



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Curso de Doutorado

Etiopatogenia de infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus epidermidis* associadas e relacionadas ao uso de cateter vascular central em neonatos críticos

Cristiane Silveira de Brito

Uberlândia- MG.

2011.





Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Curso de Doutorado

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de
Pós- Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor (a).

Cristiane Silveira de Brito

Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho (Orientador)

Profa. Dra. Kátia Regina Netto dos Santos (Co- Orientadora)

Uberlândia- MG.

2011.



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

B862e Brito, Cristiane Silveira de, 1980-
Etiopatogenia de infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus epidermidis* associadas e relacionadas ao uso de cateter vascular central em neonatos críticos [manuscrito] / Cristiane Silveira de Brito. - 2011.
68 f. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho.
Co-orientadora: Kátia Regina Netto dos Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Infecção hospitalar - Teses. 2. Cateteres - Teses. 3. Recém-nascidos - Teses. I. Gontijo Filho, Paulo Pinto. II. Santos, Kátia Regina Netto dos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.98:615.478

**Aos meus pais, José Marcondes e Maria Inez, e a TODOS meus
Mestres que gradativamente foram me ensinando o valor da ciência.**



“Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento, mas como um mero colaborador em uma grande obra comum.”

Hermann Von Helmholtz

(Físico e Fisiologista / 1821- 1894)

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as bênçãos que ele tem colocado em minha vida e por estar presente em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis;

Aos meus pais, José Marcondes e Maria Inez, por toda dedicação, amor incondicional, incentivo e pela estrutura familiar que me ofereceram durante toda minha vida;

À minha irmã Juliana, pela amizade, apoio e paciência nos momentos difíceis;

Aos meus familiares que torcem muito por mim;

Ao meu orientador Dr. Paulo Gontijo por todo auxílio e por compartilhar não apenas seus conhecimentos, como também suas experiências profissionais e de vida com seus alunos;

Às minhas amigas Lícia, Lilian, Renata e Rosi, por dividirem comigo os melhores e piores momentos desta caminhada;

Aos professores do laboratório de Microbiologia, Rosineide, Denise e Geraldo, pela amizade, apoio e ensinamentos;

À professora Kátia e toda a sua equipe do Laboratório de Infecção Hospitalar da UFRJ, pelo apoio durante a realização da análise molecular das amostras clínicas;

À professora Deise, do Laboratório de Imunologia- UFU, que gentilmente emprestou o espectrofotômetro para realização do teste fenotípico de produção de biofilme;

A três anjos que Deus colocou em minha vida durante este período: Daiane, Leandro e Raniery pelo carinho, amizade e colaboração que foi imprescindível para a realização deste projeto;

À Dra. Vânia pela confiança e oportunidade de realização do estudo na UTI neonatal do HC-UFU;

Às enfermeiras da UTI neonatal pelo apoio técnico,

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia, Claudete, Ricardo e Samuel, pela amizade e ajuda;

Aos amigos microbiologistas Dayane, Karinne, Juliana, Lizandra, Michel, Luís Fernando, Munik, Jacqueline, Deivid, Ana Paula, Marcília, Elias e Rodolfo pela amizade e convivência;

Aos funcionários, Jorge, Luceleide e Lucélia pela colaboração, amizade e esclarecimentos de ordem burocrática;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram e apoiaram na execução deste projeto.

Obrigada a todos vocês!!!

Sumário

	Pág.
Lista de abreviaturas	09
Lista de tabelas	11
Lista de Figuras	13
Lista de Anexos	14
Resumo	15
Abstract	16
Introdução	17
Objetivos	25
Casuística e métodos	26
Desenho do estudo	26
Definições	26
Técnicas microbiológicas	27
Estocagem	29
Caracterização do gênero <i>Staphylococcus</i>	29
Identificação espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	30
Teste de produção de slime	33
Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos	33
Análise Molecular	34
Técnica PCR	35
PFGE	36
Análise estatística	37
Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	37
Resultados	38

Discussão	55
Conclusões	63
Referências bibliográficas	64
Anexo I	82
Anexo II	83
Anexo III	84
Anexo IV	85



Lista de abreviaturas

- ATCC: “American Type Culture Collection”
- *atlE*: “*Staphylococcus epidermidis* autolysin”
- BHI: “Brain Heart Infusion”
- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”
- CVC: Cateter vascular central
- CVU: Cateter venoso umbilical
- DIV: Dispositivo intravascular
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- dNTP: desorribonucleotídeo trifosfatado
- EDTA: “Ethylenediamine tetraacetic acid”
- fbe: “ fibrinogen binding protein”
- HCl: Ácido clorídrico
- HC-UFU: Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
- IH: Infecção Hospitalar
- *ica*: “ Intercellular adhesion locus”
- *mec*: “ Methicillin resistance”
- MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- MR-SCoN: *Staphylococcus* coagulase negativa resistente a meticilina
- NCCLS: “ National Committee for Clinical for Laboratory Standars”
- NHSN : “National Heathcare Safety Network”
- NNIS: “National Nosocomial Infections Surveillance System”
- PCR: Reação em cadeia da polimerase
- PIA: “Polysaccharide Intercellular Adhesin”

- PFGE: “ Pulsed Field Gel Electrophoresis”
- SCCmec: “ Staphylococcal Cassette Chromosome”
- SCoN: *Staphylococcus* coagulase negativa
- TSA: “Trypticase Soy Agar”
- TSB: “Trypticase Soy Broth”
- UFC/ mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
- UTIN: Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
- µg: micrograma

Lista de tabelas

Pág.

Tabela 1- Taxas de sepse com critério microbiológico, associada/ relacionada à cateter vascular central no período de Abril/2006 – Abril/2008.....	39
Tabela 2- Taxas de incidência de sepse relacionada/associada à cateter vascular central por categorias de peso ao nascer segundo critérios do National Healthcare Safety Network.....	40
Tabela 3- Tipos, colonização de ponta de cateter e sepse relacionada/ associada à CVC.....	41
Tabela 4- Distribuição de infecção de corrente sanguínea associada/ relacionada a diferentes tipos de cateter vascular central, conforme peso do neonato ao nascer.....	41
Tabela 5- Fatores de risco para sepse associada à CVC em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de abril 2006 a abril 2008.....	43
Tabela 6- Análise multivariada de fatores de risco para sepse associada ao uso de CVC em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.....	44
Tabela 7- Microrganismos isolados de ponta de CVC colonizada e sangue e neonatos com sepse associada e relacionada à cateter vascular central.....	45

Tabela 8- Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central isolados de neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008.....45

Tabela 9- Patogênese das infecções relacionadas a cateter venoso central em 10 neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008.....45

Tabela 10- Resistência de amostras *Staphylococcus* coagulase negativa em 183 amostras isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central, isolados de neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008.....49

Tabela 11- Produção de biofilme e susceptibilidade de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central em neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008.....51

Tabela 12- Patogênese de colonização de ponta de cateter vascular central de curta duração inseridos em neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008.....52

Tabela 13- Patogênese de colonização de ponta de cateter vascular central de longa duração inseridos em neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008.....53

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1- Dendograma dos perfis genotípicos de amostras de <i>Staphylococcus epidermidis</i> após fragmentação pela enzima de restrição SmaI e análise por PFGE através da análise computadorizada.....	47
Figura 2- Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 154 pb e 546 pb dos genes <i>mecA</i> e <i>icaAD</i> , respectivamente, de amostras de <i>S. epidermidis</i> isoladas de neonatos.....	50

Lista de Anexos

Pág.

Anexo I- Ficha utilizada para realização de vigilância NHSN.....	82
Anexo II- Termo de consentimento.....	83
Anexo III- Aprovação do Comitê de Ética.....	84
Anexo IV- Trabalhos publicados.....	85



Resumo

Infecções de corrente sanguínea associada/ relacionada a cateter vascular central (CVC) em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs) são freqüentes, graves e onerosas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a incidência de infecção de corrente sanguínea relacionada/associada a diferentes tipos de CVC e investigar a patogênese dessas infecções em neonatos críticos internados na UTIN do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia-MG. O estudo foi realizado no período entre Abril/2006 e Abril/2008. Foram investigados 318 neonatos em uso de CVC através de vigilância “National Healthcare Safety Network”. As hemoculturas foram realizadas por método automatizado (BACTEC /VITEK®) no laboratório de microbiologia do hospital. Adicionalmente, foram realizadas culturas de mucosa nasal, pele no sítio de inserção, canhão e ponta de CVC. O trabalho obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o nº 022/06. A incidência de infecção de corrente sanguínea associada e relacionada à CVC foi de 13,0 e 2,1/ 1000 dias CVC, respectivamente. O cateter umbilical (40,6%) e o PICC (39,6%) foram os CVCs mais utilizados com tempos médios de uso de 5,3 e 13,6 dias, respectivamente. O principal agente de sepse relacionada ao uso de CVC foi *Staphylococcus epidermidis* (60,0%), seguido de *Staphylococcus aureus* (30,0%) e *Enterococcus faecalis* (10,0%). O cateter umbilical foi responsável por 50,0% das infecções relacionadas ao uso deste dispositivo. No total, 39,0% e 22,0% das amostras de ponta de CVC e sangue, respectivamente, apresentaram produção de biofilme. Cerca de 83,0% e 67,0% das amostras de sangue e ponta de cateter, respectivamente, isoladas dos casos de infecção sanguínea relacionada à CVC, foram resistentes à oxacilina e produtoras de biofilme. O gene *mecA* foi detectado em 50,0% das amostras de *S. epidermidis* isoladas de sangue e ponta de CVC dos pacientes com infecção relacionada à CVC e, o gene *icaAD* foi detectado em 33,3% e 50,0% das amostras isoladas de sangue e ponta de CVC, respectivamente. Houve concordância entre os clones de *S. epidermidis* recuperados do sangue e ponta do CVC em apenas um paciente, sem definição de origem, se pele, mucosa nasal ou canhão do cateter, em decorrência de culturas negativas desses locais. Há evidências de que a patogenia de infecção de corrente sanguínea relacionada à CVC em neonatos difere daquela relatada em adultos e, o seu melhor conhecimento certamente permitirá a adoção de práticas de prevenção e controle dessas infecções.

Palavras – chave: Neonatos, Infecção de corrente sanguínea, cateter vascular central

Abstract

Bloodstream infections associated/related to central vascular catheters (CVC) at Neonatal Intensive Care Units (NICUs) are frequent, severe and costly. The aim of this research was to evaluate the incidence of bloodstream infection related / associated with different types of CVC and to investigate the pathogenesis of these infections in critical newborns hospitalized in the NICU at the Uberlândia University Hospital. The study was conducted between April/2006 and April/2008. 318 neonates were investigated using CVC followed-up through epidemiologic vigilance “National Healthcare Safety Network”. Blood specimens were obtained from peripheral puncture. Hemocultures were performed by the automatic commercial system Bactec/ Alert (Vitek System). Additionally, were realized cultures of nostril, skin of CVC insertion site, “hub” and CVC tip. The ethical approval was obtained from the Ethics Committee of Uberlândia Federal University according to the Health Ministry demands under No. 022/06. The incidence of CVC-associated/related to BSI was 13.0 and 2.1 per 1000 days CVC, respectively. The umbilical catheter (40.6%) and PICC (39.6%) CVCs were used more frequently in times average usage of 5.3 and 13.6 days, respectively. *Staphylococcus epidermidis* was the most common microorganism (60.0%) in bloodstream infection related CVC, followed by *Staphylococcus aureus* (30.0%) and *Enterococcus faecalis* (10.0%). The umbilical catheter was associated with 50.0% of infections related to use of this device. In total, 39.0% and 22.0% of samples from the CVC tip and blood, respectively, showed biofilm production. Approximately 83.0% and 67.0% of blood samples and tip, respectively, isolated cases of CVC-related bloodstream infection were resistant to oxacillin and producing biofilms. The *mecA* gene was detected in 50.0% of strains of *S. epidermidis* isolated from blood and CVC tip of the patients with CVC-related infection, and the gene *icaAD* was detected in the 33.3% and 50.0% of strains isolated from blood and CVC tip, respectively. There was agreement among the clones of *S. epidermidis* recovered from blood and CVC tip in only one patient, without definition of origin where skin, nostril or “hub”, due to negative cultures of these places. There is evidence that the pathogenesis of bloodstream infection related to CVC in neonates differs from that reported in adults, and their best knowledge will certainly allow the adoption of practices to prevent and control these infections.

Key - words: Neonates, bloodstream infection, central vascular catheters

1.0- Introdução

O acesso vascular seguro é um dos fatores essenciais à prática médica moderna. Infelizmente, os dispositivos intravasculares necessários para estabelecer esse acesso confiável estão associados com o desenvolvimento de doença iatrogênica, particularmente, bacteremia e candidemia (WORTHINGTON, ELLIOT, 2005; POSFAY-BARBE, ZERR, PITTET, 2008). Entre esses dispositivos, destaca-se o uso de cateter vascular central (CVC) que pode ocasionar uma variedade de complicações locais e sistêmicas, incluindo: flebites, tromboflebite séptica, endocardite, bacteremia e metástase infecciosa em sítios anatômicos (FRATINO et al., 2001). Eles são utilizados para a administração de fluidos, medicamentos, nutrição parenteral e monitoramento hemodinâmico em pacientes críticos (NISHIKAWA et al., 2009) e são usados predominantemente nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs) (LEE, McMILLAN, OHLSSON, 2002) com uma prevalência que varia de 2 a 62,4% (CHIEN et al., 2002).

Estima-se que são inseridos mais de 150 milhões desses dispositivos por ano só nos Estados Unidos (WORTHINGTON, ELLIOTT, 2005) e que 80.000 resultam em infecção de corrente sangüínea, em pacientes de unidades críticas (BARSUK et al., 2009), com custos de até 2.3 bilhões/ano, variando de \$11.9 a 54.000/infecção e 28.000 óbitos (PROVONOST et al., 2007), prolongando a permanência hospitalar por cerca de 10- 40 dias (SAFDAR, MAKI, 2005).

A Organização Mundial de Saúde estima que a taxa de infecção hospitalar em UTINs varia de 5,9 a 32% (BANG et al., 2005). No Brasil estudos multicêntricos realizados em São Paulo (PESSOA-SILVA et al, 2004) e Belo Horizonte (COUTO et al., 2007), apresentaram taxas de 24,9 e 29,8 IHS/1000 paciente dia, respectivamente, enquanto Nagata e colaboradores (2002) encontraram incidência mais elevada em Londrina (62,0/1000 paciente dia).

As infecções associadas ao uso de CVCs representam 10 a 20% das infecções hospitalares (IHs) em pacientes adultos (EGGIMANN, PITTET, 2004) e aproximadamente a metade daquelas observadas em neonatos (PESSOA-SILVA et al., 2004). As infecções relacionadas ao uso do CVC, ou seja, aquelas em que o microrganismo detectado na corrente sanguínea também está presente na ponta do cateter, representam até 29% dessas infecções em UTINs com uma incidência que pode variar de 2- 49/1000 dias CVC (RAMASETHU, 2008).

Atualmente, os cateteres centrais de inserção periférica (PICC) são os mais usados em neonatos, especialmente em prematuros que requerem acesso venoso de longa duração (BROOKER, KEENAN, 2007). A sua permanência é possível por até 80 dias, com taxa de infecção associada ao uso de CVC inferior a 10% (VERGUNTA et al., 2005) porém, há relatos de incidência comparada aos demais cateteres centrais, em neonatos de muito baixo peso, variando de 10 a 30 por 1000 cateteres dia (FOO et al., 2001; SAFDAR, MAKI, 2005).

Os cateteres venosos umbilicais (CVU) diminuem o “stress” e promovem acesso intravenoso e são utilizados durante as primeiras duas semanas de vida, para administração de fluido e nutrição parenteral (SHAMA, PATOLE, WHITEHALL, 2002). Entretanto, entre as complicações associadas a este acesso incluiu arritmias, trombose intracardíaca, embolia pulmonar e sistêmica, endocardite, perfuração do miocárdio, hemorragia e, principalmente, infecção (ÖNAL et al., 2004) com uma taxa de aproximadamente 10% (WYERS, McALISTER, 2002).

Há variação significativa no uso de CVU (1,9 a 60,3%), PICC (0,2 a 48,1%) e cateter inserido cirurgicamente (0 a 20,5%) em função da população de pacientes considerada e, a duração média de uso é de 4 dias para o CVU, 10 dias para cateter percutâneo e 16 dias para cateter inserido cirurgicamente (CHIEN et al., 2002).

As infecções de corrente sanguínea, particularmente, bacteremias e candidemias, são classificadas em primárias quando de hemocultura positiva com o mesmo microrganismo

presente na ponta do cateter e ausência clínica e microbiológica de outra fonte de infecção (HOOD, DINCHER, 1995); e, secundária, quando o microrganismo isolado do sangue está associado a outro sítio de infecção (GARNER et al., 1998). Em adultos, as bacteremias primárias associadas ao uso de CVCs respondem por até 75% das infecções de corrente sanguínea relacionadas aos DIVs (ORNICH, MAKI, 2002).

