

Diagnóstico das infecções relacionadas a cateter em recém-nascidos e
epidemiologia molecular dos *Staphylococcus* spp

DANILO FLÁVIO MORAES RIBOLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *21202010*.

Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha

**BOTUCATU – SP
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Diagnóstico das infecções relacionadas a cateter em recém-nascidos e
epidemiologia molecular dos *Staphylococcus* spp. isolados

DANILO FLÁVIO MORAES RIBOLI

MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

ORIENTADORA

JOÃO CÉSAR LYRA

CO-ORIENTADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração 21202010.

Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

**BOTUCATU – SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Riboli, Danilo Flávio Moraes.

Diagnóstico das infecções relacionadas a cateter em recém-nascidos e epidemiologia molecular dos *Staphylococcus* spp isolados / Danilo Flávio Moraes Riboli. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Coorientador: João César Lyra

Capes: 21202010

1. Recém-nascidos. 2. Infecções estafilocócicas. 3. Cateteres. 4. Epidemiologia molecular.

Palavras-chave: Infecção relacionada a cateter; Quantitativa; Semiquantitativa; *Staphylococcus* spp.

Dedicatória

Dedico esse trabalho a meus pais **Luiz Henrique Riboli** e **Vera Lúcia Moraes Riboli**, que sempre apoiaram e incentivaram o caminho escolhido por mim, aconselhando e dando forças nos momentos difíceis e compartilhando os momentos felizes, pessoas sem os quais não seria possível conseguir tudo que alcancei.

Agradecimentos

À Deus por colocar em meu caminho tantas pessoas amigas com quem pude contar.

À minha família, meu irmão Fábio, meu pai Luiz e minha mãe Vera por todo apoio, incentivo e pela compreensão dos momentos de ausência.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha pela orientação, por todo ensinamento e paciência nesses quase quatro anos.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João César Lyra pelo apoio e ensinamentos que muito contribuíram para a conclusão desse projeto.

À todos os meus amigos, em especial, meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bacteriologia, Adilson, Ariane, Aydir, Camila, Carla, Carlos, Eliane, Katheryne, Lígia, Luisa, Luiza, Mariana, Patrícia, Priscila, Taisa, Thaís, Valéria, meus amigos biomédicos, Alexandre Tanimoto, Bianca Gregorio, Evandro Utsunomia e Marília Carneiro, pessoas com quem passei tantos momentos felizes, pelos momentos inesquecíveis que vivi com vocês, por toda ajuda e incentivo nos momentos difíceis.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial Ary Fernandes Junior, José Maurício Sforcin e Terue Sadatsume, pela amizade, apoio e ensinamentos em todos esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente Luiz Alquati e Luiz Severino dos Santos, pela amizade e ajuda prestadas ao departamento.

Às secretárias Ana Claudia Acerra e Sonia Maria Faraldo, que muito me ajudaram e atenderam, pelo excelente serviço prestado ao departamento.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação André de Arruda, Davi Müller, Herivaldo Santos, Luciana de Campos e Tatiana Avellar por toda ajuda e pelo ótimo atendimento que sempre recebi.

Aos funcionários da Unidade Neonatal da Faculdade de Medicina de Botucatu que muito colaboraram com a obtenção das amostras desse estudo.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, processo nº 2010/14581-7.

Sumário

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
OBJETIVO GERAL.....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
ARTIGO I.....	25
<i>Resumo.....</i>	<i>26</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>27</i>
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
<i>Amostras.....</i>	<i>30</i>
<i>Critérios de inclusão.....</i>	<i>30</i>
<i>Critérios de exclusão.....</i>	<i>31</i>
<i>Definições.....</i>	<i>31</i>
<i>Cultura da ponta de cateter.....</i>	<i>31</i>
<i>Hemocultura.....</i>	<i>32</i>
<i>Identificação dos micro-organismos.....</i>	<i>32</i>
<i>Identificação de bactérias do gênero Staphylococcus.....</i>	<i>32</i>
<i>Teste de Sensibilidade às drogas antimicrobianas.....</i>	<i>33</i>
<i>Densidade de Incidência de ICSAC e ICSRC.....</i>	<i>33</i>
<i>Análise genotípica das amostras de Staphylococcus spp.....</i>	<i>34</i>
<i>Extração do ácido nucleico.....</i>	<i>34</i>
<i>Amplificação do ácido nucléico (PCR) para detecção do gene mecA de Resistência à Oxacilina em amostras de Staphylococcus spp.....</i>	<i>35</i>
<i>Determinação do SCCmec.....</i>	<i>36</i>
<i>Detecção dos genes icaA, icaB, icaC e icaD específicos para produção de biofilme.....</i>	<i>37</i>
<i>Visualização dos produtos amplificados.....</i>	<i>38</i>
<i>Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno.....</i>	<i>38</i>
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina e vancomicina pelo método de microdiluição em caldo em células plactônicas de Staphylococcus spp.....</i>	<i>40</i>
<i>Determinação da Concentração Bactericida (CBM) de oxacilina e vancomicina pelo método de microdiluição em caldo em biofilme de Staphylococcus spp.</i>	<i>41</i>

<i>Análise estatística</i>	42
RESULTADOS	42
<i>Amostras</i>	42
<i>Densidade de Incidência de ICSAC e ICSRC</i>	43
<i>Avaliação do Perfil de Resistência à oxacilina e vancomicina e detecção da produção de biofilme em amostras de Staphylococcus spp.</i>	45
<i>Análise dos fatores de risco dos recém-nascidos para ICSRC</i>	46
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	48
AGRADECIMENTOS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ARTIGO II	60
<i>Resumo</i>	61
<i>Abstract</i>	63
INTRODUÇÃO	64
MATERIAIS E MÉTODOS	66
<i>Amostras</i>	66
<i>Crítérios de inclusão</i>	66
<i>Crítérios de exclusão</i>	66
<i>Definições</i>	67
<i>Cultura da ponta de cateter</i>	67
<i>Hemocultura</i>	68
<i>Identificação dos microrganismos</i>	68
<i>Identificação de bactérias do gênero Staphylococcus</i>	68
<i>Teste de Sensibilidade às drogas antimicrobianas</i>	68
<i>Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)</i>	69
<i>Análise estatística</i>	70
RESULTADOS	71
<i>Coleta das amostras</i>	71
<i>Culturas das pontas de cateter</i>	71
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
PARECER DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA	88

Resumo

Infecções da Corrente Sanguínea Relacionadas a Cateter (ICSRC) têm se tornado a principal causa de infecção sanguínea associada à assistência a saúde e são associadas com substancial morbidade, mortalidade e excesso de custos ao hospital. Essas infecções incluem colonização do dispositivo pelos microrganismos, infecção no local de saída e uma infecção da corrente sanguínea microbiologicamente confirmada relacionada ao dispositivo. A cultura semiquantitativa é baseada no rolamento de segmento da ponta de cateter em placa contendo ágar-sangue, determinando a presença de bactérias na superfície externa do cateter e crescimento igual ou superior a 15 UFC é um indicativo de infecção. No método quantitativo descrito passa-se 1 mL de água destilada estéril pelo lúmen do cateter, agita-se e semeia-se em ágar sangue por 5 dias, considera-se significativo o crescimento maior ou igual que 10^3 UFC/mL, recuperando micro-organismos da superfície interna e externa do cateter. Nesse estudo, foram analisadas 584 pontas de cateter de 399 pacientes de Novembro de 2005 a Junho de 2012. As sensibilidades das técnicas semiquantitativa e quantitativa foram 72,7% e 59,3%, respectivamente, com especificidades de 95,7% e 94,4%, respectivamente. O diagnóstico de ICSRC a partir da similaridade dos isolados das pontas de cateteres e da hemocultura pela técnica genotípica PFGE revelou sensibilidade de 82,6% e especificidade de 100%. Os ECN foram os micro-organismos mais isolados. Sendo a espécie *S. epidermidis* a prevalente (61,0%), seguida por *S. haemolyticus* (13,0%), leveduras (8,7%), *K. pneumoniae* (8,7%), *S. aureus* (4,3%) e *E. coli* (4,3%). A resistência à Oxacilina foi encontrada em 90,9% dos ECN isolados dos casos de ICSRC, o SCCmec tipo III foi encontrado em 55,0%, o operon *icaABCD* em 59,0%. A CIM dos ECN para Oxacilina foi $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ para todos os isolados com exceção de um e para Vancomicina $\leq 4\mu\text{g/mL}$ para todos. A produção de biofilme foi verificada em 46,1% dos isolados de ICSRC. Os produtores de biofilme apresentaram CBB $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ para Oxacilina e $\geq 256\mu\text{g/mL}$ para Vancomicina. As taxas de incidência variaram, entre 10,51 e 18,7 nos casos de infecção da

corrente sanguínea associada a cateter e 1,16 a 3,44 nos casos de infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter, de acordo com a faixa de peso dos recém-nascidos. A técnica semiquantitativa revelou maior sensibilidade e especificidade quando comparada com a técnica quantitativa no diagnóstico de ICSRC em recém-nascidos, além da maior simplicidade na execução e uma maior concordância com o padrão ouro, sendo mais recomendada na rotina de laboratórios clínicos. A técnica de PFGE pode auxiliar no controle das ICSRC ao identificar clones de micro-organismos na Unidade Neonatal que podem ser responsáveis pela maioria dessas infecções. A densidade de incidência de infecção relacionada ao cateter foi bem inferior às taxas de incidência de ICSAC, indicando que outras fontes de infecção podem superestimar essas taxas, revelando a importância desses critérios como marcador de qualidade dos cuidados com CVC na Unidade Neonatal estudada. A resistência à oxacilina em ECN mostrou ser fator de risco na aquisição de ICSRC, bem como a utilização de cateter umbilical. Foi demonstrando que mesmo altas concentrações de oxacilina e vancomicina não foram capazes de matar todos os micro-organismos quando em biofilme.

Palavras-chave: semiquantitativa, quantitativa, estafilococos coagulase-negativo, infecção relacionada a cateter

Abstract

Catheter-related bloodstream infections (CR-BSIs) have become the most common cause of healthcare-associated bloodstream infection and are associated with substantial morbidity and mortality and excess hospital costs. These infections include device colonization by microorganisms, exit site infection, and microbiologically confirmed device-related bloodstream infection. Semi-quantitative culture is used to determine the presence of microorganisms on the outer surface of the catheter, whereas quantitative culture also isolates microorganisms present inside the catheter. The objectives of this study were to compare the semi-quantitative and quantitative techniques for the diagnosis of CR-BSIs in newborns hospitalized in the neonatal ICU of HC-FMB, and to determine the incidence density and risk factors for these infections. In this study, 584 catheter tips from 399 patients seen between November 2005 and June 2012 were analyzed. The incidence density of CR-BSI varied according to newborn weight, with an incidence of 3.44/1000 catheter days in newborns <1,000 g and of 2.83/1000 catheter days in newborns >2,501 g. The sensitivity of the semi-quantitative and quantitative techniques was 72.7% and 59.3%, respectively, and specificity was 95.7% and 94.4%. The diagnosis of CR-BSI based on PFGE analysis of similarity between strains isolated from catheter tips and blood cultures showed 82.6% sensitivity and 100% specificity. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) were the most frequently isolated microorganisms (75.9%), including *S. epidermidis* as the most prevalent species (65.5%), followed by *S. haemolyticus* (10.3%), yeasts (10.3%), *K. pneumoniae* (6.9%), *S. aureus* (3.4%), and *E. coli* (3.4%). Oxacillin resistance was observed in 90.9% of the CoNS isolated from cases of CR-BSI. SCC*mec* type III was detected in 55% of the isolates and the *ica*ABCD operon in 59%. The oxacillin MIC was ≥ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for most strains and the vancomycin MIC was ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$. Biofilm-producing CoNS exhibited biofilm bactericidal concentrations ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ for oxacillin and ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ for vancomycin. The

semi-quantitative technique showed higher sensitivity and specificity for the diagnosis of CR-BSI in newborns when compared to the quantitative technique. In addition, this method is easier to perform and shows better agreement with the gold standard, and should therefore be recommended for routine clinical laboratory use. PFGE may contribute to the control of CR-BSIs by identifying the predominant clones of microorganisms in neonatal ICUs that are responsible for most of these infections. The incidence density of CR-BSIs was much lower than the incidence of catheter-associated bloodstream infections, suggesting that other sources of infection may overestimate these rates and highlighting the importance of these criteria as indicators of the quality of catheter care in the neonatal unit studied. Oxacillin resistance of CoNS and the use of an umbilical catheter were found to be risk factors for the acquisition of CR-BSI. Even high concentrations of oxacillin and vancomycin were unable to eliminate all CoNS in the biofilm.

Key-words: semi-quantitative, quantitative, Coagulase-negative staphylococci, Catheter-related bloodstream infections

Introdução

Cateteres intravasculares são indispensáveis na prática médica moderna, especialmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Embora tais cateteres forneçam acesso vascular necessário, o seu uso põe pacientes em risco de complicações infecciosas locais e sistêmicas. A maioria das infecções graves relacionadas a cateteres está associada a cateteres venosos centrais (CVCs) (CDC, 2011).

Na UTI, o acesso venoso central pode ser necessário por longos períodos de tempo, os pacientes podem ser colonizados por organismos presentes no hospital; e o cateter pode ser manipulado várias vezes ao dia, durante a administração de fluidos, drogas e produtos derivados do sangue. Além disso, alguns cateteres podem ser inseridos em situações de urgência, durante o qual a atenção ideal para a técnica asséptica pode não ser viável (CDC, 2011).

Infecções da Corrente Sanguínea Relacionadas a Cateter (ICSRC) têm se tornado a principal causa de infecção sanguínea associada à assistência a saúde e são associadas com substancial morbidade, mortalidade e excesso de custos ao hospital (Rosenthal et al 2003). Mais de 250.000 bacteremias e fungemias relacionadas a cateter ocorrem anualmente nos EUA com uma mortalidade atribuída de 12% a 25% em pacientes mais graves (CDC 2011). Com um custo adicional de US\$3,000 a \$56,000 e prolongação da hospitalização de 10 a 40 dias (Pittet et al 1994).

Infecções relacionadas a cateter incluem colonização do dispositivo pelos micro-organismos, infecção no local de saída e uma infecção da corrente sanguínea microbiologicamente confirmada relacionada ao dispositivo. Na falta de uma técnica padrão ouro de referência, o critério microbiológico é tópico de intensa pesquisa, e sua relevância é frequentemente discutida entre especialistas (Worthington 2005).

O diagnóstico das ICSRC ainda é um desafio. Febre e calafrios são comumente associados à infecção, mas não são específicos e a inflamação no sitio de inserção do cateter

possui uma sensibilidade de 8% ou menos (Bouza et al 2002). Por isso, evidências microbiológicas implicando o cateter como fonte da infecção sanguínea são necessárias para estabelecer um diagnóstico da ICSRC.

A cultura semiquantitativa desenvolvida por Maki et al.(Maki et al, 1977) é baseada no rolamento de segmento da ponta de cateter em placa contendo ágar-sangue, determinando a presença de bactérias na superfície externa do cateter. Esse método distingue colonização do de infecção do dispositivo, por meio da quantificação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Cultura semiquantitativa com crescimento igual ou superior a 15 UFC é um indicativo de colonização significativa.

No método quantitativo descrito por Brun-Bruissson et al. (1987) passa-se 1 mL de água destilada estéril pelo lúmen do cateter, agita-se e semeia-se em ágar-sangue por 5 dias, considera-se significativo o crescimento maior ou igual que 10^3 UFC/mL, recuperando micro-organismos da superfície interna e externa do cateter.

A infecção relacionada a dispositivos intravasculares pode se dar por cinco mecanismos principais, do qual a superfície externa do cateter é a principal fonte de infecção (Maki et al 1973, Snyderman 1982). São elas: contaminação do cateter no momento da inserção devido à anti-sepsia incorreta; migração de micro-organismos da pele ao longo da superfície externa do cateter; contaminação do hub do cateter por fontes extrínsecas ou endógenas através do lúmen do cateter, infusão contaminada e contaminação hematogênica a partir de um foco de infecção à distância (CDC 2011).

Segundo Maki et al. (1977), a migração de organismos da pele no local de inserção do cateter é a rota mais comum de infecção para cateteres inseridos periféricamente a curto prazo. *Estafilococos coagulase-negativa* (ECN), principais componentes da microbiota da pele, são frequentemente recuperados de cateteres contaminados e de pacientes com sepse associada ao uso de cateteres (Goldmann e Pier, 1993, Healy et al 2013). Os estafilococos geralmente mantêm

uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros. Contudo se a barreira cutânea for rompida por trauma ou pela presença de artigos estranhos, esses micro-organismos podem atingir outros tecidos e proliferar, desenvolvendo um comportamento patogênico (Koneman et al, 1997, Otto 2009).

