponta do cateter para o sangue dos pacientes (SAFDAR et al., 2004). Essas técnicas são ferramentas indispensáveis para determinar origem dos micro-organismos, pois permitem confirmar a clonalidade entre as cepas recuperadas de diferentes sítios (BRITO et al., 2014).

Semelhante ao estudo conduzido por Garland e colaboradores (2008), onde a rota de aquisição dos micro-organismos presente no sangue foi determinada somente em 40% dos pacientes, no nosso estudo, feito em neonatos críticos, a origem do primeiro episódio na maioria das infecções de corrente sanguínea não pode ser determinada (42,1%) ou foi caracterizada como provável (21%), e somente 36,8% tiveram sua origem confirmada. Essa dificuldade em confirmar as rotas de contaminação do CVC demonstra fortemente que a patogênese de ICS-RC em neonatos não pode ser facilmente definida, ao contrário dessas infecções em pacientes adultos, nos quais a principal rota de contaminação da ponta do cateter com potencial para infectar o sangue são a via extraluminal (75-90%) (SAFDAR et al., 2004) seguida da via intraluminal (10-50%) (GARLAND et al., 2008). Dados semelhantes foram publicados no estudo de Brito e colaboradores (2014) e Lepointeur e colaboradores (2013), em que a maioria das infecções não teve a origem do micro-organismo definida. Entretanto, esses trabalhos foram baseados na análise de poucas cepas clínicas, ao contrário do nosso estudo.

As pesquisas que investigam a patogênese de ICS-RC em neonatos críticos são limitadas e os resultados bastante controversos (LEPAINTEUR et al., 2013). Em neonatos prematuros, a combinação de um sistema imune imaturo e uma mucosa atrofiada devido ao uso frequente de nutrição parenteral somado a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos na microbiota do intestino e da narina, representa risco significativo da translocação desses micro-organismos para o sangue (ERTUGRUL et al., 2016). Assim, a translocação microbiana da mucosa pode ser considerada uma origem importante e alternativa de micro-organismos para o sangue. Embora nesse estudo a translocação fosse determinada somente em quatro casos (22,1%), a maioria dos neonatos com ICS causada por *S. epidermidis* apresentou esse micro-organismo também em ambos os sítios, intestino e narina, além de estarem em uso frequente de nutrição parenteral por longos períodos. Esse é considerado um dos poucos trabalhos no mundo que avalia a mucosa como origem do *S. epidermidis* para o sangue em neonatos críticos.

Embora o estudo tenha sido muito amplo e a origem do *S. epidermidis* pudesse ser confirmada somente em alguns casos, estratégias para prevenir o desenvolvimento de ICS adquirida extraluminalmente deveria ser combinada com estratégias de prevenção de controle de infecções para evitar que infecções também se originassem de através da rota intralúmen. Apesar dos esforços para elucidar a patogênese de ICS-RC em neonatos críticos usando técnicas moleculares, os estudos apresentados não tem sido suficientes para ter uma conclusão definitiva das rotas de contaminação e esse processo permanece ainda obscuro, requerendo mais estudos a respeito. Vale ressaltar que a literatura ainda destaca que além das vias intralúmen, extralúmen e translocação, existe a possibilidade menos comum, da contaminação do cateter através do micro-organismo

oriundo de outro foco de infecção e mais raro, mas também possível a partir da contaminação do infuso usado na nutrição parenteral (KUNG et al., 2016).

Atualmente, a emergência e disseminação de clones associados com cepas resistentes em infecções graves tornou-se um problema significativo nas instituições de saúde, o que pode ser justificado em parte, pela adaptação de clones hospitalares selecionados a partir da pressão pelo uso indiscriminado de antibióticos (TENOVER, 2006). A detecção de clones bacterianos idênticos (59,2%) em diferentes neonatos no nosso estudo confirma a transmissão cruzada na UTI neonatal avaliada, reforçando problemas com a higienização das mãos dos profissionais de saúde na unidade.

Geralmente em países de baixa e média renda, como o Brasil, diferentes fatores podem levar a emergência e disseminação de clones resistentes, especialmente nas UTIs. Entre alguns desses fatores estão a alta densidade de uso de antibióticos, que resultam frequentemente na pressão seletiva que favorece a emergência de cepas resistentes e multirresistentes, adicionada a existência de clones dominantes e falhas nas práticas básicas de prevenção e controle de infecções, que podem em parte justificar a disseminação desses micro-organismos no ambiente hospitalar (DANTAS et al., 2017). O HC-UFU apresenta todas essas características proporcionando ambiente ideal para a disseminação de clones de alto risco.

A importância da prevenção e controle de ICS em neonatos é evidente, particularmente em países de baixa e média renda como o Brasil, uma vez que as taxas de infecções associadas a procedimentos invasivos são consideravelmente mais altas do que, por exemplo, aquelas detectadas pelo NHSN nos EUA (RESENDE et al., 2015), refletindo, praticamente, o que foi referido anteriormente sobre a limitação de recursos financeiros e humanos no Brasil (PADOVEZE et al., 2014).

Um conjunto de medidas com a finalidade de reduzir essas taxas tem sido adotadas, e a importância da higienização das mãos entre os profissionais de saúde está entre as medidas mais bem conhecidas e pode ser intimamente relacionada ao desenvolvimento de infecção associada aos cuidados de saúde em todo o mundo. Assim, as mãos dos profissionais representam a forma mais comum e simples de disseminar micro-organismos no ambiente hospitalar (RESENDE et al., 2011). Associada a higienização das mãos, medidas que diminuem o risco de colonização da pele e do canhão do cateter podem ser aliadas importantes no controle de ICS em neonatos críticos.

Como existem poucos estudos publicados semelhantes a esse, nós acreditamos que esses resultados podem ser referência para todo o país oferecendo dados de qualidade e perspectivas

práticas para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle de Infecção de Corrente Sanguínea relacionada aos cateteres em UTIs neonatais.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do nosso estudo indicam que a mortalidade dos neonatos com ICS por *S. epidermidis* foi significativo, e o desenvolvimento dessas infecções foi associado aos tempos de hospitalização, ventilação mecânica, nutrição parenteral e CVC, além do uso de antibióticos.

Entre os neonatos ≤ 1500 g a mortalidade foi associada significativamente com a presença de sepse precoce. Já aqueles com > 1500 g, fatores como ventilação mecânica e a presença de sepse clínica foram importantes.

Apesar da importância clínica e epidemiológica das ICS em neonatos críticos e da amplitude do estudo, na maioria dos casos não foi possível determinar a origem do micro-organismo presente no sangue. O nosso estudo demonstra a importância da translocação microbiana nessa população de pacientes.