A patogênese das infecções relacionadas aos cateteres centrais é multifatorial e complexa. Os dados disponíveis, provenientes de adultos, sugerem duas vias principais de contaminação da ponta do cateter com potencial infecção da corrente sanguínea: disseminação dos microrganismos intra e extralúmen. No cateter de curta duração (≤ 8 dias), ocorre principalmente como resultado da colonização de pele no sítio de inserção (75-90%), seguido do canhão (10-50%), via hematogênica (3-10%) e infundido contaminado (2-3%). Em pacientes críticos a via hematogênica pode ocorrer em até 50% dos episódios de infecção. Nos cateteres de longa duração (> 8 dias) a colonização do canhão é mais frequente (66%), seguido da pele no sítio de inserção (26%) (SHERERTZ, 2000). Há poucos estudos sobre a patogênese de infecção de corrente sanguínea relacionadas à CVCs em neonatos. Garland e colaboradores (2009) relataram que 67% dos neonatos com PICC tiveram a via intralúmen, 20% a via extralúmen e 13% indeterminada, como via de disseminação do microrganismo, a exemplo do observado em adultos, quando do uso de CVC de longa duração.

Em neonatos prematuros, a combinação de um sistema imunológico imaturo, o uso de nutrição parenteral, resultando em uma mucosa intestinal atrofiada, somado a presença de bactérias potencialmente patogênicas na microbiota representa risco de translocação a partir do lúmen intestinal para o sistema vascular resultando em sepse (WESTERBEEK et al., 2006). O desenvolvimento da microbiota inicia no momento do nascimento e é influenciado por vários fatores tais como: idade gestacional, tipo de parto, ambiente na unidade, tipo de alimentação e, sobretudo uso de antibióticos (HAMMERMAN, BIN- NUN, KAPLAN, 2004). A colonização bacteriana no intestino de neonatos, especialmente por bactérias benéficas

como lactobacilos e bifidobactérias é retardada particularmente naquelas em uso de antibióticos (WESTERBEEK et al., 2006).

Os fatores de risco para aquisição de sepse neonatal hospitalar incluem fatores intrínsecos como: prematuridade, fragilidade da pele, baixa idade gestacional, peso inferior a 1000g, e, extrínsecos como: uso e técnica de inserção de CVC e infusão de emulsão lipídica quando de nutrição parenteral (OLSEN et al., 2009; COUTO et al., 2007). O risco relativo de infecção de corrente sanguínea é 64 vezes maior nos pacientes em uso de CVC do que nos que utilizam cateteres periféricos (CICALINI et al., 2003).

De acordo com o “National Nosocomial Infections Surveillance System” (NNIS) (2001) os patógenos mais comumente isolados nas infecções sanguíneas primárias em pacientes adultos internados em UTI, no período de Janeiro de 1990 a Maio de 1999, foram *Staphylococcus coagulase negativo* (SCoN) (37%), *Staphylococcus aureus* (13%), *Enterococcus* sp (13%), bacilos Gram- negativos (14%) e *Candida* spp (8%).

As bactérias Gram-negativas são os principais patógenos de sepse neonatal em países em desenvolvimento (ZAIDI et al., 2005), enquanto, em UTINs de cuidados terciários que possuem espaço físico e práticas de controle de infecção adequados, os SCoN destacam-se como os principais agentes de sepse hospitalar neonatal, com o *Staphylococcus epidermidis* a espécie mais prevalente, representando cerca de 70% dos casos (STOOL et al., 2002; SHWAB et al., 2007).

A infecção neonatal por SCoN é menos grave, mas causa significativa morbidade, especialmente entre neonatos de muito baixo peso (VENKATESH, PLACENCIA, WEISMAN, 2006). A participação desse microrganismo como agente de sepse primária é difícil de ser definida pela dificuldade na distinção entre infecção e contaminação quando da coleta de sangue, necessitando-se de dois isolados a partir de duas coletas de sangue em sítios anatômicos distintos (KONEMAN et al., 2001), além de critérios clínicos, que incluem letargia, intolerância alimentar, distensão abdominal, comprometimento da função

respiratória, instabilidade da temperatura corpórea e fatores de risco perinatais (STRUTHERS et al., 2002).

Os agentes de bacteremias/candidemias relacionadas à CVCs formam biofilmes na superfície do polímero, como um dos principais mecanismos de patogenicidade (GARLAND et al., 2005). Na formação do biofilme, os microrganismos aderem-se inicialmente à superfície do CVC ou a receptores representados por glicoproteínas séricas como fibronectina e fibrinogênio, depositados na superfície do cateter, iniciando a fase de multiplicação de células, através da produção da matriz polissacarídica extracelular (“slime”), seguindo-se a fase de maturação e eliminação de inóculos metastáticos (GÖTZ, 2002). A estrutura do biofilme e a fisiologia dos microrganismos resultam em maior resistência aos antimicrobianos (DONLAN, COSTERTON, 2002). Os mecanismos responsáveis por essa resistência são: dificuldade de difusão do antimicrobiano através do biofilme; maior multiplicação de microrganismos; e, sobretudo maior expressão de genes associados à resistência aos antimicrobianos. A concentração de antibióticos necessária para eliminar as bactérias no biofilme pode ser quatro vezes maior do que comparada com o sangue e outros locais (MORALES et al., 2004).

A capacidade do *S. epidermidis* formar biofilme é considerada seu principal fator de virulência (FREDHEIM et al., 2009). A aderência microbiana a biomateriais depende das características da superfície bacteriana e da natureza do polímero. As interações iniciais envolvem forças físico-químicas não específicas incluindo: van der Waal, interações hidrofóbicas e polaridade (KLINGENBERG et al., 2007). A aderência inicial é resultante principalmente da hidrofobicidade associada a algumas proteínas da superfície celular. Duas proteínas de superfície estafilocócica, SSP-1 e SSP-2, possuem afinidade pelo polímero e contribuem para a aderência do *S. epidermidis* ao polietileno (VEENSTRA et al., 2004). A fase seguinte da formação do biofilme envolve a produção de adesão polissacarídica promovida pela adesina intercelular polissacarídica (PIA) codificada pelo gene *ica*

(CUCARELLA et al., 2001; RUPP et al., 2001). O operon *ica* é essencial na produção de biofilme, sendo constituído pelos genes *icaR* (regulatório) e *icaADBC* (genes de biossíntese) (ARAÚJO et al., 2006). Outras proteínas parecem estar envolvidas nesta fase, como a AAP de 140 kDa, que tem a função de ancorar PIA na superfície do *S. epidermidis* (MACK et al., 2006).

A formação do biofilme por *S. epidermidis* é também mediada por genes que codificam uma autolisina (AtlE) e a proteína ligante de fibrinogênio (fbe) (BRADFORD et al., 2006). A Atl é a hidrolase de peptideoglicano que predomina em estafilococos. Após a clivagem da parede celular por estas hidrolases, novos componentes de peptideoglicano sintetizados podem ser incorporados na estrutura da parede celular (BISWAS, et al., 2006). A AtlE é composta de um domínio amidase e outro com atividade de glicosaminidase. Heilmann e colaboradores (1997), identificaram o papel de AtlE como uma adesina envolvida na ligação primária das células à superfície de poliestireno.

Recentemente, foi descrita uma nova autolisina/adesina em *S. epidermidis* (Aae), associada à superfície celular, de 35kDa, com porção N-terminal com três seqüências repetitivas que podem ser domínios de ligação ao peptideoglicano (domínio LysM), encontrado em várias enzimas envolvidas no metabolismo da parede celular e também em outras adesinas. Adicionalmente, à atividade bacteriolítica, Aae também se liga ao fibrinogênio, fibronectina e vitronectina (HEILMANN, HUSSAIN, PETERS, 2003).

Alguns estudos demonstram que sepse por SCoN é causada por tipos clonais predominantes que são prevalentes entre neonatos e profissionais de saúde, sugerindo contaminação cruzada (KREDIET et al., 2004; VILLARI, SARNATARO, IACUZIO, 2000). No entanto, outros pesquisadores demonstraram a existência de uma diversidade genômica nas amostras de *S. epidermidis* recuperadas de hospitais da Ásia, Estados Unidos, Reino Unido e do Brasil (NUNES et al., 2005; HANSEN, KJELDSEN, SOLLID, 2004). Diferentes técnicas de genotipagem de SCoN são usadas em estudos epidemiológicos (BJÖRKQVIST et

al., 2002), mas o uso de gel de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) é considerado o método de escolha devido ao seu maior poder discriminatório (MIRAGAIA et al., 2002).

Outro fator relevante associado às infecções de corrente sanguínea é a ocorrência cada vez mais comum de patógenos resistentes aos antimicrobianos (SRIVASTAVA et al., 2007). A frequência de SCoN e *S. aureus* resistentes à oxacilina/ meticilina, enterococos resistentes à vancomicina, bacilos Gram-negativos resistentes às cefalosporinas de terceira geração e *Candida* “não *albicans*” resistentes ao fluconazol vêm aumentando nos últimos anos (REACHER et al., 2000). No tocante a resistência à meticilina em amostras SCoN de neonatos críticos, a frequência de amostras resistentes é ainda mais expressiva do que a observada para as de *S. aureus* (KREDIET et al., 2001). A disseminação horizontal de genes através de plasmídios entre as amostras, nas UTINs e o uso de β -lactâmicos são os componentes mais importantes na emergência de amostras resistentes (KLINGENBERG, 2005).

O mecanismo mais importante de resistência a meticilina é a produção de uma proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade com os β -lactâmicos, denominada PBP2a ou PBP2', codificada pelo gene cromossômico *mecA* (ARCHER, CLIMO, 1994) carregado por um elemento genético denominado de cassete cromossômico estafilocócico (“Staphylococcal cassette chromosome”). O SCCmec é uma ilha genômica de elementos móveis de DNA de 21 a 67 kb que é integrado em um único sítio (*attBsc*) no cromossomo de estafilococos resistentes, localizado próximo à origem de replicação. SCCmec carrega um dos três pares de genes A e B recombinase no cromossomo cassete (*ccrA* e *ccrB*), os quais codificam recombinases da família invertase-resolvase (ITO et al., 2001). A partir do descobrimento do primeiro elemento SCCmec, vários outros foram caracterizados pela combinação do tipo do complexo do gene *ccr* e a classe do complexo gene *mec*, composto pelo gene *mecA* e seu “open reading frames” (ORFs) próximo (HISATA et al., 2005).

Todos os três tipos de genes *ccrAB* foram encontrados em combinação com ambos os genes regulatórios *mec* completos e rearranjados em SCoN. Entretanto, esses três tipos de genes *ccrAB* também existem na ausência de genes *mec* em SCoN, ou seja, SCC não está somente relacionado à resistência a antibiótico mas pode servir como um sistema de permuta de informação genética geral em estafilococos (HANSSEN, KJELDSEN, SOLLID, 2004).

Um total de cinco tipos alélicos foram identificados nos elementos SCCmec. Três tipos de SCCmec (Tipo I, II e III) são carregados freqüentemente por amostras de estafilococos hospitalares (HISATA et al., 2005). Por outro lado, SCCmec tipo IV e V são freqüentemente encontrados em amostras de estafilococos adquiridos na comunidade. Estes elementos são caracterizados pelo tamanho pequeno (21 a 28kb) e falta de genes de resistência, exceto *mecA* conferindo resistência aos antibióticos β -lactâmicos e heteroresistência à meticilina e os estudos indicam que a aquisição destes elementos genéticos foram fatores determinantes na emergência de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), resultando na sua disseminação na comunidade (HIRAMATSU et al., 2001).

As IHS constituem um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil onde os recursos humanos e financeiros são muito limitados (MAHIEU, 2001). A vigilância epidemiológica destas infecções é necessária para um melhor controle e exige profissionais treinados e uma sistemática de trabalho acessível e aplicável (GEFFERS et al, 2006; BORGHESI; STRONATI, 2008).

Estratégias de prevenção de infecções de corrente sanguínea relacionadas à CVCs são baseadas no conhecimento da patogênese dessas infecções. Medidas que diminuam o risco de colonização da pele e do canhão do cateter, têm demonstrado diminuir as taxas das mesmas (CICALINI, PALMIERI, PETROSILLO, 2004), dentre as quais se destacam: lavagem rigorosa das mãos de profissionais de saúde e visitantes, cuidado meticuloso com a pele do neonato, redução da punção de veias, diminuição do tempo de cateterização e do estímulo ao uso de nutrição enteral precoce (PAULSON, MILLER, 2008; WEI et al., 2005).

2- Objetivo geral:

- Avaliar a incidência de infecção de corrente sangüínea por *Staphylococcus epidermidis* relacionada e associada ao uso de CVC e sua patogênese em neonatos críticos;

Objetivos específicos:

- Investigar a importância da colonização da mucosa nasal, pele no sítio de inserção e canhão do cateter na patogênese das infecções sangüíneas relacionadas à CVC;
- Determinar a relação de infecção associada/ relacionada com diferentes tipos de CVC (PICC, umbilical, flebotomia e “Intracath”) utilizados pelos pacientes com infecção associada e relacionada a estes dispositivos invasivos;
- Analisar escores clínicos como o SNAP-II e SNAPPE-II, o peso ao nascer, idade gestacional, tipo de CVC, tempo de hospitalização e de cateterização, uso de nutrição parenteral, prótese ventilatória e antibióticos como fatores de risco de infecção associada/relacionada ao uso de CVC;
- Analisar a suscetibilidade à oxacilina de amostras clínicas de *S. epidermidis* pela técnica de disco de difusão e, detecção do gene *mecA* através da técnica de PCR;
- Investigar a presença dos genes *icaAD* em amostras de *S. epidermidis* isoladas de pacientes com infecção de corrente sangüínea relacionadas à CVCs;
- Verificar os genótipos de *S. epidermidis* relacionados aos episódios de bacteremia na unidade através da utilização da técnica de PFGE, para caracterização de possível transmissão cruzada entre os neonatos.

3- Casuística e Métodos

3.1- Instituição

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) é um hospital de assistência terciária, de ensino, com 500 leitos. A UTIN é de nível III e compreende dez leitos e faz parte do Berçário de Alto Risco da instituição.

3.2- Desenho do estudo

Foi realizado estudo longitudinal, prospectivo com vigilância ativa pelo sistema “National Healthcare Safety Network” (NHSN) para avaliação da ocorrência de infecção de corrente sanguínea associada/ relacionada à CVCs por *S. epidermidis* em neonatos críticos, no período de abril de 2006 a abril de 2008. Os pacientes foram acompanhados 5 vezes por semana, desde a sua entrada até a sua alta ou óbito. Foi preenchida uma ficha individual com dados demográficos, diagnóstico clínico e fatores de risco intrínsecos e extrínsecos (Anexo I). Os pacientes somente foram incluídos na pesquisa mediante a autorização dos respectivos responsáveis através do termo de consentimento (Anexo II).

3.3- Definições:

Sistema NHSN: é um sistema de vigilância proposto pelo “Centers for Disease Control and Prevention” incluindo mais de 300 hospitais com participação voluntária para criar um banco de dados de infecção hospitalar nacional nos Estados Unidos.

Colonização da ponta do cateter: ausência de sinais de infecção no sítio de inserção do cateter e, crescimento de microrganismos $\geq 10^3$ UFC/ mL (análise quantitativa) ou ≥ 15 UFC/ mL (análise semi- quantitativa) (EGGIMANN, PITTET, 2002).

Infecção relacionada ao cateter: hemocultura positiva com o mesmo microrganismo presente na ponta do cateter (em avaliação quantitativa ou semi-quantitativa) e ausência clínica e microbiológica de outra fonte de infecção (EGGIMANN, PITTET, 2002; SIHLER et al., 2010).

Infecção de corrente sanguínea associada ao cateter: bacteremia com critério microbiológico, manifestações clínicas de sepse, mas sem confirmação laboratorial da colonização da ponta do CVC (ÖNCÜ et al., 2003; SIHLER et al., 2010).