Tal como nos adultos, a maioria das infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter (ICSRCs) em crianças são causadas por ECN. Durante 1992-1999, essas bactérias foram responsáveis por 37,7% das infecções da corrente sanguínea (ICS) em UTIs pediátricas segundo relatórios do NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) (CDC, 1999). Esses micro-organismos continuam prevalentes nas infecções da corrente sanguínea nessas unidades (Sohn et al 2001, Hocevar et al 2012).

De acordo com as novas diretrizes de vigilância epidemiológica do Centro de Controle e Prevenção de Doenças e Rede Nacional de Segurança na Assistência à Saúde dos Estados (CDC- National Healthcare Safety Network - NHSN) as infecções da corrente sanguínea são consideradas associadas ao cateter (ICSAC), se o CVC estiver presente no momento do diagnóstico ou 48 horas após sua remoção (CDC, 2011), enquanto as infecções da corrente sanguínea relacionadas a CVC (ICSRC) requer testes laboratoriais específicos para isolar e identificar os micro-organismos presentes nos cateteres e nas hemoculturas, sendo firmado o diagnóstico quando a mesma linhagem do micro-organismo é encontrada na ponta de cateter e na hemocultura periférica.

Sabe-se que a incidência de sepse neonatal é inversamente proporcional ao peso ao nascimento e à idade gestacional. O sistema de defesa imaturo e a utilização de sistemas invasivos tornam o prematuro susceptível a infecções (Stoll et al, 2002, Cunha et al 2002, Healy et al 2013). Segundo dados do NHSN dos Estados Unidos, a incidência de ICSAC em Unidade Neonatal foi de 6,4/1000 CVC-dia nos RN < 750g; 4,4/1000 CVC-dia nos < 1000g; 4,8/1000 CVC-dia nos de 1001-1500g; 4,2/1000 CVC-dia nos 1501-2500g e 3,1/1000 CVC-dia nos

>2500g. No Brasil, segundo dados de Pessoa-Silva et al. (2004), a incidência de ICSAC variou de 17,3 por 1000 cateteres-dias em recém-nascidos entre 1501g a 2500g até 34,9 por 1000 cateteres-dia em recém-nascidos com peso <1000g. Entretanto, desde que as infecções da corrente sanguínea podem ser secundárias a outras fontes que não o cateter e que podem não ser facilmente reconhecidas, a vigilância a partir somente de dados de ICSAC pode superestimar a taxa (CDC, 2011), sendo importante o diagnóstico de ICSAC para a determinação da incidência mais precisa desse tipo de infecção. Dados do CDC reportam os ECN como ainda sendo os patógenos mais comuns seguidos por *S. aureus*, enterococos e espécies de *Cândida*. Os bacilos Gram- negativos representam 19% das infecções associadas a cateter (CDC, 2011).

A prevalência desses germes com resistência às drogas, principalmente em hospitais, devido a pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos de largo espectro, à falta de conduta terapêutica que vise o uso de um antibiótico com espectro de ação direcionado somente contra o agente etiológico e o uso profilático indevido de antibióticos, seleciona micro-organismos resistentes, aumentando não apenas o risco de infecção, mas também sua gravidade e a dificuldade de seu tratamento (Koneman et al, 1997, Krediet et al 2004).

A resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. é facilmente adquirida, já que elevada transmissibilidade de plasmídios entre as linhagens no âmbito hospitalar e o uso abusivo de drogas antimicrobianas têm-se constituído em importantes fatores à transferência de genes de resistência e à seleção de amostras multi-resistentes (McDonnell et al, 1983; Schaberg et al, 1991, Barrosa et al 2012).

No Brasil, a resistência à oxacilina pode estar presente em mais de 80% das amostras isoladas em algumas instituições (Sader et al, 2001, Pereira et al 2013). A detecção de resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. é importante para guiar a terapia e prevenir que o paciente seja desnecessariamente tratado com vancomicina, um antimicrobiano que apresenta complicações terapêuticas e pode levar à seleção de amostras resistentes (Marshall et al, 1998).

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. é mediada pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) suplementar (PBP 2' ou PBP 2a), que apresenta baixa afinidade às penicilinas semi-sintéticas, sendo o determinante genético desta proteína de natureza cromossômica, o gene *mecA*. O gene *mecA* é idêntico em todas as linhagens de *Staphylococcus* e portanto é um marcador molecular útil de resistência à oxacilina (Chambers et al, 1985; Archer e Miemeyer, 1994). Esse gene é carregado em um elemento genético móvel específico identificado como Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome*, SCC*mec*). O elemento SCC*mec* contém o complexo gênico *mec* (o gene *mecA* e seus reguladores) e o complexo gênico *ccr*, que codifica recombinases sítio-específicas responsáveis pela mobilidade do SCC*mec* (Katayama et al, 2000).

Os tipos de SCC*mec* I, II e III são presentes predominantemente nos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina em ambiente hospitalar, enquanto os tipos IV e V são encontrados na comunidade. O SCC*mec* tipo IV é pequeno em tamanho (20.9-24.3 kb) e não possui genes de resistência aos vários antibióticos não-beta-lactâmicos, daí a sua sensibilidade a esses agentes (Lopes, 2005). Já o SCC*mec* tipo III codifica o maior número de genes de resistência sendo um importante patógeno em hospitais, causando sérias infecções (Ito et al, 1999). A tipagem genética do SCC*mec* apresentara forte evidência para as origens independentes dos MRSA adquiridos em hospitais e MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA) (Naimi et al, 2003).

A terapia antimicrobiana é guiada pelos resultados obtidos a partir de testes antimicrobianos convencionais de bactérias em fase planctônica. No entanto, isso pode não refletir, necessariamente, a suscetibilidade dessas bactérias quando estão em biofilmes (Donlan, 2000; Rose & Poppens, 2009).

Bactérias liberadas dos biofilmes mantém as características de suscetibilidade a antibióticos de bactérias livres ao invés de associadas aos biofilmes, o que implica que o

mecanismo de resistência não é a mudança genética, indicando a importância dos testes de determinação de susceptibilidade aos antimicrobianos no biofilme. Uma série de fatores têm sido postulados para explicar a maior resistência no biofilme, incluindo a ligação de antibióticos com o biofilme, a pobre penetração do antibiótico, o crescimento lento dos micro-organismos, a alta densidade de bactérias, e as alterações na expressão gênica em bactérias no biofilme (Stewart e Costerton, 2001).

A capacidade de aderir, colonizar e infectar superfícies poliméricas e a consequente formação do biofilme é considerada o principal fator de virulência dos ECN, principalmente do *S. epidermidis*, a espécie mais frequentemente isolada, e tem sido foco de intensos estudos nos últimos anos (Goldmann et al, 1993, Piette e Verschraegen 2009). O biofilme protege os ECN da ação de antibióticos, administrados para tratar as infecções, e também do sistema imune do paciente, sendo muitas vezes necessário a remoção do corpo estranho para obter a cura (Klingenberg et al, 2005).

As bactérias associadas ao biofilme são de 100 a 1.000 vezes menos suscetíveis aos antibióticos do que as bactérias em fase planctônica (Donlan, 2000) e, agentes ativos contra essas, mas não contra biofilmes, não conseguem curar pacientes com próteses ou cateteres infectados (Stewart e Costerton, 2001). A consequência dessa resistência é muitas vezes a necessidade de cirurgia para implante e substituição dos dispositivos, além de antibioticoterapia, aumentando substancialmente o custo do tratamento e debilidade atribuível à infecção (Waldvogel e Bisno, 2000). O biofilme de *Staphylococcus* spp. consiste de camadas de células agrupadas e embutidas em uma matriz de polissacarídeo denominado *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) (Mack et al, 1999).

A produção do PIA é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura operon. Este operon contém os genes *icaADBC*, mais o *icaR*, que tem a função regulatória e é transcrito no sentido oposto. Assim que ocorre a

ativação deste operon, são codificadas quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são IcaA, IcaD, IcaB e IcaC (Morales et al, 2004).

A adesão de ECN em cateter plástico ocorre muito rapidamente. Dentro de minutos da imersão de um cateter em um caldo de cultura de estafilococos, podem ser visualizados micro-organismos agarrados à superfície do cateter por microscopia eletrônica (Franson et al, 1984).

A genotipagem de isolados ao nível de cepas tem sido cada vez mais importante, a fim de verificar se os organismos envolvidos em surtos hospitalares ou em eventos de transmissão cruzada possuem possível relação clonal (Sloos et al, 2000, Rodríguez-Noriega et al, 2010).

A ferramenta de tipagem molecular mais comum é a técnica de PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis) (Cookson et al, 1996). A eletroforese em gel de campo Pulsado é um método molecular bem documentado utilizado para a análise epidemiológica relacionada a bactérias responsáveis por infecções hospitalares, sendo defendida como padrão ouro na tipagem de *S. aureus* (Sloos et al, 2000, David et al 2013). Instituições públicas de saúde de vários países, como Austrália, Dinamarca, Holanda, Canadá e Reino Unido, têm monitorado cepas de MRSA ao longo dos anos. Nos Estados Unidos, o CDC, juntamente com departamentos de saúde estaduais, criaram uma base de dados nacionais de perfis de *S. aureus* para controlar a disseminação desses micro-organismos (McDougal et al, 2003).

Uma grande vantagem do PFGE, ao contrário dos géis convencionais, é a possibilidade de estudar os fragmentos de DNA de grande porte, de até um milhão de pares de bases em comprimento. O cromossomo bacteriano inteiro é objeto de análise, dando poder ao método para discriminar claramente as linhagens independentes e para demonstrar a relação entre isolados geneticamente relacionados com alta reprodutibilidade (Sloos et al, 2000).

Baseado nos aspectos acima descritos, e tendo em vista que na cultura semiquantitativa determina-se a presença de micro-organismos na superfície externa do cateter e na cultura quantitativa além da superfície externa isolam-se também micro-organismos presentes no seu

lúmen, esse trabalho teve como objetivo principal estudar comparativamente a técnica semiquantitativa e a técnica quantitativa no diagnóstico das infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter em recém-nascidos da UTI neonatal do HC da FMB, a densidade de incidência de ICSRC e a determinação dos fatores de risco para a ocorrência dessas infecções.

Referências bibliográficas

Archer G, Niemeyer DM: Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends in Microbiol.*, 1994;2:343-347.

Barrosa EM, Ceottob H, Bastosb MCF, Santos KRN, Giambiagi-deMarval M: *Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes. *J. Clin. Microbiol* 2012;50:166-168

Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M: Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch InternMed* 1987;147(5):873–7.

CDC National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990–May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* 1999;27:520–32

CDC O’Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al: CDC Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *MMWR Recomm Rep* 2011;51:1–29.

Chambers HF, Hartman BJ, Tomasz A: Increased amounts of a novel penicillin binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J. Clin. Invest.* 1985;76:325–331

Cookson BD, Aparicio P, Deplano A, Struelens M, Goering R, Marples R: Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 1996;44:179–184.

Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS: Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *J. Pediatr.* 2002;78:279-288.

David MZ, Taylorb A, Lynfieldc R: Comparing Pulsed-Field Gel Electrophoresis with Multilocus Sequence Typing, spa Typing, Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Typing, and PCR for Panton-Valentine Leukocidin, arcA, and opp3 in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolates at a U.S. Medical Center. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51(3):814-819

Donlan RM: Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J.* 2000;46(6):S47-52.

Franson TR, Sheeth NK, Rose HD, Sohnle PG: Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20:500-505.

Goldmann DA, Pier GB: Pathogenesis of infections related to intravascular catheterization. *Clin. Microbiol. Rev* 1993;6:176-192.

Healy CM, Baker CJ, Palazzi DL, Campbell JR, Edwards MS: Distinguishing true coagulase-negative Staphylococcus infections from contaminants in the neonatal intensive care unit *Journal of Perinatology* 2013;33:52–58

Hocevar SN, Edwards JR, Horan TC, Morrell GC, Iwamoto M, Lessa FC: Device-associated infections among neonatal intensive care unit patients: incidence and associated pathogens reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33(12):1200-6

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43:1449-14.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K: A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000;44:1549–1555.

Klingenberg C, Aarag E, Ronnestad A, Sollid JE, Abrahamsen MD, Kjeldsen G, Flaegstad T: Coagulase-Negative Staphylococcal Sepsis em Neonates – Association Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation and the Host Inflammatoty Response. *The Ped Infec Dis* 2005;24:817-22.

Koneman EW, et al; *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997.

Krediet TG, Mascini EM, van Rooij E, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):992–995

Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Ver. Panam. Infectol.* 2005;7(3):34-36.

Maki D, Goldman D, Rhame F. Infection control in intravenous therapy. *Ann Intern Med* 1973;79(6):867–87.

Mack D, Riedewald J, Rohde H, Magnus T, Feucht HH, Elsner HÁ, Laufs R, Rupp ME: Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect and Immun* 1999;67:1004-08.

Maki DG, Weise CE, Sarafin HW: A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977;296:1305–09.

Otto M: *Staphylococcus epidermidis*—the ‘accidental’ pathogen. *Nature reviews* 2009;7:555-567

Marshal SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN: *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1998;30:205-214.

Mcdonnell RW, Sweeney HM, Cohen S: Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1983;23:151-60.

McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC: Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the

United States: Establishing a National Database. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:5113-5120.

Morales M, Mendez-Alvarez S, Martin-Lopes JV, Marreiro C, Freytes CO: Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. *Support Care Cancer* 2004;12:701-07.

Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et al. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA* 2003;290:2976–2984.

National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 to June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004;32:470-85

Pereira CAP, Marra AR, Camargo LFA, et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Pediatric Patients: Microbiology, Epidemiology, and Clinical Features. *PlosOne* 2013;8:1-6

Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos R, Costa MLM, Frota ACC, et al. Healthcare-associated infections among neonates in neonatal units in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:772-777.

Verschraegen PAG: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease *Veterinary Microbiology*, 2009;134:45–54

Pittet D, Tarara D, Wenzel RP: Nosocomial bloodstream infections in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 1994;271:1598–1601.

Rodríguez-Noriega E, Seas C, Guzmán-Blanco M, Mejía C, et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010;14(7):560–e56

Rose WE and Peter T: Poppens Impact of biofilm on the in vitro activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63(3):485-488.

Rosenthal VD, Gusman S, Migone O, Crnich CJ: The attributable cost, length of hospital stay, and mortality of central line-associated bloodstream infection in intensive care departments in Argentina: A prospective, matched analysis. *Am J Infect Control* 2003; 31:475-8080

Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zocolli C, Barth AL, Jones RN: Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001;5:200-214

Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP: Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *The American Journal of Medicine* 1991;91:S72–S75

Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPD: Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbiol* 2000;38:2488-2493.

Snydman D, Murray S, Kornfeld S, Majka J, Ellis C: Total parenteral nutrition-related infections. Prospective epidemiologic study using semiquantitative methods. *Am J Med* 1982;73(5):695–9.

Sohn AH, Garrett DO, Sinkowitz-Cochran RL, et al. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *The Journal of Pediatrics* 2001;139:821-827

Stewart PS, Costerton JW: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms *The Lancet*, 2001;358:135–138

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002;110:285–291

Waldvogel FA, Bisno AL: *Infections associated with indwelling medical devices* 2000, 3ed ASM Press, Washington, D.C.

Worthington T, Elliott TS: Diagnosis of central venous catheter related infection in adult patients. *J Infect* 2005;51:267–280.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os métodos de cultura semiquantitativa e quantitativa no diagnóstico de Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateteres (ICSRC), a densidade de incidência de ICSRC em RN internados em UTIN do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e a determinação dos fatores de risco para a ocorrência dessas infecções.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar pontas de cateteres provenientes de recém-nascidos pela técnica semiquantitativa;
- Cultivar pontas de cateteres provenientes de recém-nascidos pela técnica quantitativa;
- Calcular a densidade de incidência de ICSRC;
- Comparar o método de cultura semiquantitativa e quantitativa no diagnóstico de infecção da corrente sanguínea relacionada a cateteres (ICSRC);
- Detectar o gene *mecA* nas amostras de *Staphylococcus* isoladas;
- Classificar os tipos de *SCCmec* em *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina;
- Detecção dos genes para produção de biofilme *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* pela técnica de PCR;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da oxacilina e vancomicina para células planctônicas de *Staphylococcus* spp.;
- Determinar a Concentração Bactericida para o Biofilme (BBC) da oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus* spp. em biofilme;
- Verificar a similaridade molecular dos micro-organismos isolados de cateteres e hemoculturas pela técnica de PFGE

Artigo I

O artigo foi escrito de acordo com as normas de publicação da revista científica *Infection Control and Hospital Epidemiology*:

Incidência e Fatores de Risco de Infecções da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateteres em Unidade Neonatal de um Hospital Universitário Brasileiro.