Embora tenha sido observada uma alta diversidade clonal entre as amostras de *S. epidermidis* a transmissão cruzada foi um evento comum.

A resistência a oxacilina e a presença do gene *mecA* foi altamente frequente entre as amostras ao contrário dos genes associados ao ACME. Nas amostras positivas para ACME, a maioria foi observada em amostras de colonização.

7. REFERÊNCIAS

- ALLEGIANZI, B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 228-241, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61458-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61458-4)
- ALP, E. et al. Infection control practice in countries with limited resources. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 36, 2011. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-10-36>
- AURITI, C. et al. Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 1, p. 25-30, 2003. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1341>
- AZIZ, K. et al. Variations in rates of nosocomial infection among Canadian neonatal intensive care units may be practice-related. **BMC pediatrics**, v. 5, p. 22, jul. 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-5-22>
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- BRACHINE, P. et al. Bundle: Impacto na infecção relacionada a cateter central de inserção periférica. **Revista Científica de Enfermagem-RECIEN**, v. 8, n. 23, 2018.
- BANNERMAN T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Tenover, RH Tenover (eds), **Manual of Clinical Microbiology**, American Society of Microbiology, Washington, p. 384-404, 2003.
- BARBIER, F. et al. High prevalence of the arginine catabolic mobile element in carriage isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 29-36, 2010. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq410>
- BARTUAL, S. G. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4382-4390, 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005>

- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-negative staphylococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- BRITO, C. S. et al. Genotypic study documents divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 387-393, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.010>
- BRUN-BUISSON, C. et al. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. **Archives of internal medicine**, v. 147, n. 5, p. 873-877, 1987. <https://doi.org/10.1001/archinte.1987.00370050069012>
- CICALINI, S.; PALMIERI, F.; PETROSILLO, N. Clinical review: new technologies for prevention of intravascular catheter-related infections. **Critical Care**, v. 8, n. 3, p. 157–162, 2004. <https://doi.org/10.1186/cc2380>
- CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997. <https://doi.org/10.1128/CMR.10.4.781>
- CHONG, J. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-intermediate heteroresistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in the neonatal intensive care unit. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 00726-16, 2016.
- CRUMP, J. A.; COLLIGNON, P. J. Intravascular catheter-associated infections. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–8, jan. 2000.
- DANTAS, R. C. C et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0176774, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176774>
- DE OLIVEIRA, A. C.; KOVNER, C.T.; DA SILVA, R. S. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 18, n. 2, 2010.

DIEP, B. A. et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 367, n. 9512, p. 731-739, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68231-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68231-7)

DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. Supplement_2, p. S114-S132, 2001.

DIGIOVINE, B. et al. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 160, n. 3, p. 976-981, 1999. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.160.3.9808145>

DONNELL, S. C. et al. Infection rates in surgical neonates and infants receiving parenteral nutrition: A five-year prospective study. **Journal of Hospital Infection**, v. 52, n. 4, p. 273–280, dez. 2002. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1318>

DU, X. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62742, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062742>

DUDECK, M. A. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2010, device-associated module. **American journal of infection control**, v. 39, n. 10, p. 798-816, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.10.001>

ERTUGRUL, S. et al. Risk factors for health care-associated bloodstream infections in a neonatal intensive care unit. **Iranian journal of pediatrics**, v. 26, n. 5, 2016. <https://doi.org/10.5812/ijp.5213>

FARHAT, C. K. Infecção hospitalar. **Jornal de Pediatria, São Paulo**, v. 76, n. 4, p. 259-60, 2000. <https://doi.org/10.2223/JPED.2>

GARLAND, J. S. et al. A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. **Pediatrics**, v. 116, n. 2, p. e198-e205, 2005. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2674>

GARLAND, J. S. et al. Cohort study of the pathogenesis and molecular epidemiology of catheter-related bloodstream infection in neonates with peripherally inserted central venous catheters. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 3, p. 243-249, 2008. <https://doi.org/10.1086/526439>

GARLAND, J. S.; UHING, M. R. Strategies to prevent bacterial and fungal infection in the neonatal intensive care unit. **Clinics in perinatology**, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2008.09.005>

GEFFERS, S. BAERWOLFF, F. SCHWAB, P. GASTMEIER. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birthweight infants. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, n. 3, p. 214-221, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.01.016>

GOERING, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 866-75, out 2010. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>

GORDON, R. J. et al. Staphylococcus epidermidis colonization is highly clonal across US cardiac centers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 9, p. 1391-1398, 2012. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis218>

HAMMERMAN, Cathy; BIN-NUN, Alona; KAPLAN, Michael. Germ warfare: probiotics in defense of the premature gut. **Clinics in perinatology**, v. 31, n. 3, p. 489-500, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2004.04.015>

ILIODROMITI, S. et al. Customised and noncustomised birth weight centiles and prediction of stillbirth and infant mortality and morbidity: a cohort study of 979,912 term singleton pregnancies in Scotland. **PLoS medicine**, v. 14, n. 1, p. e1002228, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002228>

IORIO, N. L. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* carrying biofilm formation genes: detection of clinical isolates by multiplex PCR. **Int Microbiol**, v. 14, n. 1, p. 13-7, 2011.

KILBRIDE, H. W. et al. Evaluation and development of potentially better practices to prevent neonatal nosocomial bacteremia. **Pediatrics**, v. 111, n. Supplement E1, p. e504-e518, 2003.

KONDO, Y. et al. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 264-274, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.00165-06>

KUNG, Y. H. et al. Risk factors of late-onset neonatal sepsis in Taiwan: A matched case-control study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 3, p. 430-435, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.10.001>

LEGGER. Dreamstime.com, 2019. Disponível em: < <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-spread-infection-via-cannula-drawing-skin-blood-vessel-detail-how-bacterial-can-to-blood-created-image43534314> > Acesso em: 30 jan. 2019.

LEPAINTEUR, M. et al. Role of the central venous catheter in bloodstream infections caused by coagulase-negative staphylococci in very preterm neonates. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 32, n. 6, p. 622-628, 2013. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318289de0f>

LYNCH, S. V. et al. microbial Community Analysis Of Cf Sputum Using The 16s Rrna Phylochip During Periods Of Exacerbation And Remission Reveals Unprecedented Microbial Community Diversity And Large Compositional Shifts: 313*. **Pediatric Pulmonology**, v. 42, p. 312, 2007.

MAHIEU, L. M. et al. Risk factors for central vascular catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, n. 2, p. 108-116, 2001. <https://doi.org/10.1053/jhin.2001.0984>

MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SARAFIN, H. W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **The New England journal of medicine**, v. 296, n. 23, p. 1305–1309, jun.1977. <https://doi.org/10.1056/NEJM197706092962301>

MAKI, D. G.; RINGER, M.; ALVARADO, C. J. Prospective randomized trial of povidone-iodine , alcohol , and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. **Lancet**, p. 339–343, ago.1991.