3.4- Técnicas microbiológicas

3.4.1- Cultivos

3.4.1.1- Ponta do CVC

O cateter foi removido em condição asséptica e sua ponta cortada com tesoura estéril e transportada para o laboratório de microbiologia em tubo estéril.

a) Técnica Semi- quantitativa de Maki ou “Roll-plate”

Um segmento de 5cm do CVC foi utilizado para o cultivo. No laboratório, o segmento do cateter foi transferido para a superfície de placas de Ágar Sangue e Manitol Salgado para a cultura semi- quantitativa. O segmento do cateter foi rolado de quatro a cinco vezes sobre a superfície das placas que foram incubadas a 35°C por 48 horas. O crescimento de ≥ 15 colônias foi interpretado como colonização/infecção (MAKI et al., 1977).

b) Técnica do “vortexing”

Foi utilizada a técnica relatada por BRUN-BUISSON (1987) com algumas modificações: um segmento de 5cm da ponta de cateter foi colocado em um tubo contendo 10mL de PBS + 0,1% de tween 80 e agitado em vortex por 1 minuto; 0,1 mL da suspensão

semeada em placa de Ágar Sangue sendo em seguida, incubada à 35°C por 48 horas. As culturas foram consideradas positivas quando houve crescimento de $\geq 10^3$ UFC/mL.

3.4.1.2- Pele no sítio de inserção do CVC

A coleta foi realizada no quinto e após quatorze dias de inserção do cateter, através da utilização de um campo fenestrado delimitando uma área de 20 cm² onde foi passado um swab pré-umedecido em salina estéril que foi colocado em um tubo com 1mL de solução de salina estéril; cerca de 0,1mL do líquido foi inoculado em placas de Ágar Sangue e Manitol Salgado que foram incubadas à 35°C por 24 horas. A cultura foi considerada positiva quando de um crescimento de ≥ 200 UFC/ 20 cm² de camada córnea (MAKI et al., 1991).

3.4.1.3- Canhão do cateter

A coleta foi realizada no quinto e após quatorze dias de inserção do cateter através de um swab que foi colocado em um tubo de ensaio contendo 1mL salina estéril. No laboratório, o tubo foi agitado em vortex e, cerca de 0,1mL do líquido foi inoculado em placas de Ágar Sangue e Manitol Salgado incubadas a 35°C por 24h. As placas foram submetidas à análise qualitativa das colônias.

3.4.1.4- Hemocultura

Os casos de infecção sangüínea por *S. epidermidis* só foram incluídos nesse estudo quando de duas hemoculturas positivas.

Os espécimes de sangue foram obtidos a partir de punção de veia periférica. As hemoculturas foram realizadas inoculando-se 1mL de sangue em um frasco do sistema comercial automatizado Bactec/Alert® (Vitek System) no Laboratório de Microbiologia do HC- UFU. As culturas positivas foram subcultivadas em placas com Ágar Sangue e incubadas

a 35°C por 48 horas. Em seguida, as placas foram submetidas à análise qualitativa das colônias.

3.4.1.5- Mucosa nasal

As coletas de material de narina foram realizadas no quinto e após quatorze dias de inserção do cateter, através de um swab, que foi colocado em tubo de ensaio contendo 1mL de salina estéril. No laboratório, o tubo foi agitado em vortex e 0,1mL da suspensão resultante inoculada em placas de Agar Sangue e Agar Manitol Salgado, incubadas a 35°C por 24h. Em seguida foram submetidas à análise qualitativa das colônias.

3.4.2- Estocagem das amostras

As amostras de SCoN obtidas de infecção, colonização da mucosa nasal, canhão, ponta e pele do sítio de inserção do CVC foram armazenadas em Caldo Trypticase Soja acrescidos de glicerol 20% e mantidos no freezer a -20°C.

3.4.3 - Caracterização do gênero *Staphylococcus*

As amostras foram coradas pelo método de Gram para observação de sua morfologia e coloração e, foram submetidas às provas de catalase, coagulase e suscetibilidade à bacitracina. Os testes foram realizados segundo Bannerman (2003) e MacFaddin (1976).

a) Produção da enzima catalase

O teste foi realizado em lâmina de microscopia pela mistura de gotas de suspensão bacteriana e de peróxido de hidrogênio a 3%. A produção de bolhas foi indicativo da presença da enzima. As amostras padrão *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

b) Suscetibilidade à bacitracina

Uma suspensão bacteriana diluída em solução de salina estéril com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala McFarland ($\approx 10^8$ UFC/ml) foi semeada com swab em Ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubada a 35°C por 48h após a aplicação na superfície do meio de um disco contendo 0,04U de bacitracina (CECON, São Paulo, Brasil). Amostras com halo de inibição menor ou igual a 10mm foram consideradas resistentes a bacitracina. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foi utilizado como o controle positivo e *Micrococcus luteus*, cepa ATCC 10240 como controle negativo.

3.4.4 - Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa

a) Produção de coagulase ligada (fator “clumping”)

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

b) Produção de coagulase livre

Colônias foram transferidas para tubo contendo plasma de coelho diluído 1:4 em solução salina. A leitura para verificação de coagulação foi feita em 4 h e a confirmação de resultado negativo após 24 h de incubação à 37°C, em banho-maria. Amostras padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

c) Produção de hemólise

A observação visual de hemólise foi realizada em Ágar sangue desfibrinado de carneiro com leitura em 24, 48 e 72 h à 35⁰C. O aparecimento de zona de hemólise intensa ao redor das colônias após 48 h de incubação foi indicativo de hemólise positiva, enquanto uma zona de hemólise fraca ou ausente em até 72 h foi indicativo de hemólise fraca ou negativa, respectivamente. As amostras padrão de *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram utilizadas como controles de hemólise positiva e negativa, respectivamente.

d) Produção da enzima pirrolidonil arilamidase

Foi feita uma suspensão da amostra em caldo TSB, contendo 0,01% de L-pirroglutamil- β -naftilamina (Sigma Chemical Company) para verificar a produção da enzima pirrolidonil arilamidase. A leitura do teste foi realizada 4hs após incubação à 37⁰C em banho-maria, pela adição de uma gota de solução reveladora de dimetilaminocinamaldeído a 1% (Sigma Chemical Company) em HCl a 10% (v/v). O aparecimento de coloração rosa ou púrpura dentro de 10min, sob agitação leve, foi considerado indicativo de resultado positivo. Foi utilizada a amostra padrão *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737, como controle positivo e como controle negativo a amostra padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

e) Suscetibilidade à novobiocina

Uma suspensão bacteriana diluída em salina estéril na turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala McFarland ($\cong 10^8$ UFC/ml) foi semeada com auxílio de swab em Ágar Mueller-Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) e incubada a 35⁰C por 24h após a aplicação de um disco contendo 5 μ g de novobiocina (CECON, São Paulo, Brasil). Amostras

que apresentaram halos de inibição menores ou iguais a 16 mm foram consideradas resistentes a novobiocina. Este teste foi utilizado de forma complementar para espécies suspeitas de serem novobiocina-resistentes como: *S. saprophyticus*, *S. conhii*, *S. xylosus* e *S. sciuri*. As amostras padrão utilizadas como controle foram de *S. saprophyticus* CCM 883 (controle positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (controle negativo).

f) Teste da urease

Foi realizado em tubo de caldo uréia de Rustigian & Stuart (Difco Laboratories), pH 6,8, acrescido de 2% de uréia (Reagen). A leitura foi feita após 48-72 hs de incubação à 35⁰C, sendo a mudança de coloração do meio amarela para vermelha considerada como positiva. As amostras padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

g) Teste de ornitina descarboxilase

Foi verificada em caldo com 1ml de base Møller (Difco Laboratories) (pH 6,0) contendo 1% de L(+) ornitina (Sigma Chemical Company) seguida da adição de uma gota de óleo mineral esterilizado, após 72h de incubação a 35⁰C. A mudança da coloração do meio para amarelo foi indicativa de resultado negativo. Este teste foi utilizado de forma complementar na identificação de amostras suspeitas de *Staphylococcus lugdunensis*. As amostras padrão de *S. lugdunensis* DSM 4804 e *S. aureus* ATCC 25923 serão utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente, da descarboxilação da ornitina.

h) Fermentação de carboidratos

Foi realizada em tubo com caldo contendo vermelho de fenol, pH 7,4, contendo 1% de cada um dos seguintes carboidratos: manitol, manose e trealose (Sigma Chemical Company). A leitura foi feita após incubação à 35⁰C por 72 hs. A modificação da coloração do meio de

vermelho para amarelo foi considerada como resultado positivo. As amostras padrão de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Staphylococcus haemolyticus* CCM 2737 foram utilizadas como controles positivo ou negativo nestes testes.

3.4.5- Identificação pelo sistema RapID STAPH PLUS

A identificação das amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue, narina, ponta e canhão de CVCs dos casos de infecção relacionada ao uso de CVC, foram confirmadas pelo sistema RapID STAPH PLUS (Oxoid).

3.5- Teste de produção de “slime”

Foi utilizada a técnica descrita por Christensen e colaboradores (1982). Uma alça da cultura obtida em placa de Ágar sangue foi inoculada em 5mL de TSB, e incubada a 35°C por 48h. O conteúdo dos tubos foi descartado e os tubos lavados 2 vezes com água destilada e, posteriormente corados com safranina a 0,1% por 1 minuto; o excesso de corante foi descartado. Em seguida, foi avaliada a densidade ótica (DO) do biofilme através de um leitor de microplaca (Leitor de Elisa) em uma absorbância de 570nm. As amostras com DO menor que 0,2; entre 0,21 a 1,0 e maior do que 1,0 foram consideradas não produtoras, produtoras fracas e intensas de biofilme, respectivamente. Foram utilizadas como controle positivo amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 e controle negativo *S. epidermidis* ATCC 35982.

3.6- Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2006)

Teste de difusão a partir de disco

As amostras foram subcultivadas em TSA e incubadas à 37°C por 24 horas. Em seguida, cerca de 3 a 5 colônias foram semeadas em tubos contendo 3 mL de caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) (Biolife) e incubadas à 37°C. A suspensão resultante foi padronizada quanto a turvação segundo a escala 0,5 de MacFarland, que corresponde a uma concentração

de aproximadamente $1,2 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Com o auxílio de um swab a cultura foi semeada em placas de ágar Mueller-Hinton, segundo a metodologia do “Clinical and Laboratory Standards Institute” - CLSI (2006). A leitura foi realizada após a incubação a 37°C, por 24 horas.

Foram utilizados os seguintes discos (CECON) de antimicrobianos: ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), cefoxitina (30µg), rifampicina (5µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25µg), teicoplanina (30µg) e tetraciclina (30µg). A interpretação da leitura dos halos de inibição foi realizada segundo a técnica do CLSI (2006). A amostra padrão *S. aureus* 25923 foi utilizada como controle.

3.7- Análise molecular

Os testes foram realizados no laboratório de Infecção Hospitalar da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.7.1- Extração do DNA

A partir do crescimento em placa de Ágar sangue três a cinco colônias de cada amostra bacteriana foram transferidas para tubos eppendorfs com 100 µL de água destilada esterilizada (PCR-water, Sigma W-3500, St Louis, EUA), agitando-se vigorosamente e aquecendo por 10 minutos a 100°C, seguindo-se a centrifugação a 15000xg por 30 segundos. Foram utilizados 3 µL desta suspensão resultante para a reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.7.2- Técnica de PCR para detecção do gene *mecA* e do gene de virulência *icaAD*

A detecção dos genes *mecA* e *icaAD* foi realizada pela técnica de PCR-MULTIPLEX, conforme descrito por Santos e colaboradores (1999), Araújo e colaboradores (2006), Biswas e colaboradores (2006) e McClure e colaboradores (2006), respectivamente.

Cada experimento foi realizado em um volume final de 25 µL de uma solução reagente, contendo: 2,5 µL do tampão PCR 10x (Life Technologies, UK), 2 mM de cloreto de magnésio (Life Technologies, UK), 200mM de cada desoxinucleotídeo (dNTPs - A, G, T e C), 50 pM de cada par de “primers” específicos e 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Life Technologies, UK). A amplificação foi realizada em uma termocicladora (PTC-100; MJ research, Inc.).

Após a realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 15s, 30 ciclos de amplificação foram realizados: desnaturação a 94°C/15s, anelamento a 55°C/15s e extensão a 72° C/5s. Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 1x (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico, 2,5mM EDTA, pH 8,2), a 100V por 1:30h. O gel foi corado posteriormente com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e fotografado sob luz U.V. Como padrão de DNA foi utilizado o marcador 100pb DNA ladder (Life Technologies).

Foram utilizadas as amostras padrão de *S. epidermidis* ATCC 12228 como controle negativo e *S. aureus* ATCC 33591 como controle positivo.

“Primers” específicos utilizados na reação de PCR:

Genes	Seqüências
<i>mecA</i> - MRS ₁	TAGAAATGACTGAACGTCCG
<i>mecA</i> MRS ₂	TTGCGATCAATGTTACCGTAG
<i>icaAD</i> - F	TAGTAATCACAGCCAACATCTT
<i>icaAD</i> -R	AAACAAACTCATCCATCCGAAT

3.7.3- Análise dos perfis de macrorestrição do DNA cromossômico após clivagem com enzima de restrição *SmaI* e Eletroforese em Campo Pulsátil

A técnica foi realizada segundo descrito por Nunes e colaboradores (2005). Foram utilizadas amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de corrente sanguínea, mucosa nasal, ponta e canhão do CVC.

Inicialmente as amostras foram cultivadas em meio de Ágar sangue a 37°C, por 24h. Posteriormente, 5 colônias foram inoculadas em 5ml de caldo TSB e incubadas durante 18h a 37°C para obtenção de crescimento bacteriano com turbidez correspondente à do tubo 2 da escala de MacFarland ($\approx 6.0 \times 10^8$ UFC/ml). Em seguida, 2ml desta suspensão foram centrifugadas (700xg por 5min) e o sedimento ressuspenso em 250µl de tampão PIV (NaCl 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,6). A esta suspensão foi adicionado o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (“Low Melting Point Agarose”, IBI Technical, New Haven, USA) a 2% e mantida a 58°C. Após homogeneização, a agarose foi distribuída em moldes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Califórnia, EUA) que foram mantidos a 4°C por cerca de 10min. Posteriormente, os blocos de agarose foram colocados em 2ml de solução de lise EC (Tris-HCl 6mM pH7,6, NaCl 1M, EDTA 100mM pH 7,5, Brij 58 0,5%, lauril sarcosinato de sódio 0,5%) contendo 100µl de lisozima (500mg/L; Sigma) e 100µl de lisostafina (50mg/L; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) e incubados a 37°C, sob leve agitação, durante 18 a 24h. Após este período, a solução foi substituída por 2ml de solução ESP (EDTA 0,4M pH 9,5 lauril sarcosinato de sódio 1%) contendo 10µl de proteinase K (Sigma) a 20mg/ml, sendo esta mistura incubada a 50°C, em banho de imersão, sob leve agitação, durante 18 a 24h. Ao final desta fase, os blocos de agarose foram estocados em nova solução ESP (sem proteinase) a 4°C. A digestão do DNA cromossômico foi realizada a partir de 1 par de blocos de agarose. Inicialmente, os blocos de agarose foram lavados quatro vezes em tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5 e EDTA 10mM) a 37°C, sendo as duas primeiras lavagens de 1h cada e as duas subseqüentes de 2h. Após este processo, os blocos de agarose foram transferidos para uma

solução contendo 250µl do tampão específico da enzima de restrição *SmaI* (Boehringer Mannheim Corporation, Indianópolis, IN, USA) e incubados a 25°C, por no mínimo 4h. Os blocos de agarose foram novamente transferidos para um novo tampão da enzima de restrição contendo 20U da enzima *SmaI* e incubados a 25°C, durante 18-24h. Os blocos de agarose já tratados com a enzima de restrição foram fundidos a 72°C e aplicados no gel de agarose (Sigma) a 1% em tampão TBE 0,5x. O gel foi processado através de eletroforese em campo pulsado (CHEF DR III, Bio-Rad), utilizando um tempo de pulso crescente de 1 a 35s, durante 23h a 6V/cm, a 13°C, com ângulo de 120°. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), por 30min, descorado por 1h com água destilada, observado sob luz ultravioleta e posteriormente fotografado.

4.0- Análise estatística

Foi realizada análise estatística para confirmação da significância dos principais fatores de risco para infecção, utilizando-se teste do χ^2 para comparação entre as variáveis qualitativas e o teste t de Student para analisar variáveis quantitativas. Estes dados foram analisados através do programa Epi Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta). Os fatores de risco que apresentaram significância ($P \leq 0,05$) na análise univariada foram reavaliados pelo modelo de regressão logística através do programa Bioestat versão 5.0 (Brasil).

6.0 - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o Registro N^o 196/96 (Anexo III).

7.0 – Resultados

Foram investigados 318 neonatos que tiveram pelo menos um CVC inserido por um período mínimo de 24 horas, totalizando 461 atos de cateterização, 4.845 cateter dia, 5.674 pacientes dia e uma média de 1,5 cateter/paciente. No total, constatou-se 84 pacientes com 106 episódios de infecção correspondendo a taxas de pacientes infectados e de infecção hospitalar, de 26,4% e 33,3%, respectivamente. A maioria das IHS (68,9%) foi sepse confirmada por critério microbiológico, seguido de conjuntivite (17,0%), infecção urinária e de ferida cirúrgica, ambas com 6,6% e meningite (0,9%). No grupo de neonatos com muito baixo peso ($\leq 1500\text{g}$) 29,1% apresentou infecção hospitalar e uma taxa de mortalidade de 16,1%.