Danilo F. M. Riboli¹, João C. Lyra², Katheryne B. Martins¹, Adilson Oliveira¹, Maria R. Bentlin², José E. Corrente³, Ligia M.S.S. Rugolo², Maria de Lourdes R. S. Cunha¹

1. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.
2. Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.
3. Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente:

Danilo Flávio Moraes Riboli.

Instituto de Biociências de Botucatu, s/n, Rubião Júnior. Botucatu – SP. Brasil

CEP: 18609-490

danilo.riboli@ibb.unesp.br

Telefone: 55(14)3880-0440

Título abreviado: Infecções Relacionadas a Cateter em UTIN

Total de palavras: 8249

Resumo

Objetivos: Esse estudo objetivou determinar a densidade de incidência de ICSRC em pacientes internados em UTIN e fatores de risco. **Metodologia:** Foram analisadas pontas de cateter de pacientes da UTI neonatal. Foi feita a detecção, nas amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas, dos genes *mecA*, do *SCCmec* e dos genes para produção de biofilme *icaABCD*. Foi calculada a CIM para Oxacilina e Vancomicina e, para os *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme, foi calculada a CBB. **Resultados:** Foram analisadas 584 pontas de cateter de 399 pacientes de Novembro de 2005 a Junho de 2012 sendo confirmados 29 casos de ICSRC. Os *S. epidermidis* foram os micro-organismos mais isolados (79,6%). As taxas de incidência variaram de acordo com a faixa de peso do RN. A resistência à Oxacilina foi encontrada em 90,9% dos ECN isolados dos casos de ICSRC, o *SCCmec* tipo III foi encontrado em 55,0%, o *operon icaABCD* em 59,0%. A CIM dos ECN para Oxacilina foi $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$ para todos os isolados com exceção de um e para Vancomicina $\leq 4\mu\text{g/mL}$ para todos. A produção de biofilme foi verificada em 46,1% dos isolados de ICSRC. Os produtores de biofilme apresentaram CBB $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ para Oxacilina e $\geq 256\mu\text{g/mL}$ para Vancomicina. **Conclusão:** A densidade de incidência de infecção relacionada ao cateter foi inferior às taxas de incidência de ICSAC. A resistência à oxacilina em ECN e a utilização de cateter umbilical se mostraram fator de risco na aquisição de ICSRC. Altas concentrações de oxacilina e vancomicina não foram capazes de matar todos os micro-organismos quando em biofilme.

Palavras-chave: infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter, fatores de risco, *Staphylococcus* spp.

Abstract

Objectives: The objective of this study was to evaluate the incidence density of catheter-related bloodstream infections (CR-BSIs) in newborns hospitalized in the Neonatal Intensive Care Unit of the University Hospital, Botucatu School of Medicine (FMB), and to identify risk factors for these infections. **Methods:** Microorganisms were isolated from catheter tips and blood cultures of newborns over a period of 6 years for similarity analysis of the isolates and calculation of the incidence density of CR-BSIs. *Staphylococcus* spp. isolates were investigated for the presence of the *mecA* gene, SCC*mec* typing, biofilm production, minimum inhibitory concentration (MIC) and biofilm bactericidal concentration (BBC) for oxacillin and vancomycin, and determination of risk factors for CR-BSIs. **Results:** A total of 584 catheter tips collected from 399 patients were analyzed and 29 cases of CR-BSI were confirmed. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) were the most frequently isolated microorganisms (75.9%). The incidence density of CR-BSIs varied according to newborn weight. Oxacillin resistance was observed in 90.9% of CoNS isolated from cases of CR-BSI. SCC*mec* type III was detected in 55% of the isolates and the *ica*ABCD operon in 59%. The oxacillin MIC was ≥ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for most CoNS isolates and the vancomycin MIC was ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$. Biofilm-producing CoNS exhibited BBCs $\geq 1,024$ $\mu\text{g/mL}$ for oxacillin and ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ for vancomycin. **Conclusion:** The incidence density of CR-BSIs was lower than the incidence of catheter-associated bloodstream infections. Oxacillin resistance of CoNS and the use of an umbilical catheter were risk factors for the acquisition of CR-BSI. High concentrations of oxacillin and vancomycin were unable to eliminate CoNS in the biofilm.

Key-words: catheter-related bloodstream infections, risk factors, *Staphylococcus* spp.

Introdução

Cateteres venosos centrais (CVC) são amplamente utilizados em Unidades de Tratamento Intensivo Neonatais (UTIN), fornecendo acesso para administração de fluidos e medicamentos, porém, podem representar um importante risco de complicação infecciosa.¹

De acordo com as novas diretrizes de vigilância epidemiológica dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças e Rede Nacional de Segurança na Assistência à Saúde dos Estados (CDC- National Healthcare Safety Network - NHSN) as infecções da corrente sanguínea são consideradas associadas ao cateter (ICSAC), se o CVC estiver presente no momento do diagnóstico ou 48 horas após sua remoção, enquanto as infecções da corrente sanguínea relacionadas a CVC (ICSRC) requer testes laboratoriais específicos para isolar e identificar os micro-organismos presentes nos cateteres e nas hemoculturas, sendo firmado o diagnóstico quando a mesma linhagem do micro-organismo é encontrada na ponta de cateter e na hemocultura periférica.²

Definições mais simples baseadas somente nos dados de ICSAC são utilizadas para o propósito de vigilância para determinação da incidência dessas infecções. Segundo dados do NHSN dos Estados Unidos, a incidência de ICSAC em Unidade Neonatal foi de 6,4/1000 CVC-dia nos RN < 750g; 4,4/1000 CVC-dia nos < 1000g; 4,8/1000 CVC-dia nos de 1001-1500g; 4,2/1000 CVC-dia nos 1501-2500g e 3,1/1000 CVC-dia nos >2500g.³ Estudo realizado em sete UTIN do Brasil revelou incidência de ICSAC de 34,91/1000 CVC-dia em RN < 1000g; 20,4/1000 CVC-dia nos de 1001-1500g; 17,3 nos 1501-2500g e 18,1/1000 CVC-dia nos >2500g (Pessoa-Silva et al. 2004).⁴

A incidência de ICSAC varia conforme o peso de nascimento do recém-nascido (RN), sendo inversamente proporcionais. Entretanto, desde que as infecções da corrente sanguínea podem ser secundárias a outras fontes que não o cateter e que podem não ser facilmente

reconhecidas, a vigilância a partir somente de dados de ICSAC pode superestimar essa taxa,² sendo importante o diagnóstico de ICSRC para a determinação da incidência mais precisa desse tipo de infecção.

Os agentes etiológicos mais comuns nas ICSRC na neonatologia são os Estafilococos coagulase-negativa (ECN), seguido dos bacilos Gram-negativos e leveduras.^{2,5} Dentre os ECN, *S. epidermidis* é o mais relacionado à formação de biofilme e a espécie mais frequente causadora de ICSRC em RN.^{6,7} Os isolados hospitalares de ECN também geralmente possuem o gene *mecA* conferindo a resistência à oxacilina e outros antibióticos β -lactâmicos. Além disso, muitas dessas cepas são resistentes a uma variedade de outras classes de antibióticos.⁸ Entretanto, sabe-se que ECN é também o principal agente relacionado à colonização de cateteres e contaminação de hemoculturas, sendo importante determinar os fatores de risco na ocorrência de ICSRC para auxiliar no diagnóstico diferencial de colonização e infecção.

Entre os fatores de risco para infecções causadas por ECN em unidades neonatais tem sido relatadas a prematuridade e o extremo baixo peso. Em um estudo prospectivo, Healy et al (2013) encontraram que os fatores determinantes de sepse por ECN foram a idade gestacional inferior a 34 semanas e peso ao nascimento menor que 2000g, características encontradas em 98% dos casos comprovados de sepse. Recém-nascidos com baixo peso também foram mais suscetíveis a reincidência de sepse por ECN.⁹

Bactérias que formam biofilme em cateteres são sabidamente mais difíceis de erradicar e estima-se que a produção de biofilme esta associada a 65% das infecções nosocomiais. Neonatos com cateteres frequentemente apresentam recidivas após tratamento, provavelmente devido a produção de biofilme que protege esses micro-organismos da ação dos antimicrobianos.¹⁰ No biofilme, as bactérias são mais resistentes aos antibióticos quando comparadas em sua fase planctônica¹¹ podendo ser de 100 a 1.000 vezes menos suscetíveis aos antibióticos.¹²

Baseado no exposto acima esse estudo objetivou determinar a densidade de incidência de ICSRC em RN internados em UTIN de um Hospital Universitário Brasileiro, os fatores de risco para a ocorrência dessas infecções, bem como a detecção da presença do gene *mecA*, produção de biofilme e determinação da resistência à oxacilina e a vancomicina em amostras de ECN planctônicas e em biofilme.

Materiais e métodos

Amostras

Os micro-organismos estudados foram isolados de pontas de cateteres e de hemoculturas de RNs internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) no período de Novembro de 2005 à Junho de 2012. As amostras referentes ao período de 2005 a fevereiro de 2011 já haviam sido isoladas e estavam mantidas em freezer a -70°C .

Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo todas as pontas de cateteres com crescimento em pelo menos uma das técnicas utilizadas e com pelo menos uma hemocultura periférica dos RNs coletada sete dias antes ou sete dias depois da remoção do cateter.

Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pontas de cateteres isoladas de recém-nascidos cujos registros de dados clínicos e laboratoriais não foram encontrados referentes a um período de uma semana anterior e uma semana posterior à data de remoção do dispositivo.

Definições

A nomenclatura Infecção da Corrente Sanguínea Associada ao CVC (Cateter Central de Inserção Periférica - PICC, umbilical, e outros) foi utilizada se os mesmos estiverem presentes no momento do diagnóstico da infecção ou até 48 horas após a sua remoção².

A Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateteres (ICSRC) foi confirmada quando os critérios de inclusão acima descritos foram respeitados e houve a identificação do mesmo micro-organismo, mesma espécie e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos micro-organismos isolados da hemocultura periférica e da ponta do CVC pela técnica semiquantitativa de Maki et al. (1977)¹³ e/ou pela técnica quantitativa de Brun-Buisson et al. (1987),¹⁴ além de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: instabilidade térmica, bradicardia, apnéia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica e/ou hipoatividade/letargia, sem outra causa não infecciosa reconhecida e sem relação com infecção em outro local.⁵

Cultura da ponta de cateter

As culturas de pontas de cateteres foram realizadas pelo método semiquantitativo proposto por Maki et al. (1977) e quantitativo segundo Brun-Bruisson et al. (1987). Os cateteres foram removidos assepticamente pela equipe médica do hospital e foram coletadas duas pontas de

aproximadamente 5 cm, colocadas em tubo seco estéril e transportadas imediatamente para o laboratório para serem processadas. Na técnica semiquantitativa os seguimentos distais foram rolados na superfície da placa de ágar sangue e incubados a 37°C por 72 horas. As placas foram examinadas diariamente e as colônias foram contadas assim que detectado o crescimento, com o resultado expresso em UFC. As pontas de cateteres proximais foram cultivadas pelo método quantitativo, passando-se 1mL de água destilada estéril pelo lúmen do cateter, agitando por um minuto em vórtex e espalhando em seguida 0,1 mL na superfície da placa de ágar sangue com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, examinadas diariamente e as colônias foram contadas assim que detectado o crescimento, com o resultado expresso em UFC.^{13,14}

Hemocultura

As hemoculturas foram colhidas e cultivadas pelo sistema automatizado Bactec, conforme as normas descritas por Koneman et al. (1997).¹⁵

Identificação dos micro-organismos

Depois de constatado crescimento em placa de ágar sangue, os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específica. Os micro-organismos foram identificados conforme preconizado por Koneman et al. (1997).¹⁵

Identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*

Para essa identificação, foram utilizados os critérios propostos por Cunha et al. (2004)¹⁶, conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol,

maltose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e sensibilidade à novobiocina.

Teste de Sensibilidade às drogas antimicrobianas

O teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (2011).¹⁷ Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI dos micro-organismos isolados das pontas de cateteres e hemoculturas, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de McFarland. Os discos utilizados foram: Penicilina (10µg), Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Eritromicina (15µg), Cefalotina (30µg), Gentamicina (30µg) e Rifampicina (30µg). Após a incubação a 35°C por 24 horas os halos de inibição serão medidos (mm) e os resultados obtidos foram comparados entre os germes isolados do mesmo RN (cateter e hemocultura) para verificar a similaridade entre as amostras. Para o perfil de sensibilidade das leveduras foram utilizados Anfotericina B (100µg) e Fluconazol (25µg).

Densidade de Incidência de ICSAC e ICSRC

A densidade de incidência de ICSAC foi gentilmente cedida pela Comissão de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (CCIRAS) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), obtidas de acordo com a rotina estabelecida por essa comissão, sendo que até 2010 esse indicador era estratificado por peso ao nascimento do RN em < 1000g; 1001g a 1500g; 1501 a 2500g; > 2501g. A partir de 2010 houve alteração dos profissionais constituintes dessa comissão e o indicador passou a ser estratificado em RN pesando <750g; 751 a 1000g; 1001 a 1500g; 1501 a 2500g e > 2501g.

A densidade de incidência de ICSRC foi calculada utilizando como numerador o número de casos novos de ICSRC determinados nesse estudo e como denominador o número de RN-dia com cateter central-dia no período multiplicado por 1000, e a incidência estratificada por peso do RN em < 1000g; 1001g a 1500g; 1501 a 2500g; > 2501g. Embora o NHSN preconize a estratificação também em <750g e de 751 a 1000g,³ esta não foi realizada para o cálculo de ICSRC pois os dados antes de 2010 obtidos da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar referentes ao número de RN-dia com cateter central-dia iniciavam a estratificação a partir do peso <1000g.

Análise genotípica das amostras de *Staphylococcus* spp.

Extração do ácido nucleico

O ácido nucleico total foi extraído a partir de amostras de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 h.

A extração foi realizada com o Kit Illustra (GE Healthcare) que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/ml) e proteinase K (20 mg/ml). A seguir 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 5.000 x g por 1 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração serão adicionados novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida à centrifugação a 14.000 x rpm por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 ml e 200 µl de água Milli Q aquecida a 70°C foi utilizada para a eluição. As amostras foram centrifugadas a

5000 x g por 1 minuto, e a coluna de GFX desprezada. O DNA extraído foi guardado sob refrigeração a 4°C.

Amplificação do ácido nucleico (PCR) para detecção do gene *mecA* de Resistência à Oxacilina em amostras de *Staphylococcus* spp.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10pmol de cada primer (Tabela 1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) que consistem de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos primers a 55,5 °C por trinta segundos e extensão a 72 °C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por cinco minutos antes de resfriar à 4 °C.¹⁸ Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Tabela 1: Oligonucleotídeos para a detecção do gene *mecA*

Função	Nome	Sequência de nucleotídeos 5'a 3'	Produto amplificado
Primer	<i>mecA1</i>	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG	533 bp
Primer	<i>mecA2</i>	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG	533 bp

Fonte: Murakami et al. (1991)

Determinação do SCC*mec*

A determinação do tipo de SCC*mec* foi realizada utilizando o método de PCR-Multiplex conforme descrito por Milheiriço et al (2007), com os primers descritos na Tabela 2.^{19,7} As reações de PCR multiplex foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml em volumes totais de 50 µl contendo 5µl de DNA; PCR Buffer 1x contendo 1,5mM de MgCl₂; 40µM de cada desoxiribonucleotídeos trifosfatados; 0,2µM dos primers kdp F1 e kdp R1; 0,4µM dos primers CIF2 F2, CIF2 R2, RIF5 F10, RIF5 R13, SCC*mec* III J1F, SCC*mec* III J1R, SCC*mec* V J1 F e SCC*mec* V J1 R; 0,8 µM dos primers mecI P2, mecI P2, dcs F2, dcs R1, *mecA* P4, *mecA* P7, ccrB2 F2, ccrB2 R2, ccrC F2 e ccrC R2; e 1,25 U de Taq polimerase. A incubação em termociclador consistiu de um ciclo de 94°C por 4 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos primers a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 30 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por 4 minutos²³. A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% e corado com Syber safe.

Tabela 2. Primers utilizados na técnica de PCR multiplex para caracterização do SCCmec em *Staphylococcus* spp.