MAKI, D. G. et al. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter: a randomized, controlled trial. **Annals of internal medicine**, v. 127, n. 4, p. 257-266, 1997. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-127-4-199708150-00001>

MARTÍN-LOZANO, D. et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4571-4575, 2002. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4571-4575.2002>

- MEHTA, Y. et al. Guidelines for prevention of hospital acquired infections. **Indian journal of critical care medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 18, n. 3, p. 149, 2014. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.128705>
- MCDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113-20, nov 2003. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003>
- MIRAGAIA, M. et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 430–8, fev. 2002. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.430-438.2002>
- MIRAGAIA, M. et al. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2540-2552, 2007. <https://doi.org/10.1128/JB.01484-06>
- MIRAGAIA, M. et al. Comparison of molecular typing methods for characterization of *Staphylococcus epidermidis*: proposal for clone definition. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 1, p. 118-129, 2008. <https://doi.org/10.1128/JCM.01685-07>
- MIRAGAIA, M. et al. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. **PloS one**, v. 4, n. 11, p. e7722, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007722>
- NOGUEIRA JUNIOR, C. et al. Characterization of epidemiological surveillance systems for healthcare-associated infections (HAI) in the world and challenges for Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 30, p. 11-20, 2014. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00044113>
- NUNES, A. P. F. et al. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 1, p. 19-26, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.07.021>
- O'GRADY, N. P. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **American Journal of Infection Control**, v.23, n. 12, p.759-69, dez. 2002.
- ÖNCÜ, S. et al. Central venous catheter related infections: risk factors and the effect of glycopeptide antibiotics. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 2, n. 1, p. 3, 2003. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-2-3>

- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 555–567, ago. 2009.
- OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. In: **Seminars in immunopathology**. Springer-Verlag, 2012. p. 201-214. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0296-2>
- PADOVEZE, M.C.; CASTELO BRANCO FORTALEZA, C. M. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, 2014.
- PERLMAN, S. E.; SAIMAN, L.; LARSON, E. L. Risk factors for late-onset health care-associated bloodstream infections in patients in neonatal intensive care units. **American Journal of Infection Control**, v. 35, p. 177-182, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.01.002>
- PESSOA-SILVA, C. L. et al. Reduction of health care-associated infection risk in neonates by successful hand hygiene promotion. **Pediatrics**, v. 120, n. 2, p. e382-e390, 2007. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3712>
- PITTET, D. et al. Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. **Journal of Hospital Infection**, v. 68, p. 285-292, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.12.013>
- POSFAY-BARBE, K. M.; ZERR, D.; PITTET, D. Infection control in paediatrics. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 19-31, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70310-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70310-9)
- QIN, Li et al. Toxin mediates sepsis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006153, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006153>
- RESENDE, D. S. et al. Reduction of catheter-associated bloodstream infections through procedures in newborn babies admitted in a university hospital intensive care unit in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 731-734, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000600015>
- ROGUES, A. M. et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 12, p. 1389-1395, 2007. <https://doi.org/10.1086/523280>

ROSENTHAL, V. D. et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009. **American journal of infection control**, v. 40, n. 5, p. 396-407, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2011.05.020>

SALGUEIRO, V. C. et al. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 15, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0930-9>

SAFDAR, N.; MAKI, D. G. The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters. **Intensive care medicine**, v. 30, n. 1, p. 62-67, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00134-003-2045-z>

SAFDAR, N.; MAKI, D. G. Risk of catheter-related bloodstream infection with peripherally inserted central venous catheters used in hospitalized patients. **Chest**, v. 128, n. 2, p. 489-495, 2005. <https://doi.org/10.1378/chest.128.2.489>

SCHWAB, F. et al. Reducing neonatal nosocomial bloodstream infections through participation in a national surveillance system. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 4, p. 319-325, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.12.020>

SERRANO, M. et al. Retained central venous lines in the newborn: report of one case and systematic review of the literature. **Neonatal Network**, v. 26, p.105-110, 2007. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.26.2.105>

SHAH, B. A.; PADBURY, J. F. Neonatal sepsis: an old problem with new insights. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 170-178, 2014. <https://doi.org/10.4161/viru.26906>

SHORE, A. C. et al. Characterization of a novel arginine catabolic mobile element (ACME) and staphylococcal chromosomal cassette mec composite island with significant homology to *Staphylococcus epidermidis* ACME type II in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotype ST22-MRSA-IV. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2011. <https://doi.org/10.1128/AAC.01756-10>

SRIVASTAVA, S.; SHETTY, N. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. **Journal of Hospital Infection**, v. 65, n. 4, p. 292-306, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.01.014>

- STOLL, B. J. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**, v. 110, n. 2, p. 285-291, 2002. <https://doi.org/10.1542/peds.110.2.285>
- STOVER, B. H.; SHULMAN, S. T.; BRATCHER, D. F.; BRADY, M. T.; LEVINE, G. L.; JARVIS, W. R. Nosocomial infection rates in US children's hospitals' neonatal and pediatric intensive care units. **American Journal of Infection Control**, v. 29, p. 152-157, 2001. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115407>
- SU, B. H. et al. Nosocomial infection in a neonatal intensive care unit: a prospective study in Taiwan. **American Journal of Infection Control**, v. 35, p. 190-195, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.07.004>
- TAYLOR, J. E.; MCDONALD, S.J.; TAN, K. Prevention of central venous catheter-related infection in the neonatal unit: a literature review. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1224-1230, 2015. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.949663>
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S3-S10, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
- VEGUNTA, Ravindra K. et al. Differences in the outcome of surgically placed long-term central venous catheters in neonates: neck vs groin placement. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 40, n. 1, p. 47-51, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.09.015>
- VILAR-COMPTE, D.; CAMACHO-ORTIZ, A.; PONCE-DE-LEÓN, S. Infection control in limited resources countries: challenges and priorities. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 5, p. 20, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0572-y>
- WEI, S. et al. Epidemiologic trends in nosocomial bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 38, n. 4, p. 283, 2005.
- WU, H. et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of oral science**, v. 7, n. 1, p. 1, 2015. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>

APÊNDICE I ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO***Original Articles******Infection Control & Hospital Epidemiology*****Elucidating the Pathogenesis of Bloodstream Infections Related to the Central Venous Catheter in Critical Neonates****Pathogenesis of Bloodstream Infections**

Lícia Ludendorff Queiroz¹, Daiane Silva Resende Dr², Bruna Fuga Araújo MS¹, Paola Amaral de Campos PhD¹, Cristiane Silveira de Brito Dr¹, Jane Eire Urzedo MS³, Paulo Pinto Gontijo-Filho PhD¹, Rosineide Marques Ribas PhD^{1,*}

¹Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Uberlândia Federal University, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

²College of City João Pinheiro, João Pinheiro, Minas Gerais, Brazil.