A incidência de infecção de corrente sanguínea foi de 15,1/1000 cateter dia, sendo de 12,6/1000 cateter dia para os neonatos com peso $\leq 1500\text{g}$. As taxas de sepse associada e relacionada ao uso de CVC foram de 13,0 e 2,1/ 1000 cateter dia, respectivamente (Tabela 1). Naqueles pacientes de muito baixo peso a incidência de infecção de corrente sanguínea associada e relacionada ao uso de CVC foi de 10,7 e 1,1/1000 cateter dia, respectivamente. Aproximadamente 39% dos pacientes apresentaram sepse clínica, destas 59,3% confirmadas com o diagnóstico microbiológico, sendo 86,6% e 13,7% associadas e relacionadas ao uso de CVC, respectivamente.

A mortalidade total foi de 13,5% e de 16,1% naqueles neonatos com peso menor que 1500g e de 9,5% no grupo com sepse associada ao uso de CVC, com apenas um naqueles (10) com sepse relacionada ao CVC.

No tocante a estratificação segundo a critérios do NHSN, cerca da metade (51,0%) dos neonatos tinham muito baixo peso ($\leq 1500\text{g}$), seguido de 24,5% entre 1501 - 2500g e 24,8% acima de 2500g. A maior densidade de utilização de CVCs foi verificada na faixa de peso ao nascer entre 751 a 1000g, mas a maior taxa de sepse associada ao uso do cateter foi

constatada naqueles com peso entre 1501 e 2500g (Tabela 2). A média de peso ao nascer foi de 2449,6g.

O tempo médio total de hospitalização foi de 13,2 dias e 18,8 dias para aqueles pacientes de extremo baixo peso (≤ 1000 g).

Tabela 1- Taxas de infecção de corrente sanguínea associada/ relacionada a cateter vascular central, colonização de ponta de cateter e mortalidade, no período de Abril/2006 – Abril/2008

Taxas	N (%)
Colonização de ponta de CVC	18,2
Colonização de ponta de CVC/ 1000 cateter dia	17,3
Infecção de corrente sanguínea associada CVC	86,3
Infecção de corrente sanguínea associada CVC/ 1000 cateter dia	13,0
Infecção de corrente sanguínea relacionada CVC	13,7
Infecção de corrente sanguínea relacionada CVC/1000 cateter dia	2,1
Mortalidade total	13,5
Mortalidade nos neonatos com sepse associada ao CVC	9,5

Tabela 2- Taxas de incidência de sepse relacionada/associada a cateter vascular central por categorias de peso ao nascer segundo critérios do National Healthcare Safety Network

Peso (gramas)	Nº pacientes N(%)	Nº CVC N (%)	DU	Sepse associada / 1000 CVC dia	Sepse relacionada/ 1000 CVC dia
≤ 750	17 (5,4)	27 (5,9)	0,87	13,4	3,3
751 - 1000	34 (10,7)	57 (12,4)	0,96	9,4	0
1001 - 1500	110 (34,6)	190 (41,2)	0,94	13,0	2,6
1501 - 2500	78 (24,5)	104 (22,5)	0,76	15,8	2,5
≥ 2501	79 (24,8)	83 (18,0)	0,74	11,4	1,3
Total	318 (100,0)	461 (100,0)	0,85	13,0	2,1

* CVC: Cateter Vascular Central; ** DU: Densidade de utilização

*** DU = Densidade de Utilização = $\frac{\text{nº dias de utilização do CVC}}{\text{nº total dias de hospitalização}}$*

*** Sepse = $\frac{\text{nº de neonatos com sepse e com cateter} \times 1.000}{\text{nº de cateter-dia (todos neonatos)}}$*

O cateter umbilical foi o mais utilizado (40,6%), responsável por 50,0% e 15,5% das infecções relacionadas e associadas à CVC, respectivamente, enquanto o cateter central de inserção periférica (PICC) foi responsável por 50% das infecções associadas e 20,0% das relacionadas ao uso desse dispositivo. No total de 461 CVCs analisados, 84 (18,2%) apresentaram colonização da ponta, com maior frequência do umbilical (39,3%), seguido do PICC (23,8%), inserido por flebotomia (28,6%) e “Intracath” (8,3%). O tempo médio total de cateterização foi de 10,5 dias sendo 15,2 e 14,8 para os CVCs inseridos por flebotomia e “Intracath”, respectivamente (Tabela 3). O tempo médio de cateterização para o cateter umbilical foi de 5,3 dias.

A taxa de incidência de infecção relacionada ao uso de CVC foi de 2,1/1000 cateter dia sendo 1,0 para o CVC umbilical, 0,6 para o PICC e 0,4 para os inseridos por flebotomia; enquanto a de infecção associada/1000 CVC dia foi quase seis vezes maior (13,0). Uma alta

taxa de incidência de infecção associada ao cateter foi verificada no grupo em uso de PICC (6,0/1000 CVC dia) quando comparado aos demais.

Tabela 3- Tipos, colonização de ponta de cateter e sepse relacionada/ associada à CVC

Tipo CVC	Uso CVC N(%)	Colonização ponta CVC N (%)	Infecção relacionada/ 1000 CVC dia	Infecção associada/ 1000 CVC dia	Peso médio (g)	DU	Tempo médio uso CVC
Umbilical	187 (40,6)	33 (39,3)	1,0	1,7	1578,9	0,17	5,3
PICC	183 (39,6)	20 (23,8)	0,6	6,0	1419,3	0,44	13,6
Flebotomia	69(15,0)	24 (28,6)	0,4	3,5	2354,6	0,18	15,2
“Intracath”	22 (4,8)	7 (8,3)	0	1,9	2796,9	0,05	14,8
Total	461(100,0)	84 (100,0)	2,1	13,0	2449,6	0,85	10,5

* CVC: Cateter Vascular Central; ** DU: Densidade de utilização

A tabela 4 mostra a distribuição de infecção de corrente sanguínea associada e relacionada a diferentes tipos de CVC por categoria de peso ao nascer. A incidência de infecção associada ao uso de CVC foi maior nos neonatos com peso ≤ 750 g (10,0/1000 dias de PICC).

Tabela 4- Distribuição de infecção de corrente sanguínea associada/ relacionada a diferentes tipos de cateter vascular central, conforme peso do neonato ao nascer

Peso ao nascido (g)	Umbilical		PICC*		Flebotomia		“Intracath”		Total	
	A**	R***	A	R	A	R	A	R	A	R
≤ 750	3,3	3,3	10,0 [#]	0	0	0	0	0	13,4	3,3
751- 1000	0	0	7,8	0	1,6	0	0	0	9,4	0
1001- 1500	1,6	1,0	7,8	1,6	2,1	0	1,6	0	13,0	2,6
1501- 2500	1,7	0,8	4,2	0	6,7	1,7	3,3	0	15,8	2,5
≥ 2501	2,5	1,3	1,3	0	5,1	0	2,5	0	11,4	1,3
Total	1,7	1,0	6,0	0,6	3,5	0,4	1,9	0	13,0	2,1

Cateter Central de inserção periférica; ** Infecção corrente sanguínea associada à CVC; *** Infecção corrente sanguínea relacionada à CVC; [#] $P < 0.01$

Os fatores de risco associados ($P \leq 0,05$) com sepse associada ao uso de CVC, pela análise univariada, foram: tempo de hospitalização ≥ 7 dias, SNAP-II ≥ 20 , utilização de nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de “Intracath”, tempo de cateterização ≥ 16 dias, uso de antibióticos e de ≥ 3 antibióticos (Tabela 5). O uso de nutrição parenteral e a exposição à ≥ 3 antibióticos foram os fatores de risco independentes para o desenvolvimento dessa infecção (Tabela 6).

O principal agente etiológico de sepse foi *Staphylococcus* coagulase negativa (39,7%), seguido de *S. aureus* (24,6%), bacilos Gram-negativos (19,2%), *Enterococcus* spp (9,6%), *Candida albicans* (5,5%) e *Streptococcus* spp (1,4%) (Tabela 7). As colonizações de mucosa nasal, sítio de inserção, canhão e ponta de CVC foram de 22,3%, 14,5%, 12,3% e 18,2%, respectivamente. *Staphylococcus epidermidis* foi o patógeno mais isolado das amostras de pele (95,2%), sangue (89,7%), narina (76,6%), canhão (57,8%) e ponta do CVC (52,6%).

Das 183 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa recuperadas de narina, pele, canhão e ponta de CVC, 72,4% foram identificadas como *S. epidermidis*, 11% *S. haemolyticus*, 10% *S. lugdunensis* e 6,6% *S. saprophyticus* (Tabela 8). Todas as amostras isoladas dos pacientes com infecção relacionada à CVC eram de *Staphylococcus epidermidis*.

Tabela 5- Fatores de risco para sepse associada à CVC em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, no período de abril 2006 a abril 2008

Fatores de risco	Sepse associada à CVC		P*	OR ¹	IC ²
	Caso N= 63 (%)	Controle N= 91 (%)			
Peso (Gramas)					
≤ 1000	10 (15,8)	11 (12,0)	0,66	1,37	(0,50 - 3,78)
1001 – 1500	25 (39,7)	28 (30,8)	0,33	1,48	(0,72 - 3,07)
1501 – 2500	19 (30,2)	27 (29,7)	0,94	1,02	(0,48 - 2,19)
> 2500	9 (14,3)	25 (27,5)	0,08	0,44	(0,17 - 1,09)
Idade Gestacional (sem)					
≤ 26	0	1 (1,1)	1,00	0,00	(0,00 - 25,33)
27 – 31	21 (33,3)	27 (29,7)	0,09	1,19	(0,56 - 2,50)
32 – 36	31 (49,2)	43 (47,3)	0,94	1,08	(0,54 - 2,16)
≥ 37	11 (17,5)	20 (21,9)	0,62	0,75	(0,31 - 1,82)
Tempo de internação (dias)					
> 7	58 (92,1)	63 (69,2)	< 0,01*	5,16	(1,74 - 16,38)
SNAP – II ³					
0 – 9	12 (19,0)	29 (31,8)	0,11	0,50	(0,22 - 1,15)
10 – 19	11 (17,5)	27 (29,7)	0,12	0,50	(0,21 - 1,18)
≥ 20	40 (63,5)	35 (38,5)	< 0,01*	2,78	(1,36 - 5,72)
SNAPPE – II ⁴					
0 – 9	6 (9,5)	29 (31,9)	< 0,01	0,23	(0,08 - 0,62)
10 – 19	9 (14,3)	27 (29,6)			
≥ 20	48 (76,2)	35 (38,5)	0,04	0,40	(0,16 - 0,97)
NTP ⁵	55 (87,3)	61 (67,0)	< 0,01*	3,38	(1,34 - 8,79)
Entubado	49 (77,8)	56 (61,5)	< 0,01*	5,35	(2,44 - 11,86)
Uso de antibiótico					
≥ 3	55 (87,3)	41 (45,1)	< 0,01*	8,38	(3,37 - 21,55)
	44 (69,8)	15 (16,5)	< 0,01*	11,73	(5,09 - 27,55)
Tipo de CVC ⁶					
Flebotomia	17 (27,0)	14 (15,4)	0,11	2,03	(0,86 - 4,85)
“Intracath”	9 (14,3)	3 (3,3)	0,02*	4,89	(1,14 - 23,95)
PICC ⁷	29 (46,0)	48 (52,7)	0,51	0,76	(0,38 - 1,53)
Umbilical	8 (12,7)	26 (28,6)	0,03	0,36	(0,14 - 0,93)
Tempo de uso CVC (dias)					
1-5	5 (7,9)	33 (36,2)	< 0,01	0,15	(0,05 - 0,45)
6-10	15 (23,9)	29 (31,9)	0,36	0,67	(0,30 - 1,47)
11-15	7 (11,1)	16 (17,6)	0,39	0,59	(0,20 - 1,65)
≥ 16	36 (57,1)	13 (14,3)	< 0,01*	8,00	(3,48 - 18,70)

*P = ≤ 0,05; OR¹ = Odds Ratio; IC² = Intervalo de Confiança; SNAP-II³ = Score for Neonatal Acute Physiology II; SNAPPE-II⁴ = Score for neonatal acute Physiology Perinatal extension II; NTP⁵ = Nutrição Parenteral Total; CVC⁶ = Cateter Vascular Central; PICC⁷ = Cateter Central de Inserção Periférica

Tabela 6- Análise multivariada de fatores de risco para sepse associada ao uso de CVC em neonatos internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Fatores de risco	<i>P</i>	OR*	95% CI**
Nutrição parenteral	0,01	4,81	1,41 - 16,46
Uso de antibiótico	0,04	2,99	1,02 - 8,79
Uso ≥ 3 antibióticos	< 0, 0001	7,90	2,91 - 21,48

*Odds Ratio; ** Intervalo de Confiança

Tabela 7- Microrganismos isolados de ponta de CVC colonizada e sangue de neonatos com sepse associada e relacionada à cateter vascular central

Microrganismo	Sepse com diagnóstico microbiológico	Infecção associada	Infecção relacionada	Colonização ponta CVC
	N (%)	N (%)	N (%)	N(%)
<i>S. epidermidis</i>	29 (39,7)	27 (42,9)	6 (60,0)	58 (69,0)
<i>S. aureus</i>	18 (24,6)	15 (23,8)	3 (30,0)	22 (26,2)
Bacilos Gram-negativos	14 (19,2)	14 (22,2)	0	0
<i>Candida albicans</i>	4 (5,5)	3 (4,8)	0	3 (3,6)
<i>Streptococcus spp</i>	1 (1,4)	0	0	0
<i>Enterococcus spp</i>	7 (9,6)	4 (6,3)	1 (10,0)	1 (1,2)
Total	73 (100,0)	63 (100,0)	10 (100,0)	84 (100,0)

Tabela 8- Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central isolados de neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008

	Ponta	Canhão	Pele	Narina	Sangue	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>S. epidermidis</i>	30 (52,6)	15 (57,8)	39 (95,2)	23 (76,6)	27 (89,7)	133 (72,6)
<i>S. lugdunensis</i>	9 (15,8)	5 (19,2)	1 (2,4)	2 (6,7)	1 (3,4)	18 (9,8)
<i>S. saprophyticus</i>	6 (10,5)	3 (11,5)	0	3 (10,0)	0	12 (6,6)
<i>S. haemolyticus</i>	12 (21,1)	3 (11,5)	1 (2,4)	2 (6,7)	2 (6,9)	20 (11,0)
Total N (%)	57 (100,0)	26 (100,0)	41 (100,0)	30 (100,0)	29 (100,0)	183 (100,0)

Dentre os 63 casos de infecção de corrente sanguínea associada à CVC, apenas 10 (15,9%) foram relacionadas ao uso desse dispositivo, com o cateter umbilical associado à metade desses casos. *Staphylococcus epidermidis* foi o principal agente etiológico (60,0%) dessas infecções, seguido de *Staphylococcus aureus* (30,0%) e *Enterococcus faecalis* (10,0%) (Tabela 9).

Dos 10 casos de infecção relacionada ao uso de CVC, 7 foram detectados no ano de 2006, dois em 2007 e apenas um em 2008. Embora não houvesse relação temporal entre esses casos, constatou-se um mesmo clone de *S. epidermidis* no sangue dos pacientes 2 e 4; e, o mesmo clone detectado no sangue e ponta de CVC do paciente 1, também foi encontrado nas pontas de CVC dos pacientes 3 e 5 demonstrando disseminação na unidade.

Uma das amostras de *S. epidermidis* isolado de mucosa nasal de paciente com infecção relacionada ao uso de CVC foi perdida em decorrência de problema de descongelamento do freezer.

A análise das amostras de *S. epidermidis* através da fragmentação pela enzima Sma I e técnica de PFGE, foi prejudicada pela perda de duas amostras (ponta e canhão do cateter dos pacientes 4 e 6, respectivamente). Em quatro dos seis casos de infecção por *S. epidermidis*

relacionada à CVC foram discriminados clones diferentes no sangue e ponta do cateter; e, em apenas um (16,7%) desses pacientes houve concordância quanto aos clones isolados de sangue e ponta do CVC, sem definição de origem, se pele, mucosa nasal ou canhão do cateter, em decorrência de culturas negativas desses locais. No total, detectou-se a presença de 4 “clusters” de amostras com similaridade clonal com um deles englobando 4 amostras isoladas de ponta de CVC e uma de sangue (Figura 2).