Primer	Sequencia do Primer 5' -> 3'	Pares de base (pb)
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495
CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495
ccrC F2	GTACTCGTTACAATGTTTGG	449
ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC	449
RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414
RIF5 R13	ATGGAGATGAATTACAAGGG	414
SCCmec V J1 F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	377
SCCmec V J1 R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG	377
dcs F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342
dcs R1	CTAAATCATAGCCATGACCG	342
ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	311
ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC	311
kdp F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284
kdp R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284
SCCmec III J1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	243
SCCmec III J1 R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC	243
mecl P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	209
mecl P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209
mecA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162
mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	162

Fonte: Milheiro et al (2007); Oliveira et al (2019).

Detecção dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD* específicos para produção de biofilme

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrifuga de 0,5 ml em volumes totais de 25 µl contendo 10 pmol de cada oligonucleotideo (Tabela 3), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 gM de desoxiribonucleotideos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3gL de ácido nucleico. A incubação foi realizada em termociclador tipo MJ Research, empregando os parâmetros descritos por Arciola et al. (2005) que consistem de: 94°C por cinco minutos para o primeiro ciclo, seguido por 50 ciclos de desnaturação à 94°C por trinta segundos, anelamento dos oligonucleotídeos à 55,5°C por trinta segundos e extensão à 72°C por trinta segundos. Após completar os 50 ciclos, os tubos foram incubados à 72°C por um minuto

antes de resfriar à 4°C.²⁰ Em todas as reações realizadas, foram utilizadas linhagens de referência internacional com o controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme) e o controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a detecção dos genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*.

Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeos 5' a 3'	Produto amplificado (pb)
<i>icaA1</i>	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA	103
<i>icaA2</i>	GGA AAT GCC ATA ATG AGA AC	
<i>icaC1</i>	TAA CTT TAG GCG CAT ATG TTT	400
<i>icaC2</i>	TTC CAG TTA GGC TGG TAT TG	
<i>icaD1</i>	ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG	198
<i>icaD2</i>	CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA	

Fonte: Arcíola et al. (2005)

Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 2% preparado em tampão 0,5 X TBE e corado com Sybr safe. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100 bp e posteriormente fotografados sob transiluminação UV.

Pesquisa da produção de biofilme pelo método de aderência em placa de Poliestireno (Christensen et al. 1985) modificado

O método da pesquisa da produção de biofilme em placas de cultura proposto por Christensen et al. (1985) foi utilizado com algumas modificações. Este método apresenta bases

espectofotométricas, baseando-se na leitura da densidade óptica (DO) do material aderente produzido pela bactéria.²¹

Foram utilizadas culturas em TSB, incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas a 1:1 com TSB, preparado com 2% de glicose. Foram utilizadas placas previamente esterilizadas de 96 cavidades com fundo plano (Costar, modelo 3599 fabricado pela Corning Incorporated). Os poços foram preenchidos em quaduplicata com 200µl da cultura diluída, utilizando pipeta multicanal. Em todas as placas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo *S. epidermidis* ATCC 35984 (produtora de biofilme), controle negativo *S. epidermidis* ATCC 12228 e TSB estéril. As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C e posteriormente o conteúdo de cada poço foi aspirado cuidadosamente utilizando-se pipeta multicanal, e então, lavados quatro vezes com 200µl de tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2. A secagem da placa foi realizada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, os poços foram corados com cristal violeta a 2% por um minuto, em seguida, o volume foi aspirado e o excesso de corante retirado através de uma lavagem das placas com água destilada utilizando-se de pipeta multicanal. A seguir, foi feita a secagem das placas em temperatura ambiente por 1 hora e realizada a leitura da densidade óptica no leitor de Elisa, da marca Labsystem modelo Multiskan EX em filtro de 540nm. Os valores para leitura obtidos através do ponto de corte estão expressos na tabela 4.

Tabela 4: Valores para leitura obtidos através do ponto de corte

Resultados	Filtro 540nm
Não aderente	$\leq 0,111$
Fraco aderente	$> 0,111$ ou $\leq 0,222$
Forte aderente	$> 0,222$

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oxacilina e vancomicina pelo método de microdiluição em caldo em células plactônicas de *Staphylococcus* spp.

Para a técnica de microdiluição em caldo na determinação da CIM de vancomicina, foram utilizadas placas de microtitulação estéreis, utilizando o caldo Müeller-Hinton ajustado com cátions (Oxoid, 1 U.K.), conforme recomendado pelo CLSI (2011).¹⁷ Uma solução-estoque de oxacilina e vancomicina foi preparada em água destilada na concentração de 3200 µg/ml. Em placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas de vancomicina nas concentrações de uma escala logarítmica de 2, compreendendo os *breakpoints* 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 µg/ml e *breakpoints* para oxacilina de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, em caldo Müeller-Hinton, com um volume final de 100µL. As amostras foram isoladas e reisoladas e, então, uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) foi preparada e diluída em 1:312, e foram adicionados 100 µL em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 35°C e a leitura do MIC feita após 24 e 48 horas de incubação. Foram utilizados um controle positivo, contendo o caldo e a suspensão bacteriana, e um controle negativo contendo apenas o caldo Müeller-Hinton. Adicionalmente, para correta interpretação dos resultados, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, susceptível a vancomicina, foi utilizado como controle negativo e *E. faecalis* ATCC 51299, resistente a vancomicina, foi utilizada como controle positivo. O controle negativo para oxacilina utilizado foi o *S. aureus* ATCC 25923 e como controle positivo o *S. aureus* ATCC 33591.

A CIM foi considerada como a menor concentração de antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento do microrganismo, conforme detectado a olho nu: foram classificados com crescimento positivo os poços que apresentaram turvação e/ou presença de bactérias no fundo do poço. As amostras de ECN com MIC ≤ 4 µg/mL para vancomicina e

$\leq 0,25$ para oxacilina foram consideradas sensíveis; valores entre 8 e 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indicaram resistência intermediária para vancomicina e ≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indicaram resistência total para vancomicina e $\geq 0,5$ indicaram resistência à oxacilina.

Determinação da Concentração Bactericida (CBM) de oxacilina e vancomicina pelo método de microdiluição em caldo em biofilme de *Staphylococcus* spp.

As concentrações bactericidas para o biofilme (BBCs) foram determinadas, utilizando uma adaptação de um método de ensaio publicado anteriormente.²² Os isolados cultivados por 22 h em TSB adicionado de 2% de glicose foram ajustados para uma turbidez de 1,0 da Escala de McFarland (correspondendo a 1×10^8 a 2×10^8 UFC / ml) e diluído a 1:50 em TSB com glicose 2%. Aliquotas de 200 μl foram colocadas em placas de 96 poços de fundo plano (Nuclon Delta, Nunc, Dinamarca), cobertas com uma tampa de 96 pinos (Nunc-TSP; nunc), e incubadas por 24 h para permitir a formação de biofilme sobre os pinos. Para remover as células não-aderentes, os filmes formados nos pinos foram lavados por imersão em uma série de três placas de 96 poços preenchidos com 200 μL de tampão fosfato salina estéril. A tampa com os pinos foi colocada sobre em uma placa de fundo plano preparado para testes de suscetibilidade de microdiluição em caldo, os poços continham um volume de 200 μL de agente antimicrobiano diluído em CAMHB (Caldo Mueller Hinton suplementado com cátions, 100 mg/mL de Cálcio e 50 mg/mL de magnésio) ou 200 μL de CAMHB sem drogas para o controle de crescimento positivo. Os biofilmes foram submetidos a antimicrobianos durante a noite, e a tampa foi lavada três vezes em tampão fosfato, como descrito acima e colocado em 96 poços contendo 200 μL de TSB glicose 1%. As células do biofilme foram retiradas dos pinos por sonicação (Hielscher, ultrasonic technology, UIP250MTP) e colocadas em meio de recuperação²². A tampa com os pinos foi descartada e substituída com uma tampa normal, e a densidade óptica medida em um

leitor de placa em filtro de 600 nm. Foram utilizados poços contendo TSB glicose a 1% puro (sem inoculação) para controles de esterilidade espectrofotométrica. A placa foi incubada por 24 h, e uma segunda DO em 600 nm medida foi tomada. A BBC foi definida como a menor concentração da droga que apresentou uma alteração na DO a 600 nm entre 0 e 24 de 10% da leitura obtida para o controle de crescimento positivo.²³

Análise estatística

Os dados pessoais e clínicos dos RN foram submetidos à análise univariada e posteriormente foi utilizado modelo de regressão logística multivariada para determinar os fatores de risco para ocorrência de ICSRC com variáveis referentes ao RN como explanatórias (full-model). Para análise univariada foram utilizados X^2 ou exato de Fisher, quando necessário e considerando $p < 0,05$ como significativo. As densidades de incidências de ICSAC e ICSRC foram analisadas por Regressão de Poisson considerando a taxa de incidência como variável resposta em função dos anos (2006 a 2012).

Resultados

Amostras

Foram analisadas 584 pontas de cateteres de 399 RNs no período de novembro de 2005 a junho 2012 na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Das 584 pontas analisadas, 56 provenientes de 50 RNs foram incluídas neste estudo de acordo com o critério de inclusão. Dos 50 recém-nascidos, 29 foram classificados com ICSRC com o isolamento do mesmo micro-organismo (espécie e mesmo perfil de sensibilidade

aos antimicrobianos) nas culturas de cateter, hemocultura e diagnóstico de sepse de acordo com os critérios clínicos.

Os ECN foram os micro-organismos mais isolados das pontas de cateteres e hemoculturas. Dentre as espécies mais isoladas *S. epidermidis* foi prevalente, com 39 isolados (79,6%), seguido por *S. haemolyticus* com três (6,1%). Foram isoladas três (6,1%) de amostras de leveduras, duas amostras (4,1%) de *K. pneumoniae* e *S. aureus* e *E. coli* com um isolado cada (Tabela5).

Considerando-se apenas os casos em que foi isolado o mesmo micro-organismo (espécie e sensibilidade às drogas) do cateter e da hemocultura do paciente, foram isolados 19 *S. epidermidis*, três *S. haemolyticus*, duas *K. pneumoniae*, três leveduras, um *S. aureus* e uma *E. coli* totalizando 29 episódios de ICSRC (Tabela 5).

Tabela 5-Total de micro-organismos isolados das pontas de cateter e dos episódios de ICSRC

Micro-organismos	Total isolado		Total ICSRC	
	N	%	N	%
<i>S. epidermidis</i>	39	79,6	19	65,5
<i>S. haemolyticus</i>	3	6,1	3	10,3
Total (ECN)	42	85,7	22	75,8
<i>S.aureus</i>	1	2,0	1	3,4
Levedura	3	6,1	3	10,3
<i>K. pneumoniae</i>	2	4,1	2	6,9
<i>E. coli</i>	1	2,0	1	3,4
Total	49	100	29	100

Densidade de Incidência de ICSAC e ICSRC

A Tabela 6 apresenta os dados de densidade de incidência de ICSAC e ICSRC estratificados por peso ao nascimento.

Tabela 6-Densidade de incidência de ICSAC e ICSRC estratificados por peso.

Peso ao Nascimento do RN	Densidade de Incidência 1000 CVC-dia		
	gramas	ICSAC	ICSRC
< 1000		18,7	3,44
1001-1500		11,81	2,29
1501-2500		10,51	1,16
>2501		10,37	2,83

A análise por Regressão de Poisson considerando a taxa de incidência como variável resposta em função dos anos (2006 a 2012) é apresentada na Figura 1, revelando um aumento significativo na incidência de ICSAC ($p= 0,0211$) e ICSRC ($p= 0,0123$).

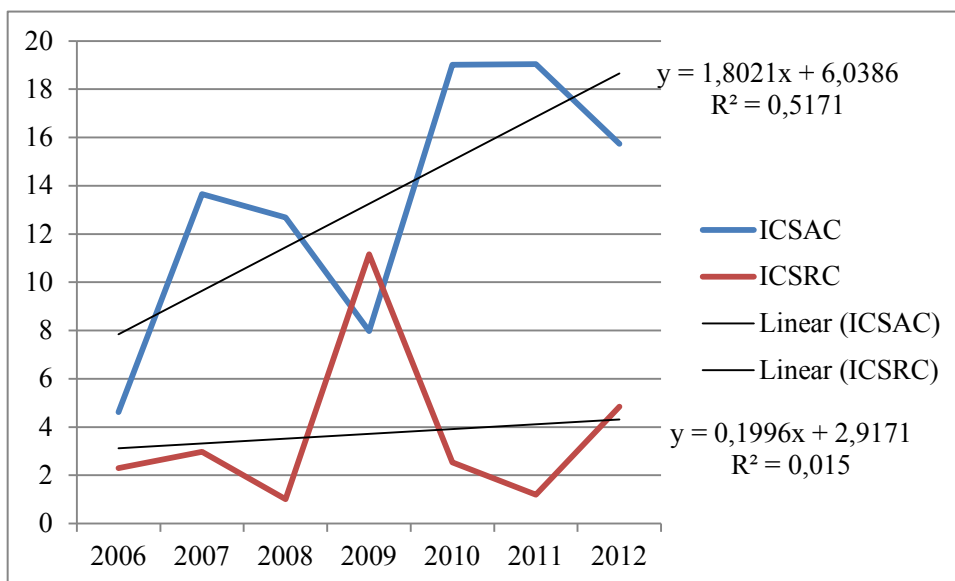


Figura 1-Regressão de Poisson considerando a taxa de incidência como variável resposta em função dos anos (2006 a 2012) na incidência de ICSAC e ICSRC.

Avaliação do Perfil de Resistência à oxacilina e vancomicina e detecção da produção de biofilme em amostras de *Staphylococcus* spp.

A resistência à oxacilina detectada pelo gene *mecA* foi observada em 39 dos 42 (92,8%) ECN isolados. O gene foi encontrado em 20 dos 22 (90,9%) ECN associados aos episódios de ICSRC, dos quais 17 (85,0%) eram *S. epidermidis* e três (15,0%) *S. haemolyticus*. A única amostra de *S. aureus* isolada não possuía o gene *mecA*.

A tipagem de Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (*SCCmec*) dos 39 ECN positivos para o gene *mecA* revelou a presença de sete *SCCmec* tipo I, três *SCCmec* tipo II, 24 *SCCmec* tipo III, dois *SCCmec* tipo IV e três não foram tipáveis. Nos 20 casos de ICSRC causados por ECN, cinco amostras foram *SCCmec* tipo I, três *SCCmec* tipo II, 11 *SCCmec* tipo III e um *SCCmec* tipo IV. Dos 17 *S. epidermidis* associados aos episódios de ICSRC e positivos para o gene *mecA*, 11 possuíam *SCCmec* tipo III, cinco tipo I e um *SCCmec* tipo IV; sendo que nos três *S. haemolyticus* isolados foi encontrado o *SCCmec* tipo II.

Dos 42 ECN isolados, 24 (57,1%) possuíam o operon completo (genes *icaABCD*) responsáveis pela produção de biofilme, nove possuíam os genes *icaCD*, três possuíam somente o *icaD*, um possuía os genes *icaBCD*, um os genes *icaAD*, um somente o *icaC*, um o *icaA* e dois não possuíam nenhum gene *ica*. Nos 22 casos de ECN associados a ICSRC 13(59,0%) dos isolados de *S. epidermidis* possuíam o operon completo e seis possuíam os genes *icaCD*, dos três *S. haemolyticus* isolados, um possuía somente o gene *icaC*, um somente o gene *icaD* e um possuía os genes *icaCD*.

A produção de biofilme em placa de poliestireno foi detectada em 26 (61,9%) dos ECN isolados, sendo 12 (46,1%) associados aos episódios de ICSRC e todos (100%) da espécie *S. epidermidis*. Não foi detectada produção de biofilme por *S. haemolyticus* e *S. aureus*.

Foi calculado a CIM para Oxacilina e Vancomicina das amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas, sendo observado apenas uma amostra de *S. epidermidis* com CIM $\leq 0,25\mu\text{g/mL}$ para oxacilina e as outras 41 amostras de ECN, incluindo os três *S. haemolyticus*, possuíam CIM $\geq 0,5\mu\text{g/mL}$. Todos os ECN isolados apresentaram CIM $\leq 4\mu\text{g/mL}$ para vancomicina. O único isolado de *S. aureus* apresentou CIM de $4\mu\text{g/mL}$ para oxacilina e $1\mu\text{g/mL}$ para a vancomicina.

A determinação da Concentração Bactericida para Biofilme (CBB) foi realizada para os 26 ECN produtores de biofilme. Foi constatado que em todos eles a CBB para oxacilina foi $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ e $\geq 256\mu\text{g/mL}$ para a vancomicina, revelando que todos esses isolados foram resistentes para esses antimicrobianos, permanecendo viáveis após exposição a altas concentrações de oxacilina e vancomicina quando em biofilme.