³Clinical Hospital of the Uberlândia Federal University, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Word Count : 2459

***Corresponding author.**

Present address: Av. Pará, 1720, 38400-902

Uberlândia, MG, Brazil

Contact: +55 34 3225 8574

E-mail address: rosi_ribas@yahoo.com.br (R.M. Ribas).

Lícia Ludendorff Queiroz and Daiane Silva Resende contributed equally to this work

ABSTRACT

Objective. Investigate the pathogenesis of Catheter-Related bloodstream infections (CR-BSI) by *Staphylococcus epidermidis* in critical neonates, using molecular biology techniques.

Methods. This was a cohort study comprising neonates presenting bloodstream infection using central venous catheters (CVC) for over 24h. Skin cultures obtained from the catheter insertion site, CVC hub, neonate nasal and intestinal mucosa were performed weekly from 48 h from the beginning of the invasive procedure, as well as from the tip of the CVC after its withdrawal. Quantitative cultures of the tip with modifications and the “roll-plate” technique. Isolate identification and the resistance profile were obtained using a VITEK II automated system. Molecular subtyping by pulsed-field electrophoresis (PFGE) was used to determine the pathogenesis of all BSIs.

Results: Among 19 primary BSI caused by *Staphylococcus epidermidis*, BSI origin was defined in only 36.8% of the cases, where two were characterized as definite intraluminal, one as definite extraluminal and four as translocation. However four were considered probable CR- BSI (three probable intraluminal and one probable translocation). Origin was indeterminate in 42.1% of the cases analyzed by PFGE. A total of 26 different genotypes profiles with similarity coefficients above 80% were obtained. The spread of a prevalent clone in the unit (clone A) was detected in 28.6% of the samples.

Conclusion Most BSIs related to catheter caused by *S. epidermidis* was not able to prove the origin of most microorganisms present in neonate blood, demonstrating the difficulty in determining it in this population of patients.

Bloodstream infection remains the most frequent adverse event among premature infants worldwide, associated with increased hospital stay length and costs, poor outcomes and death.^{1,2}

The association of these infections with the use of central venous catheters (CVC) in newborns ranges from approximately 17.3/1,000 CVC-day in neonates weighing from 1501 grams (g) to 2500g to 34.9/1,000 CVC-day in neonates <1,000grams³. Although the pathogenesis of CR-BSI is multifactorial and complex, references from studies in adults indicate two main potential routes of contamination of the catheter tip: a) extraluminally – patient skin organisms at the insertion site can migrate along the surface of the catheter into the cutaneous catheter tract surrounding the catheter, resulting in colonization of the catheter tip. Regarding short-term catheters, this is the most common source of infection^{4,5}, and, b) intraluminally - after the first week of placement, intraluminal contamination and colonization after hub manipulation occurs, responsible for most central line-associated bloodstream infections.^{6,7}

In premature neonates, microbial translocation through the colonized mucosa is an underestimated source of infection that requires investigation. Currently, few comparable information concerning pathogenesis in high-risk neonates, mainly caused by *S. epidermidis*, is available in Brazil.^{8,9} This microorganism is considered the major bacteria species responsible for CR-BSI, mainly due its ability to colonize the catheter tip and establish a biofilm, which accounts for its greater resistance to antibiotics, particularly methicillin.^{2,10} Therefore, this study aimed to investigate the pathogenesis of CR-BSI by *S. epidermidis* in critically neonates using the PFGE method. In addition, we propose a new definition for Probable intraluminally / extraluminally BSI and Translocation

MATERIAL AND METHODS

Design, setting and study population

This cohort study was performed from a prospective trial to assess the pathogenesis of CR-BSI in critical neonates. Neonates admitted to the 15- bed Neonatal unit of the Uberlândia Federal University hospital in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, from January 2011 to August 2012 who required at least one CVC placed for longer than 24 hours were eligible for participation in the trial. Ethical approval was obtained from the Uberlândia Federal University Ethics Committee of according to the Brazilian Ministry of Health requirements.

Definitions

Primary CR-BSI: identified when a positive blood culture was obtained for the same microorganism present at the tip of the catheter or gut and the clinical and microbiological absence of another source of infection was observed, with symptomatology^{6, 11} (i.e. temperature $>38^{\circ}$ C and with clinical signs of sepsis, including apnea, temperature instability, lethargy, feeding intolerance, worsening respiratory distress, or hemodynamic instability).²

CVC Associated BSI: Bacteremia with microbiology criterion, clinical manifestations of sepsis but without laboratory confirmation of microorganism in the CVC tip.⁷

Definite catheter-related BSI: For neonates with BSI with no identified source, definite CR-BSI was defined by a culture from a peripheral percutaneously-obtained blood sample positive for the same organism found to be colonizing the catheter hub or tip (i.e., concordant colonization of the catheter hub or tip with blood confirmed by restriction-fragment DNA subtyping).¹²

Probable intraluminally/extraluminally: when a peripheral blood sample was culture positive for *S. epidermidis*, and when concordance by speciation was obtained between these organisms and those recovered from the culture of the catheter tip or culture from samples obtained from the catheter hub or isolates recovered from insertion-site samples, without restriction-fragment DNA subtyping. When the same microorganism was detected at the hub and place of insertion, isolation dates were considered.

Translocation: Microbial translocation was diagnosed if the microorganisms isolated from the blood culture were indistinguishable from those carried in the rectum or nostril within two

weeks preceding the BSI episode. When the same microorganism in the catheter hub or insertion-site were detected, isolation dates were considered.

Pathogenesis determination: CR-BSI was classified as extraluminally acquired when similarities between isolates recovered from the catheter tip, recovered from blood samples and recovered from insertion-site samples were observed. CR-BSI was classified as intraluminally acquired if similarity was demonstrated solely between isolates recovered from hub samples, catheter tips and blood. If results suggested more than one route of acquisition, the BSI pathogenesis was classified as indeterminate.

Microbiological Methods

Hemoculture

Blood cultures were obtained by Neonatal Intensive Care Unit (NICU) health care professionals at the discretion of the attending neonatologist, taken from neonates presenting signs and symptoms compatible with BSI. Cultures were processed at the hospital laboratory using the BACT/Alert® system (bioMérieux–Durham, USA).