Tabela 9- Patogênese das infecções relacionadas a cateter venoso central em 10 neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008

Paciente	Sítio			Sangue	Ponta CVC	Tipo de CVC	Tempo de cateterização (dias)
	Narina	Pele	Canhão				
1	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	PICC	10
2	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Umbilical	8
3	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Flebotomia	11
4	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Flebotomia	7
5	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Flebotomia	6
6	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	PICC	23
7	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Umbilical	5
8	-	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Umbilical	9
9	-	-	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Umbilical	6
10	-	-	-	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Umbilical	5

PICC: Cateter central de inserção periférica; CVC: Cateter Vascular Central

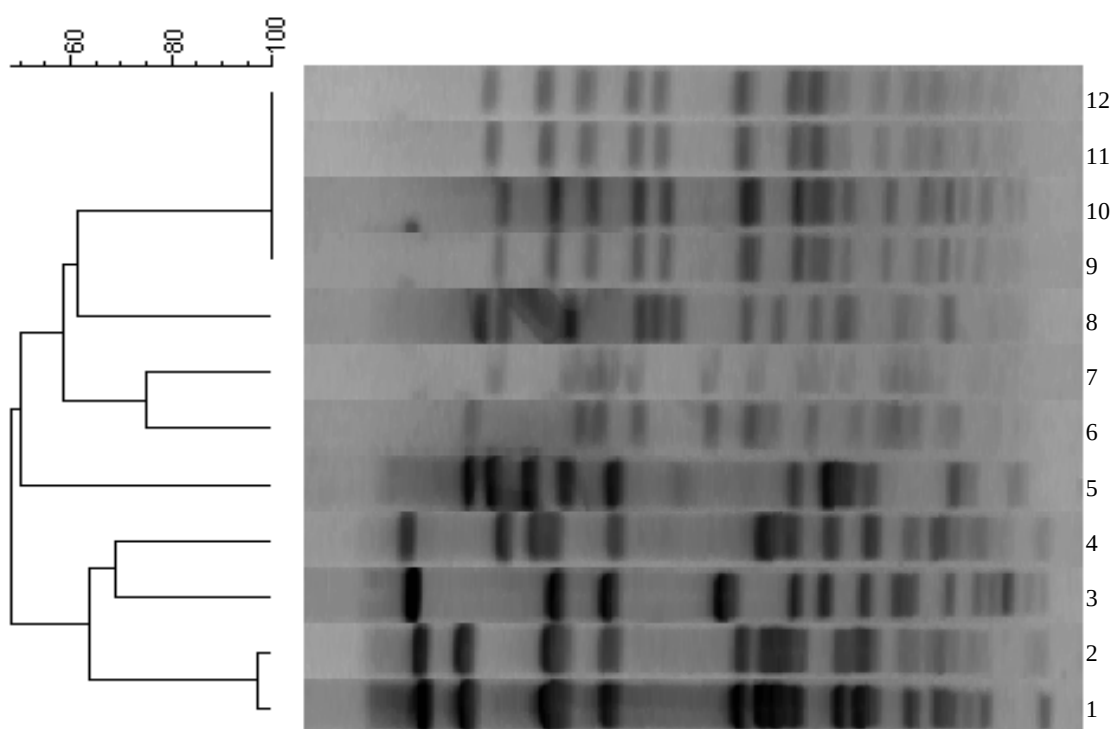


Figura 1- Dendrograma dos perfis genotípicos de amostras de *Staphylococcus epidermidis* após fragmentação pela enzima de restrição SmaI e análise por PFGE através da análise computadorizada

Colunas 11 e 12: amostras de sangue e ponta, respectivamente do paciente 1; Colunas 2 e 7: amostras de sangue e ponta, respectivamente do paciente 2; Colunas 4 e 9: amostras de sangue e ponta, respectivamente do paciente 3; Coluna 1: amostra de sangue do paciente 4; Colunas 3, 6 e 10: amostras de sangue, mucosa nasal e ponta, respectivamente do paciente 5; Colunas 8 e 5: amostra de sangue e ponta, respectivamente do paciente 6.

No total, foram detectadas frequências altas de resistência à oxacilina nas amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue (79,3%), ponta de CVC (76,2%), canhão (87,5%), pele (87,5%) e narina (88,5%) (Tabela 10). Multiresistência aos antibióticos foi observada em 45,7% e 21,4% das amostras de *S. epidermidis* isoladas de ponta de CVC e sangue dos neonatos, respectivamente. No tocante as amostras de *S. epidermidis* recuperadas dos casos de infecção relacionada à CVC, 66,7% das amostras de sangue e ponta de CVC apresentaram resistência à oxacilina; e, 66,7% e 50,0% dessas amostras de sangue e ponta de CVC, respectivamente, foram resistentes à cefoxitina. A amostra de *S. epidermidis* isolada de mucosa nasal apresentou resistência à oxacilina e cefoxitina e, a única recuperada do canhão do CVC, foi resistente apenas à oxacilina.

Aproximadamente 47,5% das amostras de SCoN foram produtoras de biofilme, das quais apenas duas, uma isolada do canhão e outra da ponta de CVC, eram produtoras intensas (Tabela 11). No total, 50,9% e 31,0% das amostras de ponta de CVC e sangue, respectivamente, formaram biofilme. No tocante aos casos de infecção sangüínea relacionada à CVC, 66,7% e 50,0% das amostras de sangue e ponta, respectivamente, foram produtoras de biofilme e, o gene *icaAD* foi detectado em 33,3% e 50,0% das amostras de *S. epidermidis*, isoladas de sangue e ponta de CVC, respectivamente, desses pacientes (Figura 2).

Tabela 10- Resistência de amostras *Staphylococcus coagulase negativa* em 183 amostras isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central, isolados de neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008

ATM	Sítios				
	Canhão N (%)	Pele N (%)	Narina N (%)	Sangue N (%)	Ponta N (%)
Sulfazotrim	5 (15,6)	9 (23,1)	15 (28,3)	12 (41,4)	22 (34,9)
Teicoplanina	4 (12,5)	4 (10,2)	5 (9,4)	1 (3,4)	12 (19,0)
Clindamicina	12 (35,3)	11 (34,3)	20 (37,7)	9 (31,0)	28 (44,4)
Gentamicina	8 (25,0)	7 (21,8)	21 (39,6)	14 (48,3)	18 (28,6)
Ciprofloxacina	13 (40,6)	8 (25,0)	18 (33,9)	10 (34,5)	15 (23,8)
Cloranfenicol	10 (31,3)	7 (21,8)	13 (24,5)	7 (24,1)	12 (19,0)
Eritromicina	19 (59,4)	25 (78,1)	19 (35,8)	11 (37,9)	23 (36,5)
Rifampicina	12 (35,3)	5 (15,6)	18 (33,9)	10 (34,5)	24 (38,1)
Tetraciclina	11 (34,3)	14 (43,8)	7 (13,2)	5 (17,2)	14 (22,2)
Oxacilina	28 (87,5)	28 (87,5)	46 (88,5)	23 (79,3)	48 (76,2)
Cefoxitina	18 (56,3)	15 (46,9)	27 (50,9)	19 (65,5)	27 (42,9)
Total	32 (100,0)	39 (100,0)	53 (100,0)	29 (100,0)	63 (100,0)

* ATM: Antimicrobiano

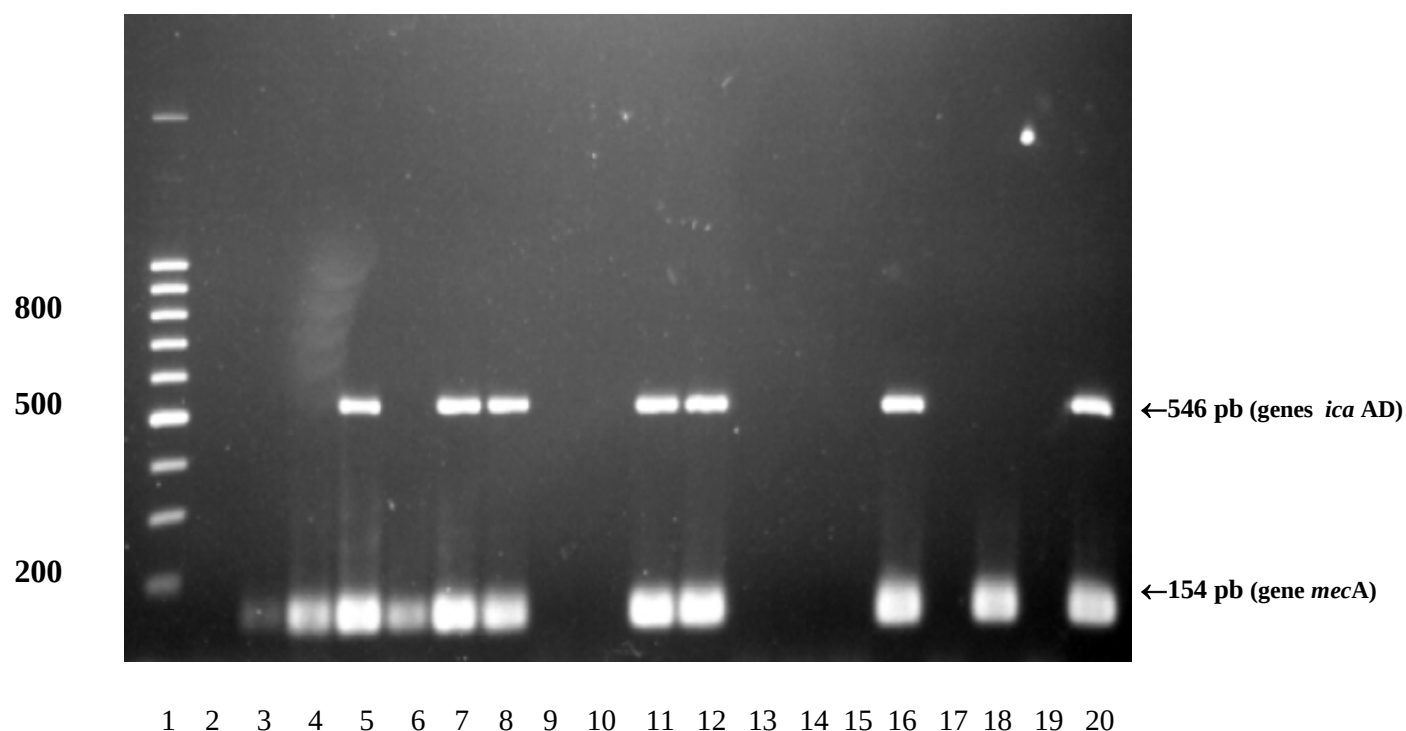


Figura 2- Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos de 154 pb e 546 pb dos genes *mecA* e *icaAD*, respectivamente, de amostras de *S. epidermidis* isoladas de neonatos.

Coluna 1: Padrão de peso molecular (100pb ladder); coluna 2: branco; colunas 3 e 4: amostras clínica 1115 e ATCC33591 de *S. aureus*, controles positivos para o gene *mecA*; coluna 5: amostra ATCC35984 de *S. epidermidis*, controle positivo para os genes *mecA* e *ica AD*; coluna 6: amostra ATCC12228 de *S. epidermidis*, controle negativo para o gene *icaAD*; colunas 7 e 8: amostras de sangue e ponta de CVC, respectivamente, do paciente 1 (*mecA* e *icaAD* positivas); colunas 9 e 10: amostras de sangue e ponta de CVC, respectivamente, do paciente 2 (*mecA* e *icaAD* negativas); colunas 11 e 12: amostras de sangue e ponta de CVC, respectivamente, do paciente 3 (*mecA* e *icaAD* positivas); colunas 13 e 14: amostras de sangue e ponta de CVC, respectivamente, do paciente 4 (*mecA* e *icaAD* negativas); colunas 15, 16 e 17: amostras de sangue (*mecA* e *icaAD* negativa), ponta de CVC (*mecA* e *icaAD* positiva) e narina (*mecA* e *icaAD* negativa), respectivamente, do paciente 5; colunas 18, 19 e 20: amostras de sangue (*mecA* positiva e *icaAD* negativa), ponta de CVC (*mecA* e *icaAD* negativa) e “hub” do CVC (*mecA* e *icaAD* positiva), respectivamente, do paciente 6.

Tabela 11- Produção de biofilme e susceptibilidade de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de sangue, pele, narina, canhão e ponta de cateter vascular central em neonatos críticos, no período de Abril/2006 – Abril/2008

Sítio	Intensa		Frac		Não produz	
	R*	S**	R	S	R	S
Narina	0	0	13 (19,1)	1 (5,9)	7 (17,1)	9 (16,4)
Pele	0	0	18 (26,5)	5 (29,4)	6 (14,6)	12 (21,8)
Canhão CVC	1 (50,0)	0	9 (13,2)	2 (11,8)	8 (19,5)	6 (10,9)
Ponta CVC	1 (50,0)	0	22 (32,4)	6 (35,3)	13 (31,7)	15 (27,3)
Sangue	0	0	6 (8,8)	3 (17,6)	7 (17,1)	13 (23,6)
TOTAL	2 (100,0)	0	68 (100,0)	17 (100,0)	41 (100,0)	55 (100,0)

* Resistente à oxacilina; ** Sensível à oxacilina

Dentre as 84 pontas de CVC colonizadas 39 (46,4%) foram de CVC de curta duração (<8 dias), com tempo médio de uso de 5,1 dias. Neste grupo, o CVC mais utilizado foi o umbilical (59,0%), seguido daquele inserido por flebotomia (20,5%), PICC (12,8%) e *Intracath* (7,7%). O *Staphylococcus epidermidis* foi responsável pela metade (48,7%) das amostras isoladas de ponta de CVC, seguido de *S. aureus* (33,3%) (Tabela 14). A maioria (54%) dos CVCs colonizados era de longa duração (> 8 dias) com tempo médio de uso de 21,9 dias, sendo os mais utilizados os inseridos por flebotomia e *Intracath*, ambos com 40,0%. *Staphylococcus epidermidis* (48,9%) e *S. aureus* (31,1%) foram os patógenos mais isolados (Tabela 15).

Tabela 12- Patogênese de colonização de ponta de cateter vascular central de curta duração inseridos em neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008

Ponta	Sangue	Canhão	Pele	Narina	Tipo CVC	Técnica cultivo CVC	Tempo uso CVC
* <i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	Flebotomia	SQ	6
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	6
* <i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	Flebotomia	SQ	7
* <i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	Umbilical	SQ	8
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ	4
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. agalactiae</i>	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	4
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Flebotomia	QT	3
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. bovis</i>	-	<i>S. lugdunensis</i>	-	Umbilical	SQ	8
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	3
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Flebotomia	SQ	4
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ	2
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. epidermidis</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	PICC	SQ/QT	5
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	PICC	SQ/QT	6
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> / <i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	Umbilical	SQ	6
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	6
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	7
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. lugdunensis</i>	-	<i>S. lugdunensis</i>	-	<i>S. lugdunensis</i>	Umbilical	QT	5
* <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Umbilical	SQ/QT	5
* <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	6
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	PICC	QT	5
<i>S. aureus</i>	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. aureus</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	5
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	4
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	3
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	6
<i>S. aureus</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>	-	Intracath	SQ/QT	5
<i>S. aureus</i>	-	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	Umbilical	SQ/QT	6
<i>S. aureus</i> / <i>S. epidermidis</i>	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>	Intracath	SQ/QT	4
* <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	Umbilical	QT	5
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	-	-	Intracath	SQ	3
<i>Micrococcus</i> sp	-	-	-	-	PICC	QT	6
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	PICC	SQ/QT	7
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	Flebotomia	SQ	7
Total: 39	13	3	8	8	-	-	-

* Infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de CVC; SQ: Técnica semi-quantitativa; QT: Técnica quantitativa

Tabela 13- Patogênese de colonização de ponta de cateter vascular central de longa duração inseridos em neonatos críticos internados na UTIN do HC-UFU, no período de Abril/2006 a Abril/2008