Análise dos fatores de risco dos recém-nascidos para ICSRC

Na tabela 7, pode-se analisar os dados clínicos dos recém-nascidos associados com ICSRC e os que não apresentaram infecção. Nota-se que a maioria dos RN eram prematuros, com menos de 1000g ao nascimento, com cateter de curta duração (<10 dias) e que faziam uso de nutrição parenteral e ventilação mecânica. A duração média de cateterização nesse estudo foi de 7,3 dias.

Tabela 7- Comparação dos dados clínicos dos recém-nascidos com ICSRC e os RN sem infecção.

		Total (21 RN)		ICSRC (29 RN)		p
		N	%	N	%	
Idade Gestacional	<31 semanas	8	38,1	18	62,1	0,3983
	31-36 semanas	5	23,8	5	17,2	
	>36 semanas	1	4,8	3	10,3	
	Sem dados	7	33,3	3	10,3	
Peso ao nascimento	<1000g	9	42,9	15	51,7	0,4969
	1000g-1499g	3	14,3	6	20,7	
	1500g-2499g	1	4,8	3	10,3	
	>2500g	8	38,1	5	17,2	
Duração da cateterização	Até 10 dias	10	47,6	17	58,6	0,1138
	Mais de 10 dias	2	9,5	3	10,3	
	Sem dados	9	42,9	9	31,0	
Tipo de cateter	Umbilical venoso	4	19,0	11	37,9	0,2597
	Umbilical arterial	5	23,8	4	13,8	
	PICC	13	61,9	13	44,8	
Nutrição Parenteral		18	85,7	22	75,9	0,6161
Ventilação Mecânica		17	81,0	21	72,4	0,7171
Óbito	Sim	3	14,3	9	31,0	0,1209
	Não	15	71,4	17	58,6	
	Sem dados	3	14,3	3	10,3	
Resistência Oxacilina	Sim	13	61,9	22	75,9	0,3118
	Não	3	14,3	5	17,2	
	Sem dados	5	23,8	2	6,9	
Sexo	Masculino	7	33,3	15	51,7	0,3796
	Feminino	9	42,9	11	37,9	
	Sem dados	5	23,8	3	10,3	

Após análise univariada dos dados clínicos referentes ao RN foi realizada análise multivariada de regressão logística para analisar os fatores de risco para ICSRC. Foram incluídos no modelo o tipo de cateter, a resistência à oxacilina, idade gestacional (IG), uso de nutrição

parenteral (NP), sexo do RN, uso de ventilação mecânica e a duração da cateterização. Os resultados revelaram o uso de cateter umbilical como fator de risco (OR 86,3; $p=0,0286$) quando comparado ao uso de PICC. Também foi encontrada como fator de risco a resistência à oxacilina em amostras de ECN (OR 43,1; $p=0,0379$) (Tabela 8).

Tabela 8- Modelo de regressão logística multivariada (full-model) para análise dos fatores de risco para ICSRC.

Fatores de Risco		Estimativa	Erro padrão	p-valor	OR (IC 95%)
Tipo de cateter	Umbilical				
	PICC	2,2290	1,0181	0,0286*	86,319 (1,59-999)
Resistência a Oxacilina	Resistente				
	Sensível	1,8824	0,9066	0,0379*	43,15 (1,23-999)
Idade Gestacional (Semanas)	<31	1,4497	1,4485	0,3169	3,624 (0,01-999)
	31-36				
	>36	1,6119	1,0011	0,1074	0,170 (0,002-999)
Nutrição Parenteral		2,4063	1,4155	0,0891	0,008 (0,001-2,088)
Sexo		0,6673	0,5722	0,2436	3,799 (0,403-35,79)
Ventilação Mecânica		0,3341	0,7318	0,6480	1,951 (0,111-34,352)
Duração (Dias)	Até 10				
	> 10	0,38813	0,2411	0,1138	1,464 (0,913-2,349)

*Estatisticamente significativa

Discussão

O uso de cateteres em UTI é frequente e as ICSRC ainda são a principal causa de infecções relacionadas à assistência à saúde em recém-nascidos. Nesse estudo, foram confirmados 29 casos de ICSRC considerando-se o isolamento do mesmo micro-organismo

(espécie e perfil de sensibilidade às drogas) nas pontas de cateteres e hemocultura do RN, sem nenhuma outra fonte de infecção e com dados clínicos compatíveis com sepse de acordo com os critérios adotados na Unidade Neonatal.⁵

A comparação dos dados de ICSAC obtidos pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) com os dados obtidos nesse estudo (ICSRC, confirmação microbiológica), revelou taxas de densidade de incidência bem distintas, porém as duas revelando um aumento significativo na incidência dessas infecções. A análise dos dados de ICSAC foram superiores aos relatados pelo NHSN dos Estados Unidos, porém inferiores aos relatados em estudo nacional realizado em sete UTIN no Brasil.^{3,4} Não foi possível comparar a taxas de ICSRC com dados do NHSN, pois essa nomenclatura não é mais utilizada pelo NHSN em razão da dificuldade dos laboratórios de realizar as culturas e portanto definições mais simples baseadas somente nos dados de ICSCA são utilizadas para o propósito de vigilância. Porém, a utilização desse critério, mais refinado, com confirmação microbiológica do agente isolado de cateter e da hemocultura para o cálculo da densidade de incidência é um marcador importante que ressalta a qualidade dos cuidados com o CVC adotados na Unidade e cabe à CCIH (CCIH) avaliar o benefício para sua instituição do uso desse critério.

Os micro-organismos mais isolados das pontas de cateter e os mais relacionados à ICSRC foram os ECN, sendo encontrados em 85,7% e 75,8%, respectivamente. As leveduras e *K. pneumoniae* foram responsáveis por dois (6,9%) casos ICSRC e somente um caso de infecção por *S. aureus*. Essa alta porcentagem de ECN, principalmente de *S. epidermidis*, já é esperada visto que é a espécie predominante na flora do recém-nascido. Esta predominância na colonização dos indivíduos e a maior patogenicidade de algumas cepas podem explicar o fato de o *S. epidermidis* ser a espécie mais comumente associada aos processos infecciosos em recém-nascidos.²⁴ Os *S. haemolyticus* foram responsáveis por três casos de ICSRC (13%) sendo a segunda espécie mais encontrada nesse e em outros estudos em UTIN.^{25,26.}

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. é causada pela expressão de PBP2a codificada pelo gene *mecA*. Esse gene está localizado em um elemento genético chamado cassete cromossômico estafilocócico (SCC*mec*). Há evidências de transferência horizontal de cassetes SCC*mec* entre espécies de *Staphylococcus* spp.²⁷ A resistência à oxacilina codificada pelo gene *mecA*, foi observada em 92,9% dos 42 ECN isolados. Nos casos de ICSRC em que foi encontrado o mesmo micro-organismo na ponta de cateter e na hemocultura do paciente (espécie e sensibilidade às drogas), o gene foi encontrado em 90,9% dos 22 ECN, incluindo os 17 *S.epidermidis* e todas as amostras de *S. haemolyticus* isoladas. Outros estudos indicam maiores taxas de resistência em *S. haemolyticus*, 76-96% de resistência a Oxacilina.^{28,29} O maior percentual de gene *mecA* em amostras de ECN comparadas com *S. aureus* também tem sido verificada em outros estudos realizados com amostras isoladas do mesmo hospital.³⁰ Krediet et al. (2004) encontraram, examinando isolados de ECN por um período de 11 anos, que a maioria das cepas causadoras de sepse eram devido a poucos clusters, sendo um deles responsável por mais de 30% das infecções. Também encontraram uma alta taxa de isolados que carregavam o gene *mecA* nos clusters mais comuns, variando de 70 a 92% ao longo dos anos podendo estar relacionado com a persistência de cepas de ECN responsáveis pelas sepses.³¹ A análise dos fatores de risco para ocorrência de ICSRC nesse estudo revelou a resistência à oxacilina como fator de risco para aquisição de ICSRC. O aumento no risco de infecções devido à resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. também tem sido encontrado em outros estudos, inclusive com aumento da mortalidade.^{32,33}

A maioria dos ECN isolados dos casos de ICSRC (64,7%) possuíam SCC*mec* tipo III. Nos três casos de ICSRC causados por *S. haemolyticus* foi detectada a presença do SCC*mec* tipo II. Dos casos de ICSRC, todos os micro-organismos possuíam SCC*mec* tipo I, II ou III presentes predominantemente nos isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina em ambiente hospitalar, enquanto os tipos IV e V são encontrados na comunidade.³⁴ O SCC*mec* tipo III

codifica o maior número de genes de resistência sendo o tipo mais frequente e importante em hospitais, causando sérias infecções.³⁵ Em estudos realizados em um hospital de Porto Alegre, foi descrita a distribuição do SCCmec em amostras de ECN resistentes à oxacilina isoladas de hemoculturas. O SCCmec tipo III foi o mais frequente. O segundo mais detectado foi o SCCmec tipo I. O SCCmec tipo IV foi encontrado somente em *S. epidermidis* e o tipo II em *S. haemolyticus*, resultados similares aos encontrados em nosso estudo.³⁶ Outros estudos no Brasil também têm encontrado uma prevalência de SCCmec tipo III em ECN isolados em UTI.^{37,38}

A maioria dos *Staphylococcus* spp. isolados (57,1%) e dos ECN isolados de ICSRC (59,0%) possuíam o *operon ica* completo. O *operon ica* é considerado um dos principais determinantes genéticos envolvidos na fase de acumulação durante a formação do biofilme, e sua detecção tem sido sugerida como ferramenta para discriminar cepas invasivas de cepas contaminantes em espécimes clínicas, já que a presença do *operon* foi mais comum em cepas de *S. epidermidis* associadas a doenças.³⁹ O biofilme é o principal fator de virulência de ECN⁴⁰ e sua formação permite a fixação e persistência da bactéria nos materiais protegendo os microorganismos da ação de antibióticos e do sistema imune.⁴¹ Os ECN em biofilme podem revelar resistência a altas doses de antimicrobianos, sendo 100 a 1000 vezes menos suscetíveis quando comparados com as células planctônicas.⁴² Por isso, o tratamento de ICSRC, que é regulado por padronização de testes de suscetibilidade antimicrobiana em células planctônicas, pode ter resultados mal sucedidos e exigir a remoção do cateter⁴³ para obter a cura do paciente.

Nesse estudo, a detecção da concentração bactericida para biofilme (CBB) foi feita nos 26 ECN produtores de biofilme. Foi constatado que em todas as amostras testadas a CBB para oxacilina foi $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 256 \mu\text{g/mL}$ para a vancomicina, confirmando que mesmo altas concentrações desses antibióticos não foram capazes de eliminar os ECN quando em biofilme. Resultados similares têm sido observados para MRSA em biofilme, sendo que uma concentração de $64 \mu\text{g/mL}$, não foi capaz de destruir as células, mesmo sendo doses bem acima das

terapêuticas. A produção de biofilme é uma estratégia bem sucedida para a sobrevivência microbiana e para o estabelecimento da infecção. Como os mecanismos de defesa do hospedeiro e a resposta aos antimicrobianos é prejudicada contra bactérias no biofilme, as infecções crônicas e sepses relacionadas a biofilme representa uma grande preocupação nas infecções nosocomiais.⁴⁴

Nesse estudo, a maioria dos RN internados com ICSRC possuía idade gestacional <31 semanas e peso < 1000g, com a maioria dos cateteres utilizados sendo de curta duração (<10dias) e do tipo PICC. Os prematuros, principalmente de extremo baixo peso, são mais suscetíveis à infecção devido à imaturidade do sistema imunológico com deficiência de fagocitose, opsonização por anticorpos e funções do complemento. Além da prematuridade, outros fatores de risco também contribuem para maior suscetibilidade à ICSRC, dentre eles, a duração da cateterização, e a colonização por microrganismos presentes na pele. Vários estudos identificaram como os principais riscos para ICSRC muito baixo peso ao nascer (< 1.000g) e a colonização do canhão do cateter.²⁴ Dessa forma, os cateteres destes pacientes são mais manipulados e permanecem por mais tempo, mas quando a manipulação é corrigida pela duração, isto é, quanto menos tempo esses cateteres permanecerem no paciente menor a taxa de infecção.⁴⁵ Assim, sugere-se como estratégia de prevenção, que a remoção do acesso venoso seja feita o mais breve possível, assim que a terapêutica tenha sido concluída para reduzir as chances de infecção tardia.⁴⁶

A maioria dos RN com ICSRC faziam uso de nutrição parenteral e ventilação mecânica o que pode explicar porque esses fatores não resultaram em maior risco de infecção, já que cerca de 80% dos RN incluídos no estudo faziam uso desses procedimentos. Em vários estudos a nutrição parenteral e a ventilação mecânica são detectadas como fatores de risco, decorrente de fatores como, maior manipulação dos cateteres e também da infusão de soluções lipídicas servir como meio de cultura para a proliferação bacteriana.⁴⁷

Nesse estudo, o uso de cateter umbilical se mostrou um fator de risco para aquisição de ICSRC. Estes cateteres estão mais relacionados a complicações infecciosas, visto serem introduzidos através de tecido desvitalizado e com maior colonização bacteriana.⁵ Outros estudos encontraram maiores taxas de sepse quando o cateter umbilical foi utilizado inclusive como fator de risco independente podendo ser justificado pela abundante microbiota no coto umbilical.^{48,49} O uso de PICC é associado a menores taxas de infecção além de oferecer vantagens, incluindo baixa dos custos e riscos em comparação com os métodos cirúrgicos vasculares de acesso, são menos prováveis de desalojar e podem ser facilmente removidos se houver necessidade de interrupção do tratamento ou complicações, tais como infecção ou flebite.⁵⁰ Os PICC são seguramente os cateteres mais recomendados na pediatria para crianças e neonatos que necessitarão do uso de acesso central maior que seis dias. Este foi sem dúvida um grande avanço na prevenção de infecção hospitalar como um todo em pediatria.⁵

Em conclusão, a densidade de incidência de infecção relacionada ao cateter foi bem inferior às taxas de incidência de ICSAC, indicando que outras fontes de infecção podem superestimar essas taxas, revelando a importância desses critérios como marcador de qualidade dos cuidados com CVC na Unidade Neonatal estudada. A resistência à oxacilina em ECN mostrou ser fator de risco na aquisição de ICSRC, bem como a utilização de cateter umbilical. Foi demonstrando que mesmo altas concentrações de oxacilina e vancomicina não foram capazes de matar todos os micro-organismos quando em biofilme.

Agradecimentos

Apoio financeiro: processo nº 2010/14581-7, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Conflitos de interesse: nada a declarar.

Referências Bibliográficas

1. Lee JH. Catheter-related bloodstream infections in neonatal intensive care units. *Korean J Pediatr* 2011;54(9):363-367
2. O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al. CDC Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *MMWR Recomm Rep* 2011;51:1-29.
3. Margaret A, Dudeck CPH, Horan TC. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report, Data Summary for 2011, Device-associated Module
4. Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos R, Costa MLM, Frota ACC, et al. Healthcare-associated infections among neonates in neonatal units in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004;25:772-777.
5. Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar: *Diagnóstico e Prevenção de IRAS em neonatologia*. São Paulo, SP: APECIH; 2011
6. Marconi C, Cunha MLRS, Lyra JC, Bentlin MR, Batalha JEN, Sugizaki MF et al. Utilidade da cultura da ponta de cateter no diagnóstico de infecção neonatal. *J. Pediatr.* 2009;85(1): 80-83.
7. Oliveira A & Cunha MLRS. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes* 2010;3(260):2-8.
8. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections *Infectious Disease Clinics of North America* 2009;23:73-98
9. Healy CM, Baker CJ, Palazzi DL, Campbell JR, Edwards MS. Distinguishing true coagulase-negative Staphylococcus infections from contaminants in the neonatal intensive care unit. *J Perinatol* 2013;33(1):52-58

10. Raad I, Hanna H, Jiang Y, et al. Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus* bacteremic isolates embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1656–1660.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–1322
12. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000;46(6):S47-52.
13. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New Engl. J. Med* 1977;296:1305-9.
14. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 1987;147: 873–7.
15. Koneman EW. Et al. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5a ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1997.
16. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococcus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004;99:855-860.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement M100-S21*. Wayne, PA: CLSI, 2011
18. Murakami K, Minamide K, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol* 1991;29:240-2244.
19. Milheiriço C, Oliveira DC, Lencastre H. Update to the multiplex PCR Strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3374-7.