CVC tip cultures

Catheters were removed when no longer required for patient care, when the patient experienced an adverse event, or when catheter exchange was deemed necessary. Catheters were removed under aseptic conditions, and their tips were cut off with sterile scissors and transferred into sterile tubes and transported to the Microbiology Laboratory. Quantitative cultures and the “roll-plate” technique were carried out according to Brun-Buisson et al. (1987)¹³ with modifications and Maki et al (1977)¹⁴, respectively, and were considered positive when $\geq 10^3$ CFU/mL and ≥ 15 CFU/mL, respectively.

CVC insertion site skin

Skin material was obtained 48 h, seven and 14 days after catheter insertion, or until hemocultures were positive, collected a sterile saline pre-wet swab over a 20 cm² area. The swabs were placed into tubes containing 1 mL sterile saline and stirred using a vortex mixer. Subsequently, 0.1 mL of the liquid was inoculated onto blood agar plates, which were then

incubated at 35° C for 24 h. Cultures were considered positive when a growth of ≥ 200 UFC/20 cm² was observed.

Intestinal/nasal mucosa and catheter hub

Qualitative cultures of material collected from the nostrils, perianal surface and catheter hub were performed 48 h, seven and 14 days after catheter insertion or until blood cultures were positive. The swabs were placed into tubes containing 1 mL sterile saline and stirred using a vortex mixer. Subsequently, 0.1 mL of the liquid was inoculated onto blood agar plates, which were then incubated at 35°C for 24 h.

Microorganism identification

Isolate identification and resistance profile of blood isolates were obtained using the VITEK II automated system (bioMérieux) at the Microbiology Laboratory of the HC UFU.

Molecular tests

Analysis of the macro-restriction profiles of chromosomal DNA after cleavage with the restriction enzyme *SmaI* and pulsed field electrophoresis

S. epidermidis strains (14 from blood, nine from intestinal mucosa, six from nostrils, nine from catheter hubs, five from CVC tips, and six from skin from insertion sites) related to pathogenesis were typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), as described by Goering (2010)¹⁵ with modifications. Following digestion of impact genomic DNA with the *SmaI* restriction enzyme (Promega, Brazil). *S. epidermidis* DNA fragments were separated on 1% (W/V) agarose gels in 0.5% TBE (Tris-Borat-ethylene diamine tetra- acetic acid [EDTA]) buffer using a CHEF DRIII apparatus (Bio-Rad) at 6 V/cm, applying pulses from 5 to 40 s, for 21 h and 12°C. Gel were stained with ethidium bromide and subsequently photographed under ultraviolet light. Computer-assisted analyses were performed using the BioNumerics 7.5 software (Applied Maths, Bélgica). Comparison of the banding patterns was carried out applying the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA), using the Dice similarity coefficient.

RESULTS

A total of 19 neonates with primary BSI by *S. epidermidis* were included in this CR-BSI pathogenesis cohort study. Five neonates were excluded of molecular analyses, as their samples did not grow in culture or did not form clear PFGE bands. All isolated microorganisms are detailed in Table 1. In addition to blood from these 19 infants, *S. epidermidis* isolates were also identified on nine (47.4%) catheter tips, 14 (73.7%) on catheter hubs, 11 (57.9%) catheter insertion sites, 14 (73.7%) intestinal mucosa and 14 (73.7%) nostril samples. Of the total, eight samples were not cultured, 13 did not grow in culture and in 11 comprised other microorganisms, and not *S. epidermidis*.

Results from the CR-BSI pathogenesis caused by *S. epidermidis* isolates, undergoing PFGE or not, are summarized in Table 2. Among 19 primary BSI cases, BSI origin was identified in only 36.8% of the cases, where two were characterized as definite intraluminal, one definite extraluminal and four as translocation cases. However four were considered probable catheter-related BSI (three probable intraluminal and one probable translocation). The BSI origin was not possible to determine in 63.2% of the total cases analyzed by PFGE (14 patients).

PFGE was used to document concordance among *S. epidermidis* isolates for 14 of the 19 CR-BSI cases (Figure 1). A total of 26 different genotypes profiles were obtained, presenting a similarity coefficient above 80%. The spread of a prevalent clone in the unit (clone A) was detected in 28.6% of the samples. The other clones (B, C, D, E, F and G) were detected in fewer samples.

Table 1. Microorganism isolates from neonates included in the *S. epidermidis* CR-BSI pathogenesis analyses

Patient	Peripheral Blood	Isolation site				
		CVC tip	Hub	Insertion site	Gut	Nostrils
1	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
13	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. warneri</i>
15	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG
20	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. epidermidis</i>
22	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
26	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NP	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
29	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>
37	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>
45	<i>S. epidermidis</i>	NP	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
47	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NP	NP
49	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>
51	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
52	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
57	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
62	<i>S. epidermidis</i>	NP	<i>S. epidermidis</i>	NP	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
69	<i>S. epidermidis</i>	NEG	NP	NP	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
75	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. faecium</i>	NEG	<i>E. faecalis</i>
82	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
86	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	NEG	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>