Ponta	Sangue	Canhão	Pele	Narina	Tipo CVC	Técnica cultivo CVC	Tempo uso CVC
*S. epidermidis	S. epidermidis	S. epidermidis	-	S. epidermidis	PICC	SQ	23
*S. epidermidis	S. epidermidis	-	-	-	PICC	SQ	10
*S. epidermidis	S. epidermidis	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	11
S. epidermidis	-	S. aureus	-	S. aureus	PICC	SQ	10
S. epidermidis	-	S. aureus	S. epidermidis	S. epidermidis	Flebotomia	SQ/QT	19
S. epidermidis	-	-	S. epidermidis	-	Flebotomia	SQ	20
S. epidermidis	-	-	-	-	Umbilical	SQ	12
S. epidermidis	-	-	-	S. aureus	Flebotomia	SQ/QT	15
S. epidermidis	A. baumannii/ E. coli	-	-	-	PICC	SQ/QT	24
S. epidermidis	-	-	-	-	PICC	SQ	16
S. epidermidis	S. liquefaciens/ E. agglomerans	-	S. epidermidis	-	Flebotomia	SQ/QT	17
S. epidermidis	-	-	-	-	PICC	QT	25
S. epidermidis	-	-	-	S. aureus	Flebotomia	SQ	28
S. epidermidis	-	-	-	-	Flebotomia	SQ	32
S. epidermidis	-	-	S. epidermidis	-	Flebotomia	SQ	33
S. epidermidis	-	-	-	-	Flebotomia	SQ	32
S. epidermidis	-	-	S. epidermidis	-	PICC	SQ/QT	19
S. epidermidis	-	-	-	-	PICC	SQ	39
S. epidermidis	-	-	-	S. epidermidis	PICC	SQ	9
S. epidermidis	C. albicans	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	9
S. lugdunensis	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	48
S. lugdunensis	S. aureus /E.faecalis	-	S. lugdunensis	-	Intracath	SQ/QT	49
S. lugdunensis	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	10
S. lugdunensis	S. aureus	S. lugdunensis	-	S. epidermidis	PICC	SQ	42
S. lugdunensis	-	-	-	S. aureus	PICC	SQ	29
S. haemolyticus	-	-	-	-	PICC	SQ	12
S. haemolyticus	-	-	S. haemolyticus	S. aureus	Flebotomia	QT	50
S. haemolyticus	S. aureus	-	-	-	PICC	SQ	22
*S. aureus	S. aureus	-	S. aureus	-	Umbilical	SQ/QT	9
S. aureus /	-	-	S. aureus	-	PICC	SQ	12
S. epidermidis	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	9
S. aureus	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	12
S. aureus	-	-	-	-	Flebotomia	SQ	25
S. aureus	E. aerogenes	-	-	-	PICC	SQ/QT	20
S. aureus	-	-	-	S. aureus	Umbilical	SQ	12
S. aureus /	-	-	-	S. epidermidis	Intracath	SQ/QT	34
S. epidermidis	-	S. epidermidis	-	-	PICC	SQ	35
S. aureus	S. epidermidis	-	-	-	PICC	SQ/QT	36
S. aureus	-	-	-	-	Umbilical	SQ/QT	9
S. aureus	-	-	-	S. aureus	PICC	SQ	19
S. aureus	-	S. aureus	S. aureus	S. aureus	Intracath	SQ/QT	42
S. aureus	-	-	-	-	Flebotomia	SQ/QT	9
Micrococcus sp	-	-	-	S. lugdunensis	PICC	SQ	10
Micrococcus sp	-	-	-	-	Flebotomia	QT	15
C. albicans	-	-	-	S. aureus	Umbilical	SQ	11
Total: 45	12	5	10	14	-	-	-

* Infecção de corrente sanguínea relacionada ao uso de CVC; SQ: Técnica semi-quantitativa; QT: Técnica quantitativa

8.0 – Discussão

O desenvolvimento tecnológico permitiu maior sobrevida de neonatos prematuros e de baixo peso submetidos a internações prolongadas e procedimentos invasivos indispensáveis a seus cuidados (LOPES, 2008), mas por outro lado, em função de maior susceptibilidade desses pacientes às infecções e de barreiras de defesa não completamente desenvolvidas, sobretudo a pele, apresentam usualmente taxas elevadas de IHS (COOLEY, GRADY, 2010). A maior suscetibilidade às infecções somada ao uso de procedimentos invasivos resulta em incidência de IH superiores as de outras populações (ÁRNASON et al., 2010) e apresentam taxas significativas de morbidade, mortalidade e custos hospitalares elevados (DOGRU et al., 2010).

A incidência de IHS em neonatos varia entre 7 e 24% em pacientes admitidos em UTINs de países desenvolvidos (GARLAND, UHINGS, 2009) e cerca de 30% em unidades de países em desenvolvimento, com uma mortalidade atribuída de 40% (TÁVORA et al., 2008). Infecção de corrente sanguínea é a principal infecção neonatal em UTINs (45 a 55%), seguido daquelas nos tratos respiratório (16 a 30%) e urinário (8 a 18%) (BORGHESI, STRONATI, 2008). Nesse estudo, detectou-se 84 pacientes com 106 episódios de infecção correspondendo a taxas de pacientes infectados e de infecção hospitalar, de 26,4% e 33,3%, respectivamente. Aproximadamente 69% das IHS foram sepse confirmada por critério microbiológico.

A maioria dessas infecções é associada ao uso de CVC, pois neonatos críticos requerem administração de nutrição parenteral e medicamentos por longo período (POSFAY-BARBE et al., 2008), com taxas variando entre 0 a 29% e de 2 a 49/1000 cateter dia, especialmente quando do uso de PICC e/ou cateter umbilical que são muito utilizados em neonatos, principalmente prematuros (RAMASETHU, 2008). A incidência de infecção relacionada ao uso do PICC varia de 0,3 a 16,7/1000 cateter dia (BOORGHESI, STRONATI,

2008). Nesse estudo, as taxas de infecção relacionada/ associada ao PICC foram de 0,6 e 6,0/1000 cateter dia, respectivamente. A inserção por flebotomia também está associada com alto risco de infecção, e 69 (15%) da nossa série utilizou esse tipo de CVC apresentando uma taxa de 3,5/1000 cateter.

Desde a introdução de CVCs inseridos percutaneamente, o uso de cateter inserido cirurgicamente diminuiu na maioria das UTINs (COOLEY, GRADY, 2009). Essa pesquisa constatou um predomínio no uso de cateter umbilical (40,6%) e PICC (39,6%) quando comparado a flebotomia (15,0%) e “*Intracath*” (4,8%).

Dados recentes do sistema de vigilância NHSN, mostraram uma incidência média de infecção de corrente sanguínea associada ao uso de CVC de 4,4 e de 6,4/1000 cateter dia naqueles neonatos de peso inferior à 1000g (EDWARDS et al., 2007). Nessa pesquisa, as taxas de sepse associada e relacionada ao uso de CVC foram de 13,0 e 2,1/ 1000 cateter dia, respectivamente. A mortalidade atribuída a essas infecções tem sido estimada entre 1 a 25% (COLOMER et al., 2000). Nesse estudo a mortalidade total foi de 13,5% e de 16,1% naqueles neonatos com peso ≤ 1500 g e 9,5% no grupo com sepse associada ao uso de CVC.

Os fatores de risco envolvidos na aquisição de sepse neonatal incluem: prematuridade, fragilidade da pele, uso de CVC, prótese ventilatória, procedimento cirúrgico, baixa idade gestacional, peso inferior a 1000g, hemodiálise, trombose relacionada ao cateter, dificuldade na inserção do CVC, tempo de permanência no hospital antes da inserção do cateter, colonização do canhão e do sítio de inserção do CVC e emulsão lipídica na nutrição parenteral (SCHWAB, 2007; COUTO, 2007, CICALINI, PALMIERI, PETROSILLO, 2003). Neonatos que necessitam de nutrição parenteral têm risco maior de ocorrência de sepse, com taxas variando entre 1,9% e 45% (DONNELL et al., 2002). Neste estudo, os fatores de risco para sepse associada à CVC que apresentaram significância estatística pela análise univariada, foram: tempo de hospitalização >7 dias, SNAP-II ≥ 20 , utilização de nutrição parenteral, ventilação mecânica, tempo de cateterização ≥ 16 dias, uso de antibióticos e de ≥ 3

antibióticos; e, pela análise por regressão logística múltipla, o uso de nutrição parenteral e a exposição à ≥ 3 antibióticos.

Outro fator de risco relevante para o desenvolvimento de infecções de corrente sanguínea relacionada/associada ao uso de CVCs é o tempo de utilização desse dispositivo invasivo; CVCs inseridos por um período maior que 21 dias aumentam dramaticamente o risco de sepse (BORGHESI, STRONATI, 2008). Stoll e colaboradores (2002) evidenciaram que PICCs mantidos por mais de 16,4 dias e cateter umbilical por mais de 4 dias, aumentaram o risco de sepse em pacientes em uso de nutrição parenteral. Nessa pesquisa a média de duração do PICC foi de 13,6 dias e de 5,3 dias para o umbilical. O uso do “Intracath” foi fator de risco com significância estatística na análise univariada enquanto a inserção por flebotomia foi significativa naqueles neonatos com peso ≤ 1500 g, com permanência por 14,8 e 15,2 dias, respectivamente.

O baixo peso e, sobretudo o muito baixo peso (≤ 1500 g), são fatores de risco de grande importância para ocorrência de infecção associada/relacionada ao uso de CVC (KREDIET, 2004; STOLL, 2002). Os nossos resultados mostraram que a população com peso ≤ 750 g representou apenas 5,4% dos neonatos incluídos na investigação, e tiveram uma taxa de incidência de infecção de corrente sanguínea associada ao uso de CVC de 3,3/1000 cateter dia, enquanto este indicador epidemiológico foi de 12,6 no grupo com peso ≤ 1500 g.

Em unidades terciárias nível III, o SCoN é o principal agente isolado das infecções, com *S. epidermidis* o mais freqüente, representando cerca de 70% das infecções por estafilococos (CHEUNG, OTTO, 2010). Embora a infecção por SCoN seja menos grave causa significativa morbidade, especialmente naqueles de muito baixo peso (VENKATESH, PLACENCIA, WEISMAN, 2006). Nesse estudo este microrganismo foi o patógeno mais isolado das infecções de corrente sanguínea (39,7%), seguido de *S. aureus* (24,6%) e bacilos Gram- negativos (19,2%). Dentre as amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas

do sangue, aproximadamente 90% era *Staphylococcus epidermidis*. Couto e colaboradores (2007), em estudo multicêntrico, constataram que em apenas 20,8% dos episódios de infecção de corrente sanguínea era por *S. epidermidis*, sendo a maioria (51,6%) por bacilos Gram-negativos, com *Klebsiella* sp mais freqüente (26,6%), o que condiz com a realidade da maioria das UTINS de países em desenvolvimento.

Embora a avaliação das amostras por técnicas moleculares seja imprescindível, em função de seu poder discriminatório, a sua utilização na investigação da patogenia de infecção de corrente sanguínea associada/ relacionada à CVC é rara; além de haver poucos estudos sobre a patogênese de infecção sanguínea relacionada ao uso de CVC em neonatos críticos. Garland e colaboradores (2008) relataram que 67% dos neonatos com PICC tiveram a via intralúmen, 20% a via extralúmen e 13% indeterminada, como via de disseminação do microrganismo, a exemplo do observado em adultos, quando do uso de CVC de longa duração. Nessa investigação detectou 63 neonatos com infecção de corrente sanguínea associada à CVC, das quais apenas 10 neonatos (15,9%) eram relacionados ao uso deste dispositivo.

Verificamos que em apenas um paciente com infecção por *S. epidermidis* relacionada à CVC houve concordância quanto aos clones isolados de sangue e ponta do CVC, sem definição de origem, impossibilitando uma definição da via de disseminação, independente do tempo de permanência do cateter. Não foi possível estabelecer uma relação temporal em nenhum desses casos de infecção, afastando a possibilidade de uma transmissão horizontal. Por outro lado, as mãos dos profissionais de saúde representam a principal via de transmissão de infecções no ambiente hospitalar, particularmente patógenos resistentes aos antimicrobianos (PITETT et al., 2006). A higiene das mãos é considerada a medida mais importante e menos dispendiosa para prevenir infecções associadas ao cuidado com a saúde e reduzir o risco de transmissão de microrganismos de um paciente a outro (LARSON, 2001).

A tipagem por técnica molecular é uma ferramenta poderosa para análise de isolados e orientação quanto à prática de controle e prevenção de infecções. O método de escolha ideal deve ser fácil, rápido, seguro, reprodutível e com poder discriminatório (FOKA et al., 2006). Nessa investigação, a análise através de gel de eletroferese em campo pulsátil mostrou a natureza policlonal das amostras de *S. epidermidis* na unidade, com a presença de quatro “clusters”. O primeiro, compreendendo 4 amostras com 100% de similaridade genética e, também, com concordância genotípica em relação à presença dos genes *mecA* e *icaAD*. O segundo “cluster”, com duas amostras de sangue, também apresentou 100% de similaridade entre as amostras. Os clones pertencentes aos terceiro e quarto “cluster” apresentaram 75,0 e 65,0% de similaridade genética, respectivamente; resultado semelhante ao encontrado por Krediet e colaboradores (2004) que detectaram 10 “clusters” principais com mais de 80% de homogenia entre as amostras de sangue de neonatos críticos.

Estudos de epidemiologia molecular demonstram que “clusters” de clones de infecções por SCoN podem estar distribuídos entre neonatos e a equipe de profissionais de saúde, mas os isolados associados com sepse são mais homogêneos (FOKA, 2006). Os tipos moleculares predominantes podem persistir nas UTINs por períodos prolongados (KREDIET et al., 2004), conforme observamos em nosso estudo, em que no “cluster” predominante o mesmo clone foi detectado em pontas de CVC distintas em mais de 12 meses depois da primeira.

Staphylococcus epidermidis foi o principal agente etiológico (60%) de sepse. Esse microrganismo coloniza mucosa incluindo de intestino, narinas e orofaringe de onde podem migrar para a corrente sanguínea. Esses dados são evidenciados por estudos epidemiológicos, experimentais, clínicos e moleculares. Donnell e colaboradores (2002) relataram que a translocação microbiana, a partir do lúmen intestinal, foi responsável por 84% dos episódios de sepse em 76% dos neonatos cirúrgicos e que os patógenos mais isolados foram SCoN (86%).

Björkqvist e colaboradores (2010), em estudo realizado na Suécia, relataram que a colonização de mucosa nasal ocorre antes da mucosa perianal e do coto umbilical e, em 80% dos pacientes com infecção de corrente sanguínea por *Staphylococcus epidermidis* foi detectado o mesmo clone colonizando a mucosa nasal dos pacientes investigados. Nesse estudo, apenas 30% e 40% dos pacientes com infecção relacionada e associada ao uso de CVC, respectivamente, apresentaram colonização prévia de mucosa nasal.

O principal fator de patogenicidade do *S. epidermidis* é a sua habilidade em formar biofilme mediado pela adesina polissacarídica intercelular (PIA), codificada pelo operon *ica*, compreendido pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* e, e *icaR* (regulatório) (EFTEKHAR, SPEERT, 2009). Esta bactéria adere-se à superfície de dispositivos invasivos, como os CVCs, formando biofilme que responde por maior resistência aos antibióticos, particularmente à metilicina, aumentando o tempo de hospitalização e custos hospitalares estes da ordem de 2 bilhões de dólares, só nos Estados Unidos (CHEUNG, OTTO, 2010). As bactérias que formam biofilmes são difíceis de serem erradicadas e estima-se que este mecanismo esteja associado a 65,0% das infecções hospitalares (UCKAY, 2009).

Klingenberg e colaboradores (2007) relataram que a maioria (61,0%) das amostras de *S. epidermidis* isoladas de infecção de corrente sanguínea em neonatos foram produtoras de biofilme. Este achado foi corroborado por Brito e colaboradores (2007), em estudo na UTIN do HC-UFU, que verificaram que 80,7% das amostras de *S. epidermidis* isoladas de infecção de corrente sanguínea associada à CVC apresentaram produção intensa de biofilme e 83,6% foram resistentes à oxacilina. Nessa pesquisa, aproximadamente 45,7% das amostras de *Staphylococcus coagulase negativa* tinham capacidade de produzir biofilme. No tocante aos casos de infecção sanguínea relacionada à CVC, 83,3% e 66,7% das amostras de sangue e ponta, respectivamente, foram, simultaneamente, produtoras de biofilme e resistentes à oxacilina.

Oliveira (2009) analisou 130 amostras de SCoN isoladas de neonatos, das quais 40% apresentaram os genes *icaA* e *icaD* concomitantemente e 42% os genes *icaACD*, resultado semelhante ao encontrado por Cafiso e colaboradores (2004) em que 35% das amostras isoladas foram positivas para os genes *icaA* e *icaD* concomitantemente. Nesse estudo, o gene *icaAD* foi detectado em 33,3% e 50,0% das amostras de *S. epidermidis*, isoladas de sangue e ponta de CVC, respectivamente, nos pacientes com infecção relacionada à CVC.

Atualmente, a emergência e disseminação hospitalar de cepas resistentes à meticilina tornou-se um grave problema terapêutico, principalmente, para o tratamento das estafilococcias, por *S. aureus* e *S. epidermidis*, adquiridas em ambiente hospitalar (IBRAHEM et al., 2008), refletindo a adaptação de clones nosocomiais em virtude da pressão seletiva conseqüente do uso indiscriminado de antibióticos (MACHADO, 2007). O mecanismo de resistência a essa penicilina é mediado pelo gene *mecA*, localizado no SCCmec, conferindo resistência aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, e associa da à presença de plasmídeo e transposon que codificam resistência a outros antibióticos, ou seja, as amostras são multiresistentes. O gene *mecA* é detectado em mais de 90,0% das amostras de *S. epidermidis* resistentes à meticilina isoladas de infecção hospitalar (CHEUNG, OTTO, 2010).