20. Arciola C R, Collimati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR method for detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprosthetic infections. *Diagn Mol Pathol* 2001;10:130-137.
21. Christensen GD, Simpson WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *Journ Clin Microbiol* 1985;22:996-06.
22. Trabulsi LR, Alterthum F, Martinez MB, Campos LC, Gompertz V, Fischman O, Rácz ML. *Microbiologia* 4th ed.- São Paulo, SP: Editora Atheneu 2005;163-68.
23. Sauer K, Camper AK, Erlich GH, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002;184:1140-1154.
24. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS. (2002). Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. *J. Pediatr* 2002;78,279-288.
25. von Eiff C, Jansen B, Kohnen W, et al. Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. *Drugs*, 2005;65:179–214
26. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease *Veterinary Microbiology* 2009;134:45–54
27. Hanssen AM, Kjeldsen G, Sollid JU. Local variants of *Staphylococcal* cassette chromosome *mec* in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer?. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004;48:85–296

28. Gill VJ, Selepak ST, Williams EC. Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol* 1983;18:1314–1319
29. Chaudhury A, Kumar AG. In vitro activity of antimicrobial agents against oxacillin resistant staphylococci with special reference to *Staphylococcus haemolyticus*. *Indian J. Med. Microbiol* 2007;25:50–52
30. Martins A, Pereira VC, Cunha MLRS. Oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the University Hospital of Botucatu Medical School in Brazil. *Chemotherapy* 2010;56:112-119.
31. Krediet TG, Mascini EM, van Rooij E, et al. Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *J Clin Microbiol* 2004;42(3):992–995
32. Romero-Vivas J, Rubio M, Fernandez C, Picazo JJ. Mortality associated with nosocomial bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1995;21(6):1417-23.
33. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, WenzelRP, Edmond MB. Molecular epidemiology of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *Journal of Hospital Infection* 2006;64:177–183
34. Lopes HV. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Ver. Panam. Infectol* 2005;7(3):34-36.
35. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43:1449-14.

36. Machado ABMP, Reiter KC, Paiva RM, Barth AL. Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase–negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *J Med Microb* 2007;56:1328–33.
37. Souza-Junior FC, Nunes EWF, Nascimento ED, et al. Prevalência de *Staphylococcus* spp resistentes à meticilina isolados em uma maternidade escola da cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. *Soc. Bras. Med. Trop* 2009;42:179-182.
38. Campos GB, Souza SG, Lobão TN, et al. Isolation, molecular characteristics and disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from ICU units in Brazil. *New Microbiologica* 2012;35:183-190.
39. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004;72:1210–1215.
40. Mack D, Rohde H, Harris LG, et al. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int J Artif Organs* 2006;29:343–359.
41. Mack D, Davies AP, Harris LG, Rohde H, Horstkotte MA, Knobloch JK. Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Anal. Bioanal. Chem* 2007;387:399–408.
42. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America Clinical Infectious Diseases 2009;49:1–45.
43. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–138.

44. Esposito S, Purrello SM, Bonnet E, Novelli A, Tripodi F, Pascale R, Unal S, Milkovich G. Central venous catheter-related biofilm infections: An up-to-date focus on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2013;1:71–78.
45. Mahieu LM, De Dooy JJ, Lenaerts AE, Ieven MM, De Muynck AO. Catheter manipulations and the risk of catheter-associated bloodstream infection in neonatal intensive care unit patients. *J Hosp Infect* 2001;48:20-26.
46. Newman CD. Catheter-Related Bloodstream Infections in the Pediatric Intensive Care Unit. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006;17:20-4.
47. Freeman J, Platt R, Epstein MF, Smith NE, Sidebottom DG, Goldmann DA. Birth weight and length of stay as determinants of nosocomial coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care unit populations: potential for confounding. *Am J Epidemiol* 1990;132:1130-40.
48. Nagata E, Brito ASJ, Matsuo T. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit: Incidence and risk factors. *American Journal of Infection Control* 2002;30:26-31
49. Moro ML, De Toni A, Stolfi I, Carrieri MP, Braga M, Zunin C. Risk factors for nosocomial sepsis in newborn intensive and intermediate care units. *Eur J Pediatr* 1996;155:315–322.
50. Pettit J, Wyckoff MM. *Peripherally inserted central catheters: guideline for practice*. 2nd ed. Glenview: National Association of Neonatal Nurses. 2007

Artigo II

O artigo foi escrito de acordo com as normas de publicação da revista científica *BMC Pediatrics*:

Comparação das técnicas semiquantitativa e quantitativa no diagnóstico de infecções relacionadas a cateteres em recém-nascidos e tipagem molecular dos micro-organismos isolados

Danilo Flávio Moraes Riboli¹, João César Lyra², Eliane Pessoa Silva¹, Luisa Leite Valadão¹, Maria Regina Bentlin², José Eduardo Corrente³, Ligia Maria Suppo de Souza Rugolo², Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha¹

4. Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.
5. Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.
6. Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil.

E-mail dos autores:

DFMR: danilo.riboli@ibb.unesp.br

JCL: jc.lyra@uol.com.br

EPS: eliane_bio10@yahoo.com.br

LL: luisaleit@gmail.com

MRB: mbentlin@fmb.unesp.br

JEC: jecorren@ibb.unesp.br

LMSSR: ligiasr@fmb.unesp.br

MLRSC: cunhamlr@ibb.unesp.br

Autor correspondente: danilo.riboli@ibb.unesp.br

Resumo

Introdução: Infecções da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC) têm se tornado a principal causa de infecção sanguínea associada à assistência a saúde, sendo a principal infecção em UTI neonatal no Brasil. Evidências microbiológicas implicando o cateter como fonte da infecção sanguínea são necessárias para estabelecer um diagnóstico da ICSRC. Tendo em vista que na cultura semiquantitativa determina-se a presença de micro-organismos da superfície externa do cateter e na cultura quantitativa além da superfície externa isolam-se também micro-organismos presentes no seu lúmen, este trabalho tem como objetivo principal estudar comparativamente essas duas técnicas no diagnóstico das ICSRC em recém-nascidos da UTI neonatal e a utilização da técnica de PFGE para análise da similaridade dos micro-organismos isolados dos cateteres e das hemoculturas. **Métodos:** Foram cultivadas pontas de cateter de recém-nascidos pelas técnicas semiquantitativa e quantitativa. Amostras isoladas da ponta de cateter e hemocultura com mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foram incluídas no estudo como casos positivos para ICSRC. Foi feito PFGE dos micro-organismos isolados do cateter e hemoculturas para verificação da similaridade e clones na unidade. **Resultados:** Foram analisadas 584 pontas de cateter de 399 pacientes de Novembro de 2005 a Junho de 2012. Foram confirmados 29 casos de ICSRC. Os ECN foram os micro-organismos mais isolados. Sendo a espécie *S. epidermidis* a prevalente (61,0%), seguida por *S. haemolyticus* (13,0%), leveduras (8,7%), *K. pneumoniae* (8,7%), *S. aureus* (4,3%) e *E. coli* (4,3%). As sensibilidades das técnicas semiquantitativa e quantitativa foram 72,7% e 59,3%, respectivamente, com especificidades de 95,7% e 94,4%, respectivamente. O diagnóstico de ICSRC a partir da similaridade dos isolados das pontas de cateteres e da hemocultura pela técnica genotípica PFGE revelou sensibilidade de 82,6% e especificidade de 100%. **Conclusão:** A técnica semiquantitativa revelou maior sensibilidade e especificidade quando

comparada com a técnica quantitativa no diagnóstico de ICSRC em recém-nascidos, além da maior simplicidade na execução e uma maior concordância com o padrão ouro, sendo portanto mais recomendada na rotina de laboratórios clínicos. A técnica de PFGE pode auxiliar no controle das ICSRC ao identificar clones de micro-organismos na Unidade Neonatal que podem ser responsáveis pela maioria dessas infecções.

Palavras-chave: semiquantitativa, quantitativa, infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter

Abstract

Introduction: Catheter-related bloodstream infections (CR-BSIs) have become the most common cause of healthcare-associated bloodstream infection and are the leading infection in neonatal intensive care units (ICUs) in Brazil. Microbiological evidence implicating catheters as the source of bloodstream infection is necessary to establish the diagnosis of CR-BSI. In this respect, semi-quantitative culture is used to determine the presence of microorganisms on the outer surface of the catheter, whereas quantitative culture also isolates microorganisms present inside the catheter. The main objective of this study was to compare these two techniques for the diagnosis of CR-BSIs in newborns from a neonatal ICU. In addition, PFGE was used for similarity analysis of the microorganisms isolated from catheters and blood cultures. **Methods:** Semi-quantitative and quantitative culture methods were used to culture catheter tips obtained from newborns. Strains isolated from catheter tips and blood cultures which exhibited the same antimicrobial susceptibility profile were included in the study as positive cases of CR-BSI. PFGE of the microorganisms isolated from catheters and blood cultures was used for similarity analysis and detection of clones in the ICU. **Results:** A total of 584 catheter tips from 399 patients seen between November 2005 and June 2012 were analyzed. Twenty-nine cases of CR-BSI were confirmed. Coagulase-negative staphylococci were the most frequently isolated microorganisms, including *S. epidermidis* as the most prevalent species (65.5%), followed by *S. haemolyticus* (10.3%), yeasts (10.3%), *K. pneumoniae* (6.9%), *S. aureus* (3.4%), and *E. coli* (3.4%). The sensitivity of the semi-quantitative and quantitative techniques was 72.7% and 59.3%, respectively, and specificity was 95.7% and 94.4%. The diagnosis of CR-BSI based on PFGE analysis of similarity between strains isolated from catheter tips and blood cultures showed 82.6% sensitivity and 100% specificity. **Conclusion:** The semi-quantitative culture method showed higher sensitivity and specificity for the diagnosis of CR-BSIs in newborns when compared to the quantitative technique. In addition, this method is easier to perform and shows better agreement with the gold standard, and should therefore be recommended for routine clinical laboratory use. PFGE may contribute to the control of CR-BSIs by identifying the predominant clones of microorganisms in neonatal ICUs that are responsible for most of these infections.

Key-words: semiquantitative, quantitative, catheter-related bloodstream infections

Introdução

Infecções da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC) têm se tornado a principal causa de infecção sanguínea associada à assistência a saúde e são associadas com substancial morbidade, mortalidade e excesso de custos ao hospital [1,2]. No Brasil, a ICSRC é a principal infecção em UTI neonatal [3].

O diagnóstico das ICSRC ainda é um desafio. Febre e calafrios são comumente associados à infecção, mas não são específicos e a inflamação no sítio de inserção do cateter possui uma sensibilidade de 8% ou menos [4]. Por isso, evidências microbiológicas implicando o cateter como fonte da infecção sanguínea são necessárias para estabelecer um diagnóstico da ICSRC.

Na falta de uma técnica padrão ouro de referência, o critério microbiológico é tópico de intensa pesquisa, e sua relevância clínica é frequentemente discutida entre especialistas. O método semiquantitativo de Maki et al. (1977) ainda é o método de diagnóstico de referência internacional, e é usado como padrão em vários estudos que avaliam diferentes métodos de diagnóstico. Essa cultura é baseada no rolamento de um segmento da ponta de cateter em placa contendo ágar sangue, detectando a presença de bactérias presentes na superfície externa do cateter. Ao se examinar a placa, uma contagem de 15UFC ou mais indica colonização do cateter [5,6].

Para evitar a perda de micro-organismos intraluminalmente, um sistema de cultura endoluminal foi desenvolvido por Cleri et al. (1980). O procedimento foi modificado por Brun-Buisson et al. (1987) com a diluição da bactéria em água estéril seguida de agitação em vórtex para a determinação da presença de micro-organismos na superfície e no lúmen do cateter. O limiar para uma contagem significativa foi tido como 10^3 UFC/mL [7,8].

Segundo o CDC (2011) somente é possível dizer que uma infecção está relacionada ao cateter, se além da cultura semiquantitativa da ponta de cateter com valor igual ou superior a 15 UFC ou cultura quantitativa com 10^3 UFC/mL for isolado o mesmo micro-organismo da hemocultura periférica e quadro clínico de sepse [6]. Para a elucidação das ICSRC é fundamental determinar a similaridade das linhagens de micro-organismos isoladas das pontas de cateteres e das hemoculturas. Os testes bioquímicos podem determinar o gênero e a espécie do micro-organismo em questão, e o antibiograma pode determinar a similaridade das amostras isoladas de cateter e hemocultura a partir do perfil de resistência da bactéria presente nas amostras, auxiliando não só no tratamento das ICSRC, mas também no diagnóstico dessas infecções.

Buscando-se metodologias com especificidade e sensibilidade mais refinadas e que sejam capazes de estabelecer relações genéticas entre os isolados obtidos de cateteres e hemoculturas no diagnóstico de ICSRC surgiram técnicas de tipagem molecular que podem representar um potencial discriminatório adicional, principalmente em infecções onde o patógeno pode fazer parte da microbiota normal, e o entendimento das relações entre esses micro-organismos é fundamental para a elucidação das ICSRC.

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é um método molecular utilizado para a tipagem molecular que se fundamenta na diferenciação de padrões de perfis genotípicos de amostras de DNA submetidos à ação de enzimas que fragmentam o DNA em diferentes partes e que podem ser analisados por meio de seus diferentes perfis de restrição através de eletroforese de campo pulsado, sendo considerada como padrão ouro na tipagem de micro-organismos envolvidos em surtos hospitalares e para estudos de vigilância onde se pode detectar a presença de clones circulantes [9].

Tendo em vista que na cultura semiquantitativa determina-se a presença de micro-organismos somente da superfície externa do cateter e na cultura quantitativa além da superfície externa isolam-se também micro-organismos presentes no seu lúmen, este trabalho tem como

objetivo principal estudar comparativamente a técnica semiquantitativa preconizada por Maki et al. (1977) e a técnica quantitativa descrita por Brun-Bruissson et al. (1987), no diagnóstico das infecções da corrente sanguínea relacionadas ao cateter em recém-nascidos (RNs) da UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e a técnica de PFGE para análise da similaridade dos micro-organismos isolados dos cateteres e das hemoculturas.

Materiais e métodos

Amostras

Os micro-organismos estudados foram isolados de pontas de cateteres e de hemoculturas de RNs internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) no período de Novembro de 2005 à Junho de 2012. As amostras referentes ao período de 2005 a fevereiro de 2011 já haviam sido isoladas e estavam mantidas em freezer a -70°C .

Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo todas as pontas de cateteres com crescimento em pelo menos uma das técnicas utilizadas e com pelo menos uma hemocultura periférica dos RNs coletada sete dias antes ou sete dias depois da remoção do cateter.

Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo as pontas de cateteres isoladas de recém-nascidos cujos registros de dados clínicos e laboratoriais não foram encontrados referentes a um período de uma semana anterior e uma semana posterior à data de remoção do dispositivo.

Definições

A ICSRC foi confirmada quando os critérios de inclusão acima descritos foram respeitados e houve a identificação do mesmo micro-organismo, mesma espécie e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos micro-organismos isolados da hemocultura periférica e da ponta do CVC com crescimento ≥ 15 UFC pela técnica semiquantitativa de Maki et al. (1977) e/ou ≥ 1000 UFC/mL pela técnica quantitativa de Brun-Buisson et al. (1987), além de pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas: instabilidade térmica, bradicardia, apneia, intolerância alimentar, piora do desconforto respiratório, intolerância à glicose, instabilidade hemodinâmica e/ou hipoatividade/letargia, sem outra causa não infecciosa reconhecida e sem relação com infecção em outro local [10].

Cultura da ponta de cateter

As culturas de pontas de cateteres foram realizadas pelo método semiquantitativo proposto por Maki et al. (1977) e quantitativo segundo Brun-Bruisson et al. (1987). Os cateteres foram removidos assepticamente pela equipe médica do hospital e foram coletadas duas pontas de aproximadamente 5 cm, colocadas em tubo seco estéril e transportadas imediatamente para o laboratório para serem processadas. Na técnica semiquantitativa os seguimentos distais foram rolados na superfície da placa de ágar sangue e incubados a 37°C por 72 horas. As placas foram examinadas diariamente e as colônias foram contadas assim que detectado o crescimento, com o resultado expresso em UFC. As pontas de cateteres proximais foram cultivadas pelo método quantitativo, passando-se 1mL de água destilada estéril pelo lúmen do cateter, agitando por um minuto em vórtex e espalhando em seguida 0,1 mL na superfície da placa de ágar sangue com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas, examinadas diariamente e as colônias foram contadas assim que detectado o crescimento, com o resultado expresso em UFC.

Hemocultura

As hemoculturas foram colhidas e cultivadas pelo sistema automatizado Bactec, conforme as normas descritas por Koneman et al. (1997) [11].

Identificação dos microrganismos

Depois de constatado crescimento em placa de ágar sangue, os micro-organismos foram submetidos à coloração de Gram para análise da pureza da amostra, sua morfologia e coloração específica. Os micro-organismos foram identificados conforme preconizado por Koneman et al. (1997)[11].

Identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*

Para essa identificação, foram utilizados os critérios propostos por Cunha et al. (2004), conforme esquema simplificado de provas bioquímicas, o qual estabelece a realização das provas de catalase, coagulase e de testes de utilização de açúcares: xilose, sacarose, trealose, manitol, maltose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e sensibilidade à novobiocina [12].

Teste de Sensibilidade às drogas antimicrobianas

O teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas foi realizado pela técnica da difusão da droga em ágar a partir de discos impregnados conforme critérios recomendados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (2011). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI dos micro-organismos isolados das pontas de cateteres e hemoculturas, previamente incubadas por 4 a 6 horas e ajustadas anteriormente com a turbidez da escala 0.5 de McFarland. Os discos utilizados foram: Penicilina (10 µg), Oxacilina (1 µg), Cefoxitina (30 µg),

Eritromicina (15 µg), Cefalotina (30 µg), Gentamicina (30 µg) e Rifampicina (30 µg). Após a incubação a 35°C por 24 horas os halos de inibição serão medidos (mm) e os resultados obtidos foram comparados entre os germes isolados do mesmo RN (cateter e hemocultura) para verificar a similaridade entre as amostras. Para o perfil de sensibilidade das leveduras foram utilizados disco de Anfotericina B (100 µg) e Fluconazol (25 µg) [13].

Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

O PFGE das amostras de *Staphylococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de cateteres e das hemoculturas foi realizado segundo o protocolo modificado de McDougal et al. (2003).

As amostras foram cultivadas em caldo BHI onde cresceram por 24h. Em um microtubo, 200µl da amostra quando ECN e 100µl quando *S. aureus* foram centrifugadas à 12.000rpm por 1min. Depois de desprezado o sobrenadante, foram adicionados 150µl de solução TE (10mM de Tris, 1mM EDTA [pH 8,0]) com agitação em vortex até a completa dissolução do pelet formado. As amostras foram deixadas em banho-maria por 10min à 37°C. Foram adicionados de 2,5µl de Lisostafina (1mg/ml) por amostra e agitadas em vortex. Após adicionada a lisostafina em todas as amostras, 150µl de agarose low melting foram adicionados e as amostras foram imediatamente despejadas nos moldes para plugues até que solidificassem e, então, colocadas em 2ml de solução EC (6mM Tris-HCl, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% laurilsarcosil sódico) e incubadas à 37°C por pelo menos 4h. O EC foi retirado e os plugues foram lavados com 2ml de TE quatro vezes à temperatura ambiente por meia hora. Para a restrição do DNA genômico foi usado 1/3 de um plugue e 2µl da enzima *SmaI* (Fast Digest *SmaI*, Fermentas Life Science, Canadá) para *Staphylococcus* spp. e *XbaI* para *Klebsiella pneumoniae*. A restrição foi feita em placa de 96 poços adicionando-se primeiramente o tampão enzimático (45µl de água milli Q e 5µl do tampão enzimático por amostra) deixando a placa na geladeira por 30min. Em seguida, o tampão sem enzima foi retirado e foi adicionado o tampão

com a enzima (43µl de água milli Q, 5µl do tampão enzimático e 2 µl da enzima por amostra) deixando a placa na estufa a 37°C por 6 min segundo especificações do fabricante. Antes de serem adicionados no gel de agarose, cada plugue foi cortado, com lâmina para bisturi, transversalmente com a ajuda de duas lâminas perpendiculares entre si diminuindo sua espessura pela metade. A eletroforese foi executada em aparelho CHEF-DR III System (BioRad Laboratories, EUA) em gel de agarose a 1% preparado com TBE 0,5M (1g em 100mL de água milli Q) (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad Laboratories, EUA) sob as seguintes condições: intervalos de tempo de pulso de 5 a 40s por 21h; em rampa linear; 6V/cm; ângulo de 120°; 14°C; 2,2L de 0,5M TBE como tampão de corrida. Foi utilizado Lambda Ladder PFG Marker (New England BioLabs) como marcador molecular. Os géis foram corados com GelRed (400ml de água destilada e 30 µl de GelRed)(10.000X em água, Biotium, EUA) por 1h, e fotografados sob transiluminação UV. Para análise de similaridade foi utilizado o software BioNumerics (versão 6.1; Applied Maths, Bélgica), cálculo dos coeficientes de correlação Dice e criação do dendrograma pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages). A tolerância da posição das bandas e a otimização foram ajustadas para 1.25 e 1% respectivamente. Um coeficiente de similaridade de 80% foi escolhido para determinação dos clusters [14].

Análise Estatística

A acurácia das culturas para diagnóstico de ICSRC foi obtida pelo cálculo da sensibilidade (S) e da especificidade (E). A análise de concordância Kappa foi realizada para avaliar a concordância das culturas com o padrão-ouro.

O padrão ouro correspondeu ao diagnóstico de certeza de ICSRC, com o isolamento do mesmo micro-organismo (espécie e antibiograma) nas culturas de cateter e hemoculturas e diagnóstico de sepse de acordo com os critérios clínicos da Unidade [10].

Resultados

Coleta das amostras

Foram analisadas 584 pontas de cateteres de 399 RNs no período de novembro de 2005 a junho 2012 na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB). Das 584 pontas analisadas, 56 provenientes de 50 RNs foram incluídas neste estudo de acordo com o critério de inclusão. Dos 50 recém-nascidos, 29 foram classificados com ICSRC de acordo com o padrão ouro, isolamento do mesmo micro-organismo (espécie e mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos) nas culturas de cateter e hemoculturas e diagnóstico de sepse de acordo com os critérios clínicos.

Culturas das pontas de cateter

Das 56 pontas de cateter analisadas, 42 apresentaram crescimento ≥ 15 UFC indicando a colonização do cateter de acordo com o critério preconizado por Maki et al (1977) e 35 mostraram crescimento ≥ 1000 UFC de acordo com a técnica quantitativa de Brun-Bruissson et al. (1987) (Tabela1).

Tabela 1. Diagnóstico de ICSRC pelas técnicas semiquantitativa e quantitativa

	Técnica semiquantitativa				Técnica quantitativa			
	≥ 15 UFC		≤ 15 UFC		≥ 1000 UFC		≤ 1000 UFC	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Total Cateteres Positivos (56)	42	75,0	14	25,0	35	62,5	21	37,5
ICSRC (29)	23	79,3	6	26,0	18	54,5	11	37,9

Dos 29 casos de ICSRC, 23 (79,3%) foram positivos para ICSRC pela técnica semiquantitativa, com crescimento ≥ 15 UFC e 18 (62,1%) apresentaram crescimento ≥ 1000 UFC

na técnica quantitativa. Os resultados revelaram quatro casos em que a cultura foi ≥ 15 UFC na técnica semiquantitativa, mas apresentaram crescimento < 1000 UFC na técnica quantitativa, e um episódio em que não houve crescimento na cultura quantitativa. A comparação da cultura semiquantitativa com o padrão ouro revelou cinco episódios com crescimento < 15 UFC e um caso em que não houve crescimento na técnica semiquantitativa. Desses seis episódios três não cresceram na técnica quantitativa e os outros três apresentaram crescimento < 1000 UFC. Portanto todos os casos de ICSRC diagnosticados pela cultura quantitativa também foram positivos na cultura semiquantitativa.

As sensibilidades das técnicas semiquantitativa e quantitativa foram 72,7% e 59,3%, respectivamente, com especificidades de 95,7% e 94,4%, respectivamente. O diagnóstico de ICSRC a partir da similaridade dos isolados das pontas de cateteres e da hemocultura pela técnica genotípica PFGE revelou sensibilidade de 82,6% e especificidade de 100%. A concordância, dada pelo coeficiente Kappa, entre as técnicas quando comparadas com o padrão ouro foi 0,6872 (concordância substancial) para a técnica semiquantitativa, 0,4915 (concordância moderada) para a técnica quantitativa e 0,8193 (concordância excelente) para o PFGE (Tabela2).

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade das técnicas analisadas e coeficiente Kappa.

Técnicas	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
Semiquantitativa	72,7	95,7	0,6872
Quantitativa	59,28	94,4	0,4915
PFGE	82,6	100	0,8193

Estafilococos coagulase-negativa foram os micro-organismos prevalentes (17, 73,9%) detectados pela técnica semiquantitativa, com *S. epidermidis* isolados em 14 (61%) dos 23 casos de ICSRC e *S. haemolyticus* isolados de 3 (13%). *S. aureus* foi isolado somente de um caso

(4,3%) de ICSRC. As bactérias Gram-negativas foram isoladas de 3 casos (13%), com *K. pneumoniae* isolados em 2 (8,7%) e *E. coli* de um (4,3%). As leveduras também foram isoladas de 2 (8,7%) casos (Tabela 2).

A cultura semiquantitativa não detectou crescimento em um episódio de ICSRC causado por *S. epidermidis* e abaixo do ponto de corte (<15UFC) em cinco casos, sendo quatro causados por *S. epidermidis* e um por levedura (Tabela 3). A técnica quantitativa não detectou crescimento de micro-organismos em quatro episódios, incluindo três de *S. epidermidis* e um de levedura. Os resultados mostraram crescimento abaixo do ponto de corte na cultura quantitativa (<1000UFC) em seis episódios causados por *S. epidermidis* e um causado por levedura (Tabela 3).

Tabela 3. Total de micro-organismos associados com ICSRC em relação à detecção pelas culturas semiquantitativa e quantitativa.

Micro-organismos ICSRC	Cultura Semiquantitativa		Cultura Quantitativa	
	≥ 15 UFC	< 15 UFC	≥ 10 ³ UFC	< 10 ³ UFC
<i>S. epidermidis</i> (19)	14	5*	10	9**
<i>S. haemolyticus</i> (3)	3	0	3	0
<i>S. aureus</i> (1)	1	0	1	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)	2	0	2	0
Levedura (3)	2	1	1	2*
<i>E. coli</i> (1)	1	0	1	0
Total (29)	23	6	18	11

*Uma cultura sem crescimento, **Três culturas sem crescimento.

Apesar dos 29 casos de ICSRC somente micro-organismos de 25 casos foram submetidos à técnica de PFGE, pois o PFGE de *E. coli* e das leveduras não foi realizado. O PFGE confirmou

a similaridade dos micro-organismos isolados das culturas de cateter e hemocultura de 21 (84%) dos 25 casos analisados. Dos 23 casos de ICSRC diagnosticados pela técnica semiquantitativa e excluindo os dois episódios de levedura e um de *E.coli* que não foram submetidas à tipagem molecular pela PFGE, houve a confirmação de 18 (90%) dos 20 casos.

O PFGE confirmou 12 dos 14 casos de ICSRC causados por *S. epidermidis* (pacientes 6, 8, 9, 14, 25, 26, 35, 38, 39, 42, 43 e 50) (Figura 1). Dentre eles, houve um clone majoritário (grupo A da Figura 1) onde houve similaridade maior que 80% em quatro casos de ICSRC, incluindo os pacientes 6, 8, 26 e 39 com a mesma cepa isolada nos anos de 2006, 2007, 2009 e 2010, respectivamente. A análise do dendrograma também revelou similaridade acima de 80% entre os micro-organismos isolados dos pacientes 43 e 50 (grupo B) nos anos de 2011 e 2012, respectivamente.

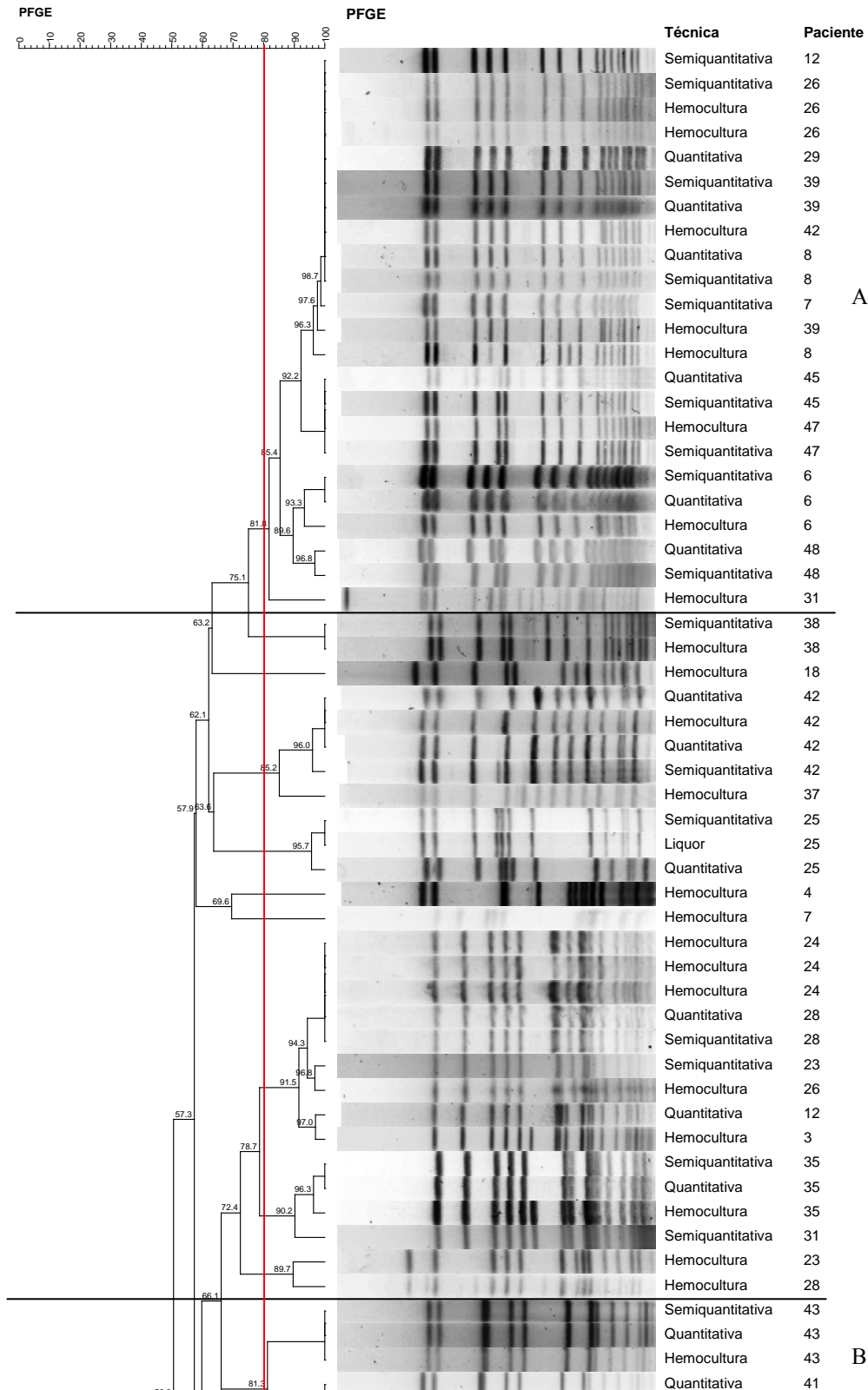


Figura 1. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. epidermidis* isolados de cateteres pelas culturas emiquantitativa e quantitativa e das hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