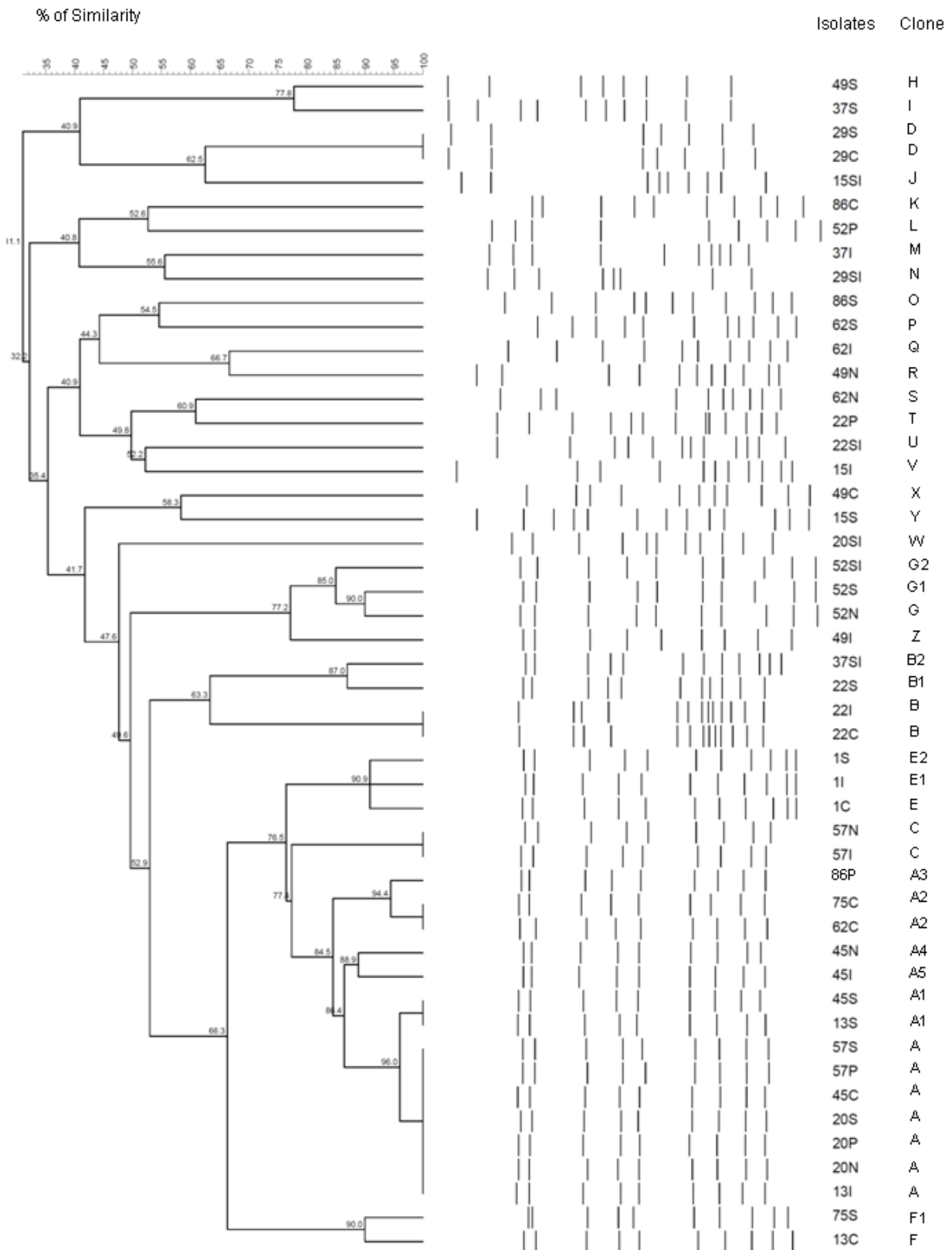
CVC: Central Venous Catheter; NP: Not Performed; NEG: Negative Culture

Table 2. Pathogenesis of bloodstream infection caused by *S.epidermidis* in neonates with central venous catheter

Infected Patient	CVC type	CVC Duration (days)	Duration of catheterization before BSI onset, days	Duration of parenteral nutrition BSI onset, days	Sites with concordant isolates ^a	Route of acquisition ^b
1	Umbilical	9	9	9	Hub, Gut, blood	Definite Intraluminal
13	Phlebotomy	33	22	22	Gut, blood	Translocation
15	PICC	30	13	11	No concordance	Indeterminate
20	PICC	22	17	17	Tip, Nostril, blood	Translocation
22	PICC	47	45	42	Hub, Gut	Indeterminate
26	PICC	63	39	46	NP	Probable Intraluminal
29	PICC	16	18	17	Hub, blood	Definite Intraluminal
37	PICC	31	15	13	No concordance	Indeterminate
45	PICC	22	18	5	Hub, Gut, Nostril, blood	Translocation
47	PICC	20	20	37	NP	Indeterminate
49	PICC	48	16	4	No concordance	Indeterminate
51	PICC	34	4	31	NP	Probable Intraluminal
52	PICC	30	10	6	Skin, Nostril, blood	Definite Extraluminal
57	PICC	20	12	10	Tip, Gut, Nostril, blood	Translocation
62	PICC	47	13	0	No concordance	Indeterminate
69	PICC	15	15	9	NP	Probable Translocation
75	PICC	25	7	0	No concordance	Indeterminate
82	PICC	12	11	7	NP	Probable Intraluminal
86	Umbilical	9	8	7	No concordance	Indeterminate

a - Molecular subtyping by pulsed-field gel electrophoresis was used to determine the concordance of all *S. epidermidis* isolates b- For definitions, see Methods CVC: Central Venous Catheter; BSI: bloodstream infection PICC: Peripherally inserted catheter; NP: Not Performed

Figure 1. Clonal DNA Profile of *S. epidermidis* isolated from CR-BSI and sites included in the PFGE-based pathogenesis analyses



DISCUSSION

Understanding the pathogenesis of CR- BSIs is essential to better define the adoption of more effective strategies for the prevention and control of these infections. However few studies applying molecular techniques regarding the origin and potential spread route of microorganisms to the tip of the catheter and blood are available.¹²

Like the study conducted by Garland et al. (2008)⁵, where the route of acquisition of the microorganism present in blood was determined in only 40% of the cases, in the present study carried out on critical neonates, most BSI was indeterminate (42.1%) or probable (21.1%) and only 36.8% were from a confirmed source. This difficulty in confirming CVC contamination routes strongly demonstrate that CR-BSI pathogenesis in neonates cannot be easily defined, in contrast with adult cases, in which the two main routes of contamination of the catheter tip with potential to infect blood are intraluminal (10-50%) and extraluminal (75-90%).¹⁶

In premature infants, the combination of an immature immune system and an atrophied intestinal mucosa due to the frequent use of parenteral nutrition in addition to the presence of potentially pathogenic microorganisms in the intestinal and nostril microbiota, represents increased risk of microorganism translocation to the blood.¹⁷ Thus, microbial translocation from the mucosa can be considered a substated origin of microorganisms in blood. Although translocation was determined in only four cases (21.1%) herein, most neonates with BSI caused by *S. epidermidis* presented this microorganism in both the intestinal mucosa and nostril, in addition to being in frequent use of early parenteral nutrition for a long period of time.

The detection of identical clones (59,2%) in different patients during the same period confirms cross-transmission in the assessed neonatal ICU, reinforcing problems with hand hygiene in the unit.¹⁸ The importance of hand hygiene in health professionals concerning the transmission of health care-related infection is known worldwide and represents the most common way of disseminating microorganisms in the hospital environment.¹⁹

Generally, in low and middle-income countries, such as Brazil, several factors can lead to the emergence and spread of a resistant clone, especially in ICUs. These include a high density of antibiotic use, that results in selective pressure responsible for the emergence of resistant and multiresistant isolates, added to the existence of dominant clones and failures in basic infection prevention and control practices, which may justify the dissemination of this microorganisms in the hospital environment.²⁰

Although the origin of the microorganism was confirmed in some cases, strategies designed to prevent extraluminally-acquired BSI should be combined with infection prevention strategies to avoid infections that originate from intraluminal contaminants. Despite efforts to elucidate the pathogenesis of catheter-related bloodstream infection in critical neonates using molecular techniques, studies have not been sufficient in this regard and this process remains unclear, requiring more thorough studies.