O programa SENTRY relatou uma proporção de resistência à meticilina em torno de 34,0% para *Staphylococcus aureus* e 80,0% para SCoN, em hospitais brasileiros no período de 1997 a 1999 (SADER et al., 2001), a exemplo do verificado em outros inquéritos, incluindo os dados do NNIS. Couto e colaboradores (2007), detectaram que 70,0% das amostras de SCoN isoladas de sangue de neonatos foram resistentes à meticilina e, Souza Junior e colaboradores (2009), em estudo realizado em pacientes hospitalizados na maternidade da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, verificaram uma prevalência de amostras de SCoN resistentes á meticilina de 71,1% e de 18,1% para *Staphylococcus aureus*.

Nessa investigação, verificou-se uma frequência alta de resistência à oxacilina nas amostras de *Staphylococcus coagulase negativa* isoladas de sangue (79,3%), ponta (76,2%), canhão (87,5%), pele (87,5%) e narina (88,5%). Considerando apenas os neonatos com infecção sangüínea relacionada à CVC, 83,0% e 67,0% das amostras de sangue e ponta, respectivamente, foram resistentes à oxacilina e produtoras de biofilme.

A detecção do gene *mecA* por PCR é considerada o padrão ouro, porém poucos laboratórios utilizam técnicas genotípicas devido ao custo alto, sendo o teste de gel-difusão a partir de disco e o de triagem os métodos mais utilizados (BROWN, 2001). O CLSI propôs o uso de disco de cefoxitina (30µg) como método de *screening* para predizer a resistência mediada pelo gene *mecA* para amostras de SCoN visando a otimização do uso das metodologias fenotípicas. A precisão e a rapidez na detecção da resistência à meticilina em estafilococos são importantes para o controle hospitalar de infecções por MRSA e MR-SCoN (MACHADO, 2007).

Hira e colaboradores (2007) detectaram a presença do gene *mecA* em 87,0% de amostras de SCoN resistentes à meticilina isoladas de sangue de neonatos, resultado semelhante ao encontrado por Krediet (2004) e colaboradores (70 - 92%) entre 1991 e 2001. Nesse estudo, a detecção do gene *mecA* ocorreu em 50,0% das amostras de *S. epidermidis* isoladas, simultaneamente, de sangue e ponta de CVC dos pacientes com infecção relacionada à CVC, ratificando o resultado do teste fenotípico.

Conclusões

- As taxas de incidência de infecção associada e relacionada à CVC foram de 13,0 e 2,1/1000 cateter dia, respectivamente, com o *S. epidermidis* responsável por 42,9 e 60,0% dessas infecções, respectivamente;

- Os fatores de risco para infecção de corrente sanguínea associada ao uso de CVC, pela análise univariada, foram: tempo de hospitalização ≥ 7 dias, SNAP-II ≥ 20 , utilização de nutrição parenteral, ventilação mecânica, uso de “Intracath”, tempo de cateterização ≥ 16 dias, uso de antibióticos e de ≥ 3 antibióticos, e; o uso de nutrição parenteral e exposição à ≥ 3 antibióticos foram os fatores de risco independentes para o desenvolvimento dessa infecção;
- Não houve relação entre os clones isolados de mucosa nasal, sangue, ponta e canhão do CVC nos pacientes com infecção relacionada à CVC por *S. epidermidis*;
- O cateter umbilical foi o mais utilizado (40,6%) associado com 60 e 15,5% das infecções relacionadas e associadas ao uso de CVC, respectivamente, enquanto o PICC foi responsável por 50,0% das associadas e 20,0% das relacionadas;
- A maioria (66,7%) das amostras de *S. epidermidis* recuperadas isoladas de sangue e ponta de cateter dos pacientes com infecção relacionada à CVC apresentou resistência à oxacilina, com a detecção do gene *mecA* em 50,0% das amostras;
- A maioria das amostras recuperadas de sangue (66,7%) e a metade daquelas da ponta de CVC em neonatos com infecção relacionada à CVC, formaram biofilme; e, o gene *icaAD* foi detectado em duas e três das seis amostras cultivadas de sangue e ponta de cateter, respectivamente;
- Há evidências de que a patogenia de infecção de corrente sanguínea relacionada à CVC em neonatos difere daquela relatada em adultos e, o seu melhor conhecimento certamente permitirá a adoção de práticas de prevenção e controle dessas infecções.

9.0- Referências bibliográficas

ARAÚJO, G. L.; COELHO, L. R.; CARVALHO, C. B.; MACIEL, R. M.; CORONADO, A. Z.; ROZENBAUM, R.; CARVALHO, B. T. F.; FIGUEIREDO, A. M. S.; TEIXEIRA, L. A. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 855-864, 2006.

ARCHER, G. L.; CLIMO, M. W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.38, p. 2231-2237, 1994.

ÁRNASON, S.; THORS, V. S.; GUÖNASON, T.; KRISTINSSON, K. G.; HARALDSSON, A. Bacteraemia in children in Iceland 1994 – 2005. **Acta Paediatrica**. v. 94, p. 1 – 5, 2010.

BANG, A.T.; BANG, R. A.; STOLL, B. J.; BAITULE, S. B.; REDDY, H. M.; DESHMUKH, M. D. Is home-based diagnosis and treatment of neonatal sepsis feasible and effective? Seven years of intervention in the Gadchiroli field trial (1996 to 2003). **Journal of Perinatology**. v. 25, p. S62-S71, 2005.

BARSUK, J. H.; COHEN, E. R.; FEINGLASS, J.; McGAGHIE, W. C.; WAYNE, D. B. Use of simulation – based education to reduce catheter related bloodstream infections. **Archives of Internal Medicine**. v. 169, p. 1420- 1423, 2009.

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.

BISWAS, R.; VOGGU, L.; SIMON, U.K.; HENTSCHEL, P.; THUMM, G.; GÖTZ, F.
Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. **Federation of European Microbiological Societies - FEMS Microbiology Letter**. v. 259, p. 260-268, 2006.

BJÖRKQVIST, M.; LILJEDAHN, M.; ZIMMERMANN, J.; SCHOLINN, J.; SÖDERQUIST, B.
Colonization pattern of coagulase-negative staphylococci in preterm neonates and the relation to bacteremia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 29, p. 1085-1093, 2010.

BJÖRKQVIST, M.; SÖDERQUIST, B.; TÖRNQVIST, E.; SJÖBERG, L.; FREDLUND, H.; KÜHN, I.; COLQUE-NAVARRO, P.; SCHOLLIN, J. Phenotypic and genotypic characterization of blood isolates of coagulase-negative staphylococci in the newborn. **Acta Pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica – APMIS**. v. 110, p. 332-339, 2002.

BORGHESI, A.; STRONATI, M. Strategies for the prevention of hospital acquired infections in the neonatal intensive care unit. **Journal Hospital Infection**. v. 68, p. 293-300, 2008.

BRADFORD, R.; MANAN, R. A.; DALEY, A. J.; PEARCE, C.; RAMALINGAM, A.; MELLO, D.; MUELLER, Y.; UAHWATANASAKUL, W.; QU, Y.; GRANDO, D.; GARLAND, S.; DEIGHTON, M. Coagulase-negative staphylococci in very-low-birth-weight infants: inability of genetic markers to distinguish invasive strains from blood culture contaminants. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 25, p. 283-290, 2006.

BRITO, D. V. D.; VON DOLINGER, E. J. O.; MACHADO, F. L.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. Formação de biofilme em amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de sepse relacionada a cateter vascular central em neonatos críticos. **Arquivos de Ciências da Saúde**.v. 14, p. 80 – 84, 2007.

BROOKER, R. W.; KEENAN, W. J. Catheter related bloodstream infection following PICC removal in preterm infants. **Journal of Perinatology**. v. 27, p. 171- 174, 2007.

BROWN, D. F. Detection of methicilin/ oxacilin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 48 Suppl., p. 65- 70, 2001.

BRUN-BUISSON, C.; ABROUK, F.; LEGRAND, P.; HUET, Y.; LABARI, S.; RAPIN, M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis: critical level of quantitative tip cultures. **Arquives of Internal Medicine**. v.147, p. 873-877, 1987.

CAFISO, V.; BERTUCCIO, M.S.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.G.; SELAN, M.A.; NICOLETTI, G.; STEFANI, S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology Infection**. v. 10, p. 1081-1088, 2004.

CICALINI, S.; PALMIERI, F.; PETROSILLO, N. Clinical review: New technologies for prevention of intravascular catheter-related infections. **Critical Care Medicine**. v. 8. p. 157- 162, 2004.

CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children. **Current Opinion in Infectious Diseases**.v. 23, p . 208- 216, 2010.

CHIEN, L.; MACNAB, Y.; AZIZ, A.; ANDREWS, W.; MCMILLAN, D. D.; LEE, S. K. Variations in central venous catheter-related infection risks among Canadian neonatal intensive care units. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 2, p. 505-511, 2002.

CHRISTENSEN, G. D.; BISNO, A.L.; PARISI, J. T.; McLAUGHL, B.; HESTER, M. G.; LUTHER, R. W. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Annals of Internal Medicine**. v. 96, p. 1-10, 1982.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed., v.21, Approved Standard M7-A5. Wayne, Pensylvania, 2006.

COLOMER, B.F.; APARÍCIO, R. A.; LÓPEZ SATRES, J. B.; COTO COTALLO, G. D. Prospective evaluation of umbilical catheters in newborn infants. The Catrillo Hospital Group. **Anales españoles de pediatría**. v. 53, p. 470- 478, 2000.

COOLEY, K.; GRADY, S. Minimizing Catheters Related Bloodstream Infections. **Advances in Neonatal Care**. v. 9, p. 209- 226, 2009.

COUTO, R.C.; CARVALHO, E.A.A.; PEDROSA, T.M.G.; PEDROSO, E.R.; NETO, M.C.; BIOSCIONE, F.M. A 10-year prospective surveillance of nosocomial infections in neonatal

intensive care units. **American Journal of Infection Control**. Columbia, v. 35, n. 3, p.183-189,2007.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; A, B.; LASA, I.; PENADES, J.R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 2888-2896, 2001.

DOGRU, A.; SARGIN, F.; ÇELİK, M.; SAGIROGLU, A. E.; GOKSEL, M. M.; SAYHAN, H. The rate of device- associated nosocomial infections in a medical surgical intensive care unit of a training and research hospital in Turkey: one-year outcomes. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. v. 63, p. 95- 98, 2010.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, p. 167-196, 2002.

DONNELL, S.C.; TAYLOR, N.; van SAENE, H.K.F.; MAGNALL, V.L. ; PIERRO, A.; LLOYD, D. A. Infection rates in surgical neonates and infants receiving parenteral nutrition: a five-year prospective study. **Journal of Hospital Infection**. v. 52, p. 273-280, 2002.

EDWARDS, J. R.; PETERSON, K. D.; ANDRUS, M. L.; TOLSON, J. S.; GOULDING, J. S.; DUDECH, M. A.; MINCEY, R. B.; POLLOCK, D. A.; HORAN, T. C. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, data summary for 2006, issued June 2007. **American Journal of Infection Control**. v. 35, p. 290- 301, 2007.

EFTEKHAR, F.; SPEERT, D. P. Biofilm formation by persistent and non- persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection.** v. 71, p. 112- 116, 2009.

EGGIMANN, P.; PITTET, D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programmas. **Clinical Microbiology Infection.** v. 8. p. 295-309, 2002.

EGGIMANN, P.; SAX, H.; PITTET, D. Catheter-related infections. **Microbes and Infection.** v. 6. p. 1033-1042, 2004.

FOKA, A.; CHINI, V.; PETINAKI, E.; KOLONITISIOU, F.; ANASTASSIOU, E. D.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Clonality of slime-producing methicillinresistant coagulase-negative staphylococci disseminated in the neonatal intensive care unit of a university hospital. **Clinical Microbiology and Infection.** v. 12, p. 1230- 1236, 2006.

FOO, R.; FUJII, A.; HARRIS, J. A.; LaMORTE, W.; MOULTON, S. Complications in tunneled CVL versus PICC lines in very low birth weight infants. **Journal of Perinatology.** v. 21, p. 525-530, 2001.

FRATINO, G.; MAZZOLA, C.; BUFFA, P. TORRE, M.; CASTAGNOLA, E.; MAGILLO, P.; MOLINARI, A.C. Mechanical complications related to indwelling central venous catheter in pediatric hematology/oncology patients. **Pediatric Hematology and Oncology.** v. 18, p. 317-324, 2001.

FREDHEIM, E. G. A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENGERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J. E. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 47, p. 1172- 1180, 2009.

GARLAND, J. S.; ALEX, C. P.; HENRICKSON, K. J.; McAULIFFE, L.; MAKI, D. G. 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, p. 198-205, 2005.

GARLAND, J. S.; ALEX, C. P.; SEVALLIUS, J. M.; MURPHY, D. M.; GOOD, J. M.; VOLBERDING, A. M.; HOFER, L. L.; GORDON, B. J.; MAKI, D. G. Cohort Study of the Pathogenesis and Molecular Epidemiology of Catheter-Related Bloodstream Infection in Neonates With Peripherally Inserted Central Venous Catheters. **Infection control and hospital epidemiology**.v. 29, p. 243- 249, 2008.

GARLAND, J. S.; UHING, M. R. Strategies to prevent bacterial and fungal infection in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**. v. 36, p. 1- 13, 2009.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G.; HORAN, T. C.; HUGHES, J. M. CDC definitions for nosocomial infections 1988. **American Journal of Infection**. v. 16. p. 128-140, 1998.

GEFFERS, C.; BAERWOLFF, S.; SCHWAB, F.; GASTMEIER, P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the German surveillance system for very-low-birth weight infants. **Journal of Hospital Infection**. v. 68, p. 214- 221, 2008.

- GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilm. **Molecular Microbiology**. v. 43, p. 1367- 1378, 2002.
- HAMMERMAN, C.; BIN- NUN, A.; KAPLAN, M. Germ warfare: probiotics in defense of the premature gut. **Clinics in Perinatology**. v. 31, p. 489- 500, 2004.
- HANSSEN, A. M.; KJELDSSEN, G.; SOLLID, J. U. E. Local variants of staphylococcal cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 285-296, 2004.
- HEILMANN, C.; HUSSAIN, M.; PETERS, G.; GÖTZ, F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. **Molecular Microbiology**. v.24, p. 1013-1024, 1997.
- HEILMANN, C.; THUMM, G.; CHHATWAL, G. S.; HARLEIB, J.; UEKOTTER, A.; PETERS, G. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**. v. 149, p. 2769-2778, 2003.
- HIRA, V.; SLUIJTER, M.; ESTEVÃO, S.; HORST- KREFT, D.; OTT, A.; GROOT, R.; HERMANS, P. W. M.; KORNELISSE, R. F. Clinical and Molecular Epidemiologic Characteristics of Coagulase-Negative Staphylococcal Bloodstream Infections in Intensive Care Neonates. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 26, p. 607- 612, 2007.
- HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends of Microbiology**. v. 9, p. 486-493, 2001.

HISATA, K.; KUWAHARA-ARAI, K.; YAMANO, M.; ITO, T.; NAKATOMI, Y.; CUI, L.; BABA, T.; TERASAWA, M.; SOTOZONO, C.; KINOSHITA, S.; YAMASHIRO, Y.; HIRAMATSU, K. Dissemination of methicillin-resistant staphylococci among healthy Japanese children. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 3364-3372, 2005.

HOOD, G. H.; DINCHER, J.R. **Fundamentos e Prática da Enfermagem: Atendimento Completo ao Paciente**. Porto Alegre: Artes Médicas. 8ed, 769p. 1995.

HUSSAIN, M.; HERRMANN, M.; vonEIFF, C. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. **Infection and Immunity**. v. 65, p. 519-524, 1997.

IBRAHEM, S.; SALMENLINNA, S.; LYYTIKÄINEN, O.; VAARA, M.; VUOPIO-MARKILA, J. Molecular characterization of - methicillin- resistant *Staphylococcus epidermidis* strains from bacteraemic patients. **Clinical Microbiology Infection**. v. 14, p. 1020- 1027, 2008.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, p. 1323-1336, 2001.

KLINGENBERG, C.; AARAG, E.; RONNESTAD, A.; SOLLID, J.E.; ABRAHAMSEN, T. G.; KJELDSSEN, G.; FLOEGSTAD, T. Coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates

– Association between antibiotic resistance, biofilm formation and the host inflammatory response. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v.24, p. 817-822, 2005.