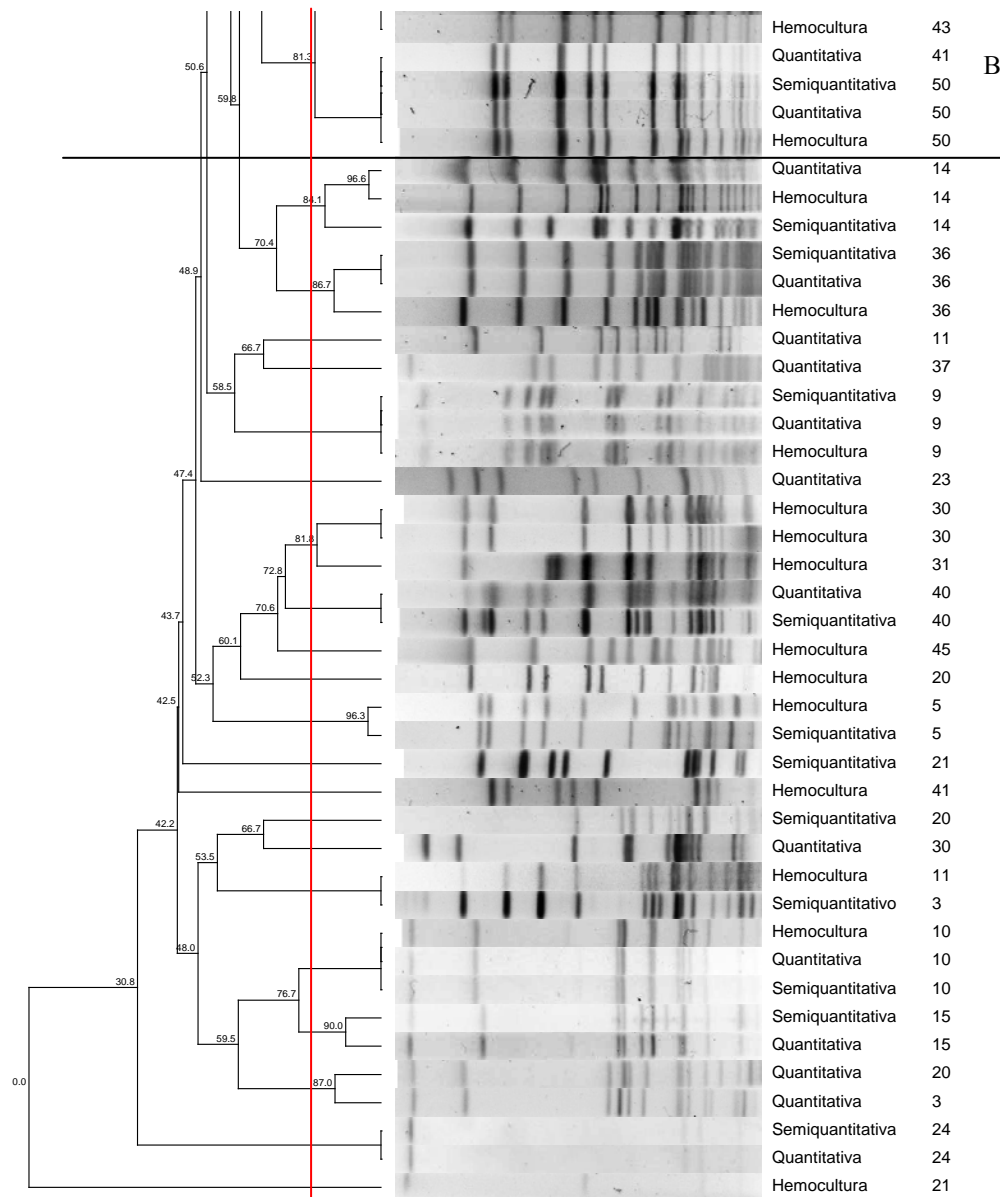


Figura 2 (Continuação). Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. epidermidis* isolados de cateteres pelas culturas semiquantitativa e quantitativa e das hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Os três casos de ICSRC causados por *S. haemolyticus* também foram confirmados por PFGE (pacientes 2, 22 e 49) (Figura 2). Foram cultivadas duas pontas do paciente 22 de dias diferentes (dois dias de diferença) e ambas tiveram um crescimento confluyente em ambos os métodos, porém somente uma das pontas tinha o mesmo micro-organismo da hemocultura. Os

micro-organismos isolados dos pacientes 2 e 22, anos de 2006 e 2008 respectivamente, possuíam 100% de similaridade entre si.

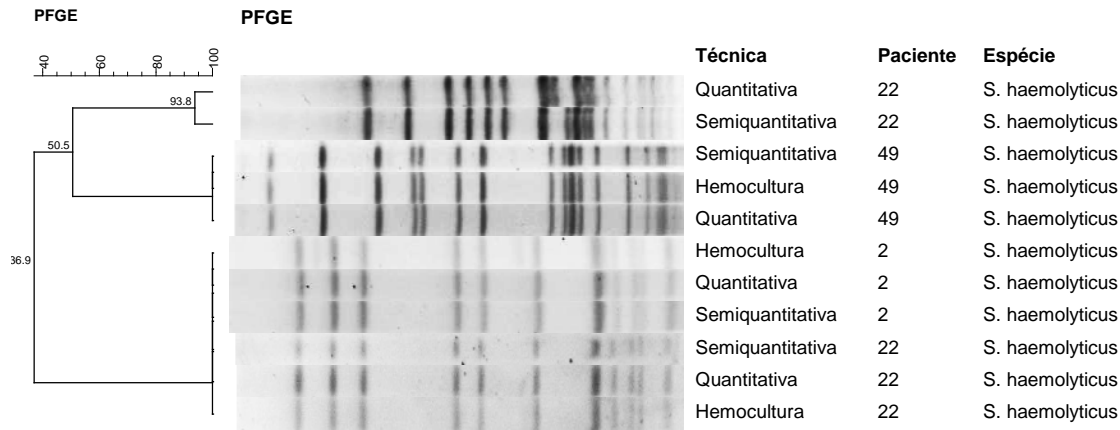


Figura 2. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. haemolyticus* isolados de cateteres pelas culturas semiquantitativa e quantitativa e das hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

O único caso confirmado de ICSRC causado por *S. aureus* também foi confirmado na técnica de PFGE com 100% de similaridade (Figura 3).

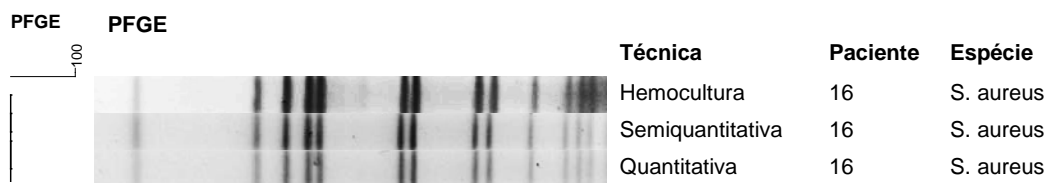


Figura 3. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *SmaI* de *S. aureus* isolados de cateteres pelas culturas semiquantitativa e quantitativa e das hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Os dois casos de infecção por *K. pneumoniae* foram confirmados por PFGE (100% e 90,9% de similaridade), porém a análise do dendrograma revelou dois clones distintos (Figura 4).

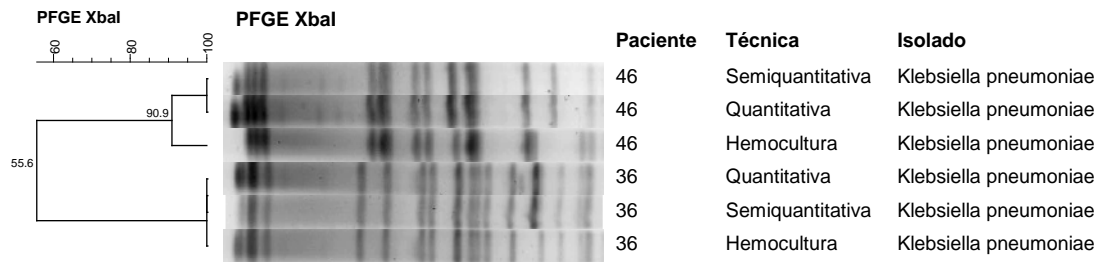


Figura 4. Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis PFGE – *XbaI* de *K. pneumoniae* isolados de cateteres pelas culturas semiquantitativa e quantitativa e das hemoculturas dos recém-nascidos incluídos no estudo (similaridade $\geq 80\%$).

Discussão

Estudos comparativos dos métodos de cultura semiquantitativa e quantitativa de pontas de cateteres para o diagnóstico das ICSRC têm sido desenvolvidos por vários autores [15, 16]. Porém, esses estudos são sempre empregados para o diagnóstico dessas infecções em pacientes adultos. Devido à inexistência na literatura de trabalhos específicos que comparem os métodos de cultura para o melhor diagnóstico de ICSRC em recém-nascidos, esse estudo foi conduzido.

Infecções relacionadas a cateter incluem colonização do dispositivo pelos micro-organismos, infecção no local de saída e uma infecção da corrente sanguínea microbiologicamente confirmada relacionada ao dispositivo. Na falta de uma técnica padrão ouro de referência, o critério microbiológico é tópico de intensa pesquisa clínica, e sua relevância clínica é frequentemente discutida entre especialistas [17].

A técnica semiquantitativa identificou mais casos de ICSRC (23) quando comparado com a cultura quantitativa (18). Na cultura quantitativa observou-se crescimento abaixo do ponto de corte ($< 10^3$ UFC/ml) de uma amostra de levedura e três amostras de *S. epidermidis* e ausência de crescimento de uma amostra de *S. epidermidis*. Já no método de cultura semiquantitativa, observou-se o crescimento maior de 15 UFC nos cinco isolados descritos. Esses resultados podem ser explicados pela contaminação de micro-organismos aderidos somente na superfície

externa do dispositivo e também ao fato dos cateteres nesse estudo serem a maioria de curta duração (até 10 dias). Vários autores apontam a contaminação da superfície externa do cateter como a rota de infecção predominante em cateteres de curta duração (até 10 dias), sendo que a contaminação intraluminal é importante em cateterização prolongada. Além disso, a densidade de bactérias que colonizam a superfície externa do cateter é maior que na superfície interna [6, 18].

As sensibilidades das técnicas semiquantitativa e quantitativa foram de 72,7% e 59,28%, respectivamente, com especificidade de 95,7% e 94,4%, respectivamente. Os resultados revelaram seis episódios de ICSRC que não foram detectados pelas culturas semiquantitativas e quantitativas, cinco associados com *S. epidermidis* e um por levedura. A limitação da cultura semiquantitativa é que ela apenas detecta colonização da superfície externa do cateter e não a colonização intraluminal. Em adição, a menor sensibilidade das culturas semiquantitativa e principalmente da cultura quantitativa observada nesse estudo pode ser explicada pela antibioticoterapia prévia frequentemente administrada em neonatos prematuros internados em UTI. Consequentemente, esta vai diminuir o rendimento da cultura bacteriana, tanto da superfície externa quanto da superfície endoluminal. Devido a estes agentes antimicrobianos serem administrados através do cateter venoso central, micro-organismos presentes no lúmen estão expostos a maiores concentrações de antibióticos em relação às bactérias presentes na superfície externa. Portanto, o uso prévio de antimicrobianos pode influenciar a sensibilidade dos métodos, com destaque para a cultura quantitativa.

Siegman-Igra et al. (1997) relataram a superioridade de técnicas quantitativas para a cultura de segmentos de cateter em uma meta-análise onde foram comparadas seis técnicas de cultura. Esses autores concluíram que a cultura quantitativa demonstrou uma maior precisão no diagnóstico das ICSRC com cultura do segmento do cateter, sendo o único método com sensibilidade e especificidade acima de 90% e melhor custo benefício [19]. Entretanto, de acordo

com o estudo de Bouza et al. (2005), as técnicas quantitativas não foram superiores a técnica de Maki et al. (1977) sob as mesmas condições utilizadas [16]. Portanto a sensibilidade, especificidade e simplicidade da técnica semiquantitativa de Maki et al. (1977) faz com que esta seja o procedimento de escolha na rotina de um laboratório de microbiologia clínica.

Os ECN foram responsáveis pela maioria das infecções (75,9%), sendo *S. epidermidis* a espécie mais encontrada (86,4% dos ECN), seguido por *S. haemolyticus* (13,6% dos ECN) e apenas um caso confirmado de infecção causado por *S. aureus* (3,4%). Os Bacilos Gram-negativos foram responsáveis por 10,3% dos casos, com um episódio causado por *E. coli* e dois por *K. pneumoniae* e as leveduras também foram responsáveis por 10,3% das ICSRC. Durante 1992-1999, os ECN foram responsáveis por 37,7% das infecções da corrente sanguínea (ICS) em UTIs pediátricas segundo relatórios do NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) [20]. Dados mais recentes reportados pelo *National Healthcare Safety Network* (NHSN) do CDC também ranquearam os ECN em 1º na etiologia das ICSRC (34,1%) seguido por espécies de *Enterococcus* (16%), espécies de *Candida* (11,8%) e *S. aureus* em 4º lugar (9,9%). Os micro-organismos Gram-negativos incluindo as enterobactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* foram responsáveis por 12,4% dessas infecções [21]. Em nosso estudo, o único caso de ICSRC por *E. coli* ocasionou o óbito do paciente, no ano de 2009. As ICSRC por esses agentes etiológicos, apesar de pouco comum, são bastante graves e com elevada taxa de letalidade (40-90%) já que cepas não maternas de *Escherichia coli* (de outro paciente ou do ambiente hospitalar) podem causar doença invasiva grave [22]. Estudos têm demonstrado um aumento na resistência aos antibióticos apresentada por esses micro-organismos, incluindo produção de beta-lactamases de espectro estendido que podem dificultar o tratamento dessas infecções [23, 24, 25]. Um fator de risco que tem sido discutido para aquisição de micro-organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido é o uso prévio de antibióticos, com uma terapia empírica inadequada sendo a maioria dos pacientes tratados com

mais de um antibiótico [26, 27]. Considerando o sistema de defesa imaturo dos recém-nascidos prematuros, o impacto das infecções por esse micro-organismo é ainda maior.

Infecções causadas por esses micro-organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido tem sido associadas com desfechos ruins para o paciente, levando a um aumento na mortalidade, prolongamento da hospitalização e aumento de custos ao hospital [28]. Além da virulência e de sua habilidade de adquirir resistência aos antibióticos, *Klebsiella* e *E. coli* são capazes de sobreviver na pele e superfícies úmidas resistindo à dessecação, tornando-se facilmente transferíveis através de equipamentos e mão da equipe médica [29]. As UTIN são o local ideal para disseminação desses micro-organismos pelo prolongado tempo de hospitalização, uso prolongado de antimicrobianos e uso de dispositivos invasivos [27].

A maior frequência de *S. epidermidis* nessas intercorrências é esperada, já que é a espécie predominante na microbiota do recém-nascido. Esta predominância na colonização dos indivíduos e a maior patogenicidade de algumas cepas podem explicar o fato de o *S. epidermidis* ser a espécie mais comumente associada aos processos infecciosos em recém-nascidos, conforme relatado em estudo realizado por Cunha et al (2002, 2007) [30, 31]. A presença de complexos clonais de *S. epidermidis* com cepas isoladas de vários recém-nascidos por um período de quatro anos (2006 a 2010) e de *S. haemolyticus* (2006 a 2008) indica a presença de clones prevalentes dessas espécies de ECN na UTI Neonatal. Esses micro-organismos podem colonizar esses dispositivos e invadir a corrente sanguínea causando infecção sistêmica nesse grupo de pacientes submetidos a esses procedimentos invasivos, já que são na sua maioria recém-nascidos prematuros e de baixo peso, cuja imaturidade e deficiência do sistema imunológico contribuem para a infecção. A presença de clones de *S. haemolyticus* indica a importância de medidas de controle de ICSRC, já que essa espécie é descrita como a espécie mais resistente a diversos antimicrobianos, sendo importantes carreadores de genes de resistência que podem ser disseminados para outras espécies de ECN prevalentes nas ICSRC [32, 33].

Conclusão

A técnica semiquantitativa revelou maior sensibilidade e especificidade quando comparada com a técnica quantitativa no diagnóstico de ICSRC em recém-nascidos, além da maior simplicidade na execução e uma maior concordância com o padrão ouro sendo, portanto a mais recomendada na rotina de laboratórios clínicos. A técnica de PFGE pode auxiliar no controle das ICSRC ao identificar clones de micro-organismos na Unidade Neonatal que podem ser responsáveis pela maioria dessas infecções.

Lista de abreviações:

CDC- Centers for Disease Control
CLSI- Clinical Laboratory Standards Institute
CVC- Cateter Venoso Central
ECN- Estafilococos Coagulase-Negativo
ICSRC- Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter
PFGE- Pulsed Field Gel Electrophoresis
RN- Recém-Nascido
UFC- Unidade Formadora de Colônia
UTI- Unidade de Tratamento Intensivo
UTIN- Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

Conflito de interesse: nada a declarar

Contribuição de cada autor:

DFMR: Participou da concepção da idéia do estudo, realizou os testes microbiológicos e escreveu o artigo. EPS: Participou da concepção da idéia do estudo, realização dos testes microbiológicos, análises dos dados clínicos e contribuiu com a redação do artigo. LLV: participou da realização dos testes microbiológicos. JCL: Médico da Unidade Neonatal, contribuiu com o material clínico e coleta de dados clínicos. MRB: Médico da Unidade Neonatal, contribuiu com o material clínico e coleta de dados clínicos. JEC: consultor estatístico da Faculdade de Medicina de Botucatu, realizou a análise estatística do experimento. LMSSR: Médico e professor responsável pela Unidade Neonatal, coordenou a coleta de material clínico e análise dos dados clínicos. MLRSC: Responsável por conceber a idéia do trabalho, a coordenação do trabalho de laboratório, análise de dados e redação do manuscrito.

Agradecimentos: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo n° 2010/14581-7.

Referências bibliográficas

1. McGee DC, Gould MK: **Preventing complications of central venous catheterization.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1123-33.
2. Rosenthal VD, Gusman S, Migone O, Crnich CJ: **The attributable cost, length of hospital stay, and mortality of central line-associated bloodstream infection in intensive care departments in Argentina: A prospective, matched analysis.** *Am J Infect