Despite the clinical and epidemiological importance of bloodstream infections in critical neonates, it is interesting to note that a higher number of *S. epidermidis* samples was not able to prove the origin of most microorganisms present in neonate blood, demonstrating the difficulty in determining it in this population of patients. In addition, this study demonstrates that, despite the high clonal diversity displayed by isolates, cross-transmission still occurred.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank members of Laboratory Virology, Department of Microbiology-DEMIG/UFU for the use of equipment, and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support. The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Rosado V, Romanelli RM DC, Camargos, PA. Risk factors and preventive measures for catheter-related bloodstream infections. *J Pediatr* 2011; 87: 469-477.
2. Chong J , Quach C , Blanchard AC , Poliquin PG , Golding GR , Laferrière C , Lévesque S . Molecular Epidemiology of a Vancomycin-Intermediate Heteroresistant *Staphylococcus epidermidis* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60:5673-5681.
3. ANVISA. Critérios Diagnósticos de Infecção Associada à Assistência à Saúde Neonatologia. Brasília <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno.....> Published 2017. Accessed November 12, 2018.
4. Brito CS , Ribas RM, Resende DS, Brito DV, Abdallah VO, Santos KR, Cavalcante FS, Matos PD, Gontijo Filho PP. Genotypic study documents divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates. *Braz J Infect Dis* 2014; 18: 387-393.
5. Garland, J.S., Alex, C.P., Sevallius, J.M., Murphy, D.M., Good, M.J., Volberding, A.M. et al. Cohort study of the pathogenesis and molecular epidemiology of catheter-related bloodstream infection in neonates with peripherally inserted central venous catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 243–249.
6. Öncü S, Özsüt H, Yildirim A, Ay P , Çakar N., Eraksoy H & Çalangu S . Central venous catheter related infections: risk factors and the effect of glycopeptide antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2003; 27: 2-3.
7. Mahieu LM, De Muynck AO, Ieven MM, De Dooy JJ, Goossens HJ, Van Reempts PJ. Risk factors for central vascular catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect* 2001; 48:108-116.
8. Crump JA, Collignon PJ. Intravascular catheter-associated infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:1-8.

9. Fernandes PC, Dolinger EJ, Abdallah VO, Resende DS, Gontijo Filho PP, Brito DV. Late onset sepsis and intestinal bacterial colonization in very low birth weight infants receiving long-term parenteral nutrition. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44:447-450.
10. Shepherd EG, Kelly TJ, Vinsel JA, Cunningham DJ, Keels E, Beauseau W, McClead RE Jr. Significant reduction of central-line associated bloodstream infections in a network of diverse neonatal nurseries. *J Pediatr* 2015;167: 41-46.
11. Digiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ;160 :976-981.
12. Garland JS, Uhing MR. Strategies to prevent bacterial and fungal infection in the neonatal intensive care unit. *Clin Perinatol* 2009; 36:1-13.
13. Brun-Buisson C, Abrouk F , Legrand P , Huet Y , Larabi S , Rapin M . Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern. Med* 1987; 147: 873-877.
14. Maki DG, Weise CE , Sarafin HW . A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; 296: 1305-1309.
15. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010; 10: 866-875.
16. Sherertz RJ , Ely EW, DM Westbrook, et al. Education of physicians-in-training can decrease the risk for vascular catheter infection. *Ann Intern Med* 2000; 132: 641-648.
17. Westerbeek EA , Van den Berg A , Lafeber HN , Knol J. , Fetter WP , van Elburg RM . The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: a review of the literature. *Clin Nutr* 2006; 25: 361-368.
18. Milisavljevic V , Wu F, Cimmotti J, Haas J, Della-Latta P, Larson E, Saiman L. Genetic relatedness of *Staphylococcus epidermidis* from infected infants and staff in the neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 2005; 33: 341-347.

19. Allegranzi B , Pittet D. Role of hand hygiene in healthcare-associated infection prevention. *J Hosp Infect* 2009; 73: 305-315.
20. Monsen T, Karlsson C, Wiström J. Spread of clones of multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci within a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:76-80

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você/seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada “O Papel de um Pacote de Medidas na Redução de Infecções de Corrente Sanguínea e Estudo de sua Patogênese em Neonatos Críticos”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho, Dra. Denise Von Dolinger de Brito, Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdalla, Jane Eire Urzedo, Ms. Daiane Silva Resende

Nesta pesquisa nós estamos buscando avaliar o impacto de um pacote de medidas dirigido aos cuidados e manutenção do Cateter Venoso Central , na redução das Infecções de Corrente Sanguínea Associada ao Cateter, bem como a patogênese destas infecções, na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da UFU.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido pelo pesquisador Ms. Daiane Silva Resende, na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal.

Na sua participação seu filho (a) foi submetido aos procedimentos abaixo relacionados:

- coleta do material no local de entrada do cateter, por meio de um swab estéril;
- coleta do material no cateter, por meio de um swab estéril;
- coleta da ponta do cateter, quando ele for retirado do neonato (pelos profissionais da unidade).

Todo material foi analisado no Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umarama, Bloco 4C, andar superior, localizado na Rua Amazônia, sem número, telefone: 3218-2236. Em nenhum momento você foi identificado. Os resultados da pesquisa foram publicados e ainda assim a sua identidade foi preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa. A pesquisa não oferece nenhum risco e nenhum benefício ao neonato. Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

-Prof. Dr. Paulo P. Gontijo Filho (Coordenador, ARIMP, UFU)

-Ms. Daiane Silva Resende (Responsável, UFU)

Laboratório de Microbiologia- (034) 3218-2236.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco J, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131.

Uberlândia, dede 200.....

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Participante da pesquisa

ANEXO III

Técnicas microbiológicas

A coleta de material para a realização das culturas microbiológicas para o estudo da patogênese foi realizada a partir dos seguintes sítios:

Pele no sítio de inserção do CVC

Foram realizadas coletas com 48h, no sétimo e após quatorze dias da inserção do dispositivo, ou até positividade da hemocultura, com utilização de um campo fenestrado delimitando uma área de 20 cm² através de um swab pré-umedecido em salina, e posteriormente colocado em um tubo contendo 1mL de salina estéril. Os tubos foram agitados em vortex 0,1mL da suspensão resultante foi inoculado em placas de Ágar Sangue e Manitol Salgado, seguindo-se incubação à 37°C por 24h. As culturas foram consideradas como positivas quando de um crescimento de ≥ 200 UFC/ 20 cm² de camada córnea (MAKI; RINGER; ALVARADO, 1991).