KLINGENBERG, C.; RØNNESTAD, A.; ANDERSON, A. S.; ABRAHAMSEN, T.G.; ZORMAN, J.; VILLARUZ, A.; FLAEGSTAD, T.; OTTO, M.; SOLLID, J. E.; Persistent strains of coagulase- negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. **Clinical Microbiology Infection**. v. 13, p. 1100- 1111, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: MEDSI. 5 ed. p. 434, 2001.

KREDIET, T. G.; JONES, M. E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L. J.; FLEER, A. Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 3376-3378, 2001.

KREDIET, T. G.; MASCINI, E. M.; ROOIJ, E.; VLOOSWIJK, J.; PAAUW, A.; GERARDS, L. J.; FLEER, A. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11 year period. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 992-995, 2004.

LARSON, E. Hygiene of the skin: when is clean too clean? **Emerging Infectious Diseases**. v.7, p.225- 230, 2001.

LEE, S. K.; McMILLAN, D.; OHLSSON, A. Variations in practice and outcomes of the Canadian NICU Network: 1996-7. **Pediatrics**. v. 106, p. 1070-1079, 2002.

LOPES, G. K.; ROSSETO, E. G.; BELEI, R. A.; CAPOBIANGO, J. D.; MATSUO, T. Estudo epidemiológico das infecções neonatais no Hospital Universitário de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. v. 30, p. 55- 63, 2008.

MACHADO, A. B. M. P. **Resistência à meticilina mediada pelo gene *mecA* nos *Staphylococcus spp* coagulase negativa**. 2007. 162p. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

MACFADDIN, J. F. 1976. **Biochemical Tests for identification of Medical Bacteria**. Williams & Wilkins Company, Baltimore, USA. 312p.

MAKI, D. G.; RINGER, M.; LVARADO, C. J. Prospective randomized trial of povidine-iodine, alcohol e chorexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. **Lancet**. v. 338, p.339-343, 1991.

MAKI, D. G.; WEISE, C. E.; SERAFIN, H.W. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. **The New England Journal of Medicine**. v. 296, p. 1305-1309, 1977.

McCLURE, J.; CONLY, J. M.; LAU, V.; ELSAYED, S.; LOUIE, T.; HUTCHINS, W.; ZHANG, K. Novel multiplex PCR assay for detection of the Staphylococcal virulence marker Pantón-Valentine Leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-

susceptible from resistant staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 1141-1144, 2006.

MAHIEU, L.M.; MUYNCK, A.O.; IEVEN, M.M.; De DOOY, J.J.; GOOSSENS, H.J.; Van REEMPTS, P.J. Risk factors for central vascular catheter-associated bloodstream infections among patients in a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**. v. 48, p. 108-116, 2001.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PEREIRA, S. F. F; KRISTINSSON, K. G.; WESTH, H.; JARLOV, J. O.; CARRICO, J.; ALMEIDA, J.; SANTOS-SANCHES, I.; LENCASTRE, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geografic dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**. p. 430-438, 2002.

MORALES, M.; MÉNDEZ-ALVAREZ, S.; MARTÍN-LOPEZ, J. M.; MARRERO, C.; FREYTES, C. O. Biofilm: the microbial bunker for intravascular catheter-related infection. **Support Care Medicine**. v. 12, p. 701-707, 2004.

NAGATA, E.; BRITO, A. S.; MATSUO, T. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors. **American Journal Infection Control**. v. 30, p. 26- 31, 2002.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) SYSTEM REPORT, Data Summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. **American Journal Infection Control**. v. 29. p. 404-421, 2001.

NISHIKAWA, K.; TAKASU, A.; MORITA, K.; TSUMORI, H.; SAKAMOTO, T. Deposits on the intraluminal surface and bacterial growth in central venous catheters. **Journal of Hospital Infection**. v. 75, p. 19- 22, 2010.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; BASTOS, C. C. R.; SILVA, M. G.; FERREIRA, R. B. R.; FONSECA, L. S.; SANTOS, K.R.N. Genomic characterization of oxacillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* isolated from Brazilian medical centres. **Journal of Hospital Infection**. p. 19-26, 2005.

OLSEN, A. L.; REINHOLDT, J.; JENSEN, A. M.; ANDERSEN, L. P.; JENSEN, E. T. Nosocomial infection in a Danish Neonatal Intensive Care Unit: a prospective study. *Acta Paediatrica*. v. 98, p. 1294- 1299, 2009.

OLIVEIRA, A. **Comparação de Métodos de Detecção de Biofilme em Estafilococos Coagulase-Negativa Provenientes de Infecções em Recém-Nascidos**. 2009.110p. Dissertação em Biologia Geral e Aplicada. Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

ÖNAL, E. E.; SAYGILI, A.; KOÇ, E.; TÜRKYILMAZ, C.; OKUMUS, N.; ATALAY, Y. Cardiac tamponade in a newborn because of umbilical venous catheterization: is correct position safe? *Pediatric Anesthesia*. v. 14, p. 953-956, 2004.

ÖNCÜ, S.; ÖZSÜET, H.; YILDIRIM, A.; AY, P.; ÇAKAR, N.; ERAKSOY, H.; ÇALANGU, S. Central venous catheter related infections: risk factors and the effect of glycopeptides antibiotics. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. v. 2, p. 1- 6, 2003.

ORNICH, C. J.; MAKI, D. G. The Promise of Novel Technology for the Prevention of Intravascular Device-Related Bloodstream Infection. **Clinical Infectious Diseases**. v. 34, p. 1232-1242. 2002.

PAULSON, P. R.; MILLER, K. M. Neonatal peripherally inserted central catheters: recommendations for prevention of insertion and post insertion complications. *Neonatal Network*. v. 27, p. 245-57, 2008.

PESSOA-SILVA, C.L.; RICCHTMANN, R.; CALIL, R.; SANTOS, R.M.R.; COSTA, M.L.M.; FROTA, A.C.C.; WEY, S.B. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.25, p. 772-777, 2004.

PITTET, D.; ALEGRANZI, B.; SAX, H.; DHARAN, S.; PESSOA-SILVA, C. L.; DONALDSON, L.; BOYCE, J. M. Evidence based model for hand transmission during patient care and role of improved practices. **The Lancet Infectious Diseases**. v.6, p. 641- 652, 2006.

POSFAY- BARBE.; ZERR, K. M.; PITTET, D. Infection control in paediatrics. **The Lancet**. v. 8, p. 19- 31, 2008.

PRONOVOST, P.; NEEDHAM, D.; BERENHOLTZ, S.; SINOPOLI, D.; CHU, H.; COSGROVE, S.; SEXTON, B.; HYZY, R.; WELSH, R.; ROTH, G.; BANDER, J.; KEPROS, J.; GOESCHEL, C. An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. *The New England Journal of Medicine*. v. 36, p. 2725-2732, 2006.

RAMASETHU, J. Complications of vascular catheters in the neonatal intensive care unit. **Clinical Perinatology**. v. 35, p. 199- 222, 2008.

REACHER, M. H.; SHAH, A.; LIVERMORE, M. D.; MARTIN, C. J. W.; GRAHAM, C.; JOHSON, A. P.; HEINE, H.; MONNICKENDAM, M. A.; BARKER, K. F.; JAMES, G. R. C. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998:trend analysis. **British Medical Journal**. v. 320, 22 JANUARY, 2000.

RUPP, M.E.; FEY, P.D.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **Journal of Infectious Diseases**. v. 183, p. 1038-1042, 2001.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal Infectious Diseases**. v. 5, p. 200- 214, 2001.

SAFDAR, N.; MAKI, D. G. Risk of catheter-related bloodstream infection with peripherally inserted central venous catheters used in hospitalized patients. **Chest**. v. 128, p. 489-495, 2005.

SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; LEAL, G. S.; FONSECA, L. S.; GONTIJO FILHO, P. P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **Journal of Medical Microbiology**. v. 48, p.17-23, 1999.

SCHWAB, F.; GEFFERS, C.; BÄRWOLFF, S.; RÜDEN, H.; GASTMEIER, P. Reducing neonatal bloodstream infections through participation in a national surveillance system. **Journal of Hospital Infection**. v. 65, p. 319- 325, 2007.

SHAMA, A.; PATOLE, S. K.; WHITEHALL, J. S. The dilemma of removing umbilical venous catheters in high-risk neonates with nosocomial sepsis. **Indian Pediatrics**. v. 39, p. 209, 2002.

SHERERTZ, R. J.; ELY, E. W.; WESTBROOK, D. M.; KATE, S. G.; STREED, S. A. KIGGER, B.; FLYNN, L.; HAYES, S.; STRONG, S.; CRUZ, J.; BOWTON, D. L.; HULGAN, T.; HAPONIK, E. F. Education of Physicians in Training Can Decrease the Risk for Vascular Catheter Infection. **Annals of Internal Medicine**. v. 132. p. 641- 647, 2000.

SIHLER, K. C.; CHENOWETH, C.; ZALEWSKI, C.; WAHL, W.; HYZY, R.; NAPOLITANO, L. M. Catheter-Related vs. Catheter-Associated Blood Stream Infections in the Intensive Care Unit: Incidence, Microbiology, and Implications. **Surgical Infections**. v. 11, p. 529- 534, 2010.

SOUZA JÚNIOR, F. C.; NUNES, E. W. F.; NASCIMENTO, E. D.; OLIVEIRA, S. M.; MELO, M. S. N.; FERNANDES, M. J. B. C. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp isolated in a teaching maternity hospital in the city of Natal, State of Rio Grande do Norte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.42, p. 179- 182, 2009.

STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A. A.; WRIGHT, L. L.; CARLO, W. A.; EHRENKRANZ, R. A.; LEMONS, J. A.; DONOVAN, E. F.; STARK, A. R.; TYSON, J. E.;

OH, W.; BAUER, C. R.; KORONES, S. B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, A. R.; STEVENSON, D. K.; PAPILE, LU-ANN.; POOLE, W. K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. **Pediatrics**. v. 110, p. 285-291, 2002.

SRIVASTAVA, S.; SHETTY, N. Healthcare-associated infections in neonatal units: lessons from contrasting worlds. **Journal of Hospital Infection**. v. 65, p. 292-306, 2007.

STRUTHERS, S.; UNDERHILL, H.; ALBERSHEIM, S.; GREENBERG, D.; DOBSON, S. A comparison of two versus one blood culture in the diagnosis and treatment of coagulase-negative *Staphylococcus* in the neonatal intensive care unit. **Journal of Perinatology**. v. 22, p. 547-549, 2002.

TÁVORA, A. C. V. C. F.; CASTRO, A. B.; MILITÃO, M. A. M.; GIRÃO, J. E.; RIBEIRO, K. C. B.; Risk factors for nosocomial infection in a Brazilian neonatal intensive care unit. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 12, p. 75- 79, 2008.

UÇKAY, I.; PITTET, D.; VAUDAUX, P.; SAX, H.; LEW, D.; WALDVOGEL, F. Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. **Annals of Medicine**. v. 41, p. 109- 119, 2009.

VEENSTRA, G. J.; CREMERS, F. F.; van DIJK, H.; FLEER, A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 537-541, 1996.

VENKATESH, M. P.; PLACENCIA, F.; WEISMAN, L. E. Coagulase- negative Staphylococcal infections in the neonate and child: an update. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. v. 17, p. 120- 127, 2006.

VERGUNTA, R. K.; LOETHEN, P.; WALLACE, L. J.; ALBERT, V. L.; PEARL, R. H. Differences in the outcome of surgically placed long-term central venous catheters in neonates: neck vs groin placement. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 40, p. 47-51, 2005.

VILLARI, P.; SARNATARO, C.; IACUZIO, L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. **Journal of Clinical Microbiology**. v.38, p.1740-1746, 2000.

VOGEL, L.; SLOOS, J. H.; SPAARGAREN, J.; SUIKER, I.; DIJKSHOORN, L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**. v. 36, p. 139-141, 2000.

WEI, S.; CHIU, H.; HUNG, K.; WANG, J.; SU, B.; LIN, H.; LIN, T.; LIN, H. Epidemiologic trends in nosocomial bacteremia in a neonatal intensive care unit. **Journal of Microbiology, Immunologic and Infection**. v.38, p.283-288, 2005.

WESTERBEK, E.A. ; van den Berg, A. ; LAFEBER, H.N. ; KNOL, J. ; FETTER, W.P. ; van ELBURG, R.M. The intestinal bacterial colonization in preterm infants: a review of the literature. **Clinical Nutrition**. v. 3, p. 361-368, 2006.

WYERS, M.R.; McALISTER, W.H. Umbilical artery catheter use complicated by pseudoaneurysm of the aorta. **Pediatric Radiology**. v. 32, p. 199-201, 2002.

WORTHINGTON, T.; ELLIOT, T. S. J. Diagnosis of central venous catheter related infection in adult patients. **Journal of Infection**. v. 51, p. 267-280, 2005.

ZAIDI, A. K. M.; HUSKINS, W. C.; THAVER, D.; BHUTTA, Z. A.; ABBAS, Z.; GOLDMANN, D. A. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **The Lancet**. v. 365, p. 1175-1188, 2005.

ANEXO I

[illegible][illegible]

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “Etiopatogenia de infecções de corrente sanguínea por *Staphylococcus epidermidis* associadas e relacionadas ao uso de cateter vascular central em neonatos críticos”, cujo principal objetivo é avaliar a ocorrência dessas infecções na UTIN do HC-UFU.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais o meu filho (a) será submetido (a) e que serão realizados no Laboratório de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, a saber de:

c) necessidade de coleta de material no local de entrada de cateter, na ponta e canhão do cateter e no nariz.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento que desejar.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação, inclusive no caso de publicação.

Uberlândia, ____ de _____ de 200__.

ASSINATURA

Responsáveis pela investigação:

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

Ms. Cristiane Silveira de Brito (Responsável, UFU)

Laboratório de Microbiologia- (034) 3218-2236.

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)- (034) 3239-4531/4131.

ANEXO III



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 056/06

Registro CEP: 022/06

Projeto Pesquisa: "Influência dos diferentes tipos de cateteres vasculares centrais (CVCs) na patogênese de infecção sangüínea por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos críticos"

Pesquisador Responsável: Paulo Pinto Gontijo Filho

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do mesmo.

Situação: Aprovado

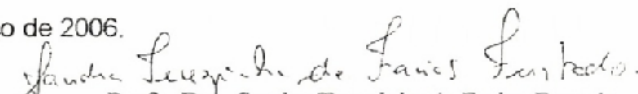
Data para entrega do Relatório Parcial: maio/2007

Data para entrega do Relatório Final: maio/2008

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

Uberlândia, 22 de março de 2006.


Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO IV

- 1- BRITO, C.S.; BRITO, D.V.D.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO FILHO, P. P.
Occurrence of bloodstream infection with different types of central vascular catheter in critically neonates. **Journal of Infection**. v.20, p. 128-132, 2010.

- 2- BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V.O.S.; DOS SANTOS, K. R. N.; GONTIJO FILHO, P. P. Are there any differences among pathogenesis of catheter-related primary bloodstream infection in adults and neonates patients? **AJIC**. v.38, p. 494, 2010.

- 3- BRITO, D.V.D.; BRITO, C.S.; RESENDE, D. S.; MOREIRA DO Ó, J.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO FILHO, P. P. Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Neonatal Tropical**. v.43, 2010.

- 4- SOARES, L. R.; BORGES, R. M.; BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V.O.S.; DOS SANTOS, K. R. N.; GONTIJO FILHO, P. P. Incidência e fatores de risco para sepse tardia por *Staphylococcus* em neonatos críticos. **SaBios**. v. 5, p. 13-19, 2010.

- 5- BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V.O.S.; DOS SANTOS, K. R. N.; GONTIJO FILHO, P. P. An outbreak of sepsis associated/ related with the use of central venous catheter in a Neonatal Intensive Care Unit. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 11, p. 15- 17, 2009.

- 6- BORGES, R. M.; SOARES, L. R.; BRITO, C. S.; BRITO, D. V. D.; ABDALLAH, V.O.S.; DOS SANTOS, K. R. N.; GONTIJO FILHO, P. P. Fatores de risco associados à colonização por *Candida* spp em neonatos internados em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, p. 431- 435, 2009.
- 7- GONDIM, B. A.; BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; VON DOLINGER, E. J.O.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. Fatores de risco para colonização e sepse por *Candida albicans* e *Candida* não *albicans* em neonatos críticos. **Arquivo em Ciências da Saúde**. v. 16, p. 105 - 110, 2008.
- 8- OLIVEIRA, N. A.; BRITO, D. V. D.; BRITO, C. S.; SILVA, M. S. S.; ABDALLAH, V. O. S.; GONTIJO FILHO, P. P. Incidência e etiologia de infecções de corrente sanguínea associada a cateter vascular central em neonatos críticos. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 10, p. 18- 23, 2008.