Canhão do cateter

Foram realizadas coletas com 48h, no sétimo e após quatorze dias da inserção do dispositivo, ou até positividade da hemocultura, com uso de um swab, colocado em um tubo contendo 1mL salina estéril. No laboratório, o tubo foi agitado em vortex e, cerca de 0,1mL do líquido, inoculado em placas de Ágar Sangue e Manitol Salgado incubadas a 37°C por 24h.

Mucosa Nasal e Intestinal

Foram realizadas coletas com 48h, no sétimo e após quatorze dias da inserção do dispositivo ou até positividade da hemocultura. Foram coletados material na narina e na região perianal com auxílio de swab estéril e transportados rapidamente para o Laboratório de Microbiologia em tubos contendo 1,0 ml de solução salina estéril. O tubo foi agitado em vortex e um inóculo de 0,1 mL semeado em placas de Agar Manitol Salgado e “*Trypticase Soy Agar*” (TSA), seguindo-se incubação a 37°C por 48 horas.

Ponta do CVC

O cateter foi removido em condições assépticas, sua ponta foi cortada com tesoura estéril e transportada para o laboratório em tubo estéril. As culturas foram realizadas através das seguintes técnicas:

a) Semi-quantitativa de “Roll-plate” (Maki)

Um segmento de 5cm da ponta do cateter foi utilizado para o cultivo em Ágar Sangue e Manitol Salgado, através da sua rolagem por quatro a cinco vezes sobre a superfície das placas, seguindo-se incubação à 35°C por 48h. O crescimento de ≥ 15 colônias foi indicativo de colonização/infecção e considerada como uma cultura semi-quantitativa positiva (MAKI; WEISE; SARAFIN, 1977).

b) Técnica do “vortexing”

As culturas das pontas de cateter foram realizadas quantitativamente (BRUN-BUISSON et al., 1987), com modificações: um segmento de aproximadamente 5cm da ponta de cateter foi colocado em um tubo contendo 10mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) acrescido de 0,1% de Tween 80 e agitado em vortex por 1 minuto. Uma alíquota de 0,1mL da suspensão resultante foi semeada em placa de Ágar Sangue seguindo incubação à 35°C por 48 horas. A cultura foi considerada positiva quando o crescimento foi $\geq 10^3$ UFC/mL.

Hemoculturas

O agente etiológico das hemoculturas positiva foi identificado no laboratório de Hospital de Clínicas pelo sistema automatizado Vitek 2[®] (Biomérieux, França).

Estocagem das amostras

As culturas provenientes dos diversos sítios descritos anteriormente foram estocadas em tubos contendo o meio “Brain Heart Infusion” (BHI) acrescido de glicerol 20%, e mantidos no freezer a -20°C até a realização dos testes fenotípicos.

Caracterização do gênero *Staphylococcus*

As amostras foram coradas pelo método de Gram, objetivando-se a observação das características morfotinturiais. Após a confirmação dessas características, elas foram submetidas aos testes de catalase, coagulase, óxido-fermentação da glicose e suscetibilidade à bacitracina, realizados segundo Bannerman (2003).

a) Presença da enzima catalase

Foi verificada em lâmina de microscopia pela mistura da suspensão bacteriana com solução de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas foi indicativo da presença da enzima. As amostras padrão *S. epidermidis* ATCC-12228 (American Type Culture Collection) e *Enterococcus faecalis* ATCC -29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

b) Óxido-fermentação da glicose

O metabolismo fermentativo ou oxidativo foi verificado em meio OF acrescido de 1% de glicose. A amostra foi sub-cultivada em dois tubos contendo o meio de OF, sendo um deles coberto com uma camada de óleo mineral. Em seguida, os tubos foram incubados por 48 hs à 37°C, e a mudança de cor, quando presente em ambos foi indicativa de metabolismo fermentativo, enquanto a observação de alteração de cor apenas no tubo sem o óleo de metabolismo oxidativo. As amostras controle utilizadas foram as de *Staphylococcus aureus* ATCC-25923 (fermentador) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853 (oxidativo).

c) Suscetibilidade à bacitracina

O inóculo foi feito a partir de uma suspensão bacteriana em salina estéril padronizada segundo a turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala McFarland (10^8 UFC/mL). Foi semeada com auxílio de swab em Ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C por 48h, após a aplicação de um disco contendo 0,04U de bacitracina na superfície do meio. As amostras que apresentaram halos de inibição menores ou iguais a 10mm foram consideradas resistentes a bacitracina, utilizando-se como controle positivo (bacitracina resistente) uma amostra de *Staphylococcus sp.* e como controle negativo *Micrococcus luteus* ATCC 10240.

d) Coagulase ligada (fator “clumping”)

Foi realizado sobre uma lâmina de microscopia pela adição de uma gota de plasma de coelho e outra de uma suspensão bacteriana preparada em salina. O controle do teste foi realizado utilizando-se apenas a suspensão bacteriana. A leitura do teste foi feita após 60 segundos pela visualização da formação de grumos. A amostra padrão utilizada como controle positivo foi *S. aureus* ATCC 25923 e a de *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo.

e) Coagulase livre

A partir de colônias isoladas em Agar sangue, uma alça microbiológica contendo a cultura foi transferida para tubo com plasma de coelho diluído 1:4 (v:v) em solução salina. A leitura foi feita após 4 hs. e a confirmação do resultado negativo realizada em 24 h, após a incubação à 37°C em banho- maria. As amostras padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

Identificação das espécies de *Staphylococcus coagulase-negativa*

As amostras de SCN isoladas foram identificadas quanto à espécie no Laboratório de Microbiologia do HC-UFU pelo sistema automatizado Vitek 2[®] (Biomérieux, França).

ANEXO IV

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Uberlândia, 13/10/10.

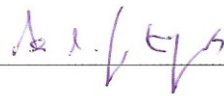
À Profª. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/UFU)

Prezada coordenadora,

Estamos encaminhando para análise, por este Comitê, o seguinte protocolo de pesquisa:

TITULO DO PROJETO: O Papel de um Pacote de Medidas na Redução de Infecções de Corrente Sanguínea e Estudo de sua Patogênese em Neonatos Críticos
NOME COMPLETO DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho
CPF: 046704267-53
DEPARTAMENTO: Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), área de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia (ARIMP). Universidade Federal de Uberlândia
ENDEREÇO: Av. Pará nº 1720 Campus Umuarama, Uberlândia-MG Brasil
TELEFONE: (034) 3218-2236
FAX: (034) 32182333
E.MAIL: gontijofilho@ufu.br
PATROCINADOR: -

Atenciosamente,



Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho

464/10

CEP-Comitê de Ética na
Pesquisa com Seres Humanos
Protocolo Nº: 464/10
Recebido Por: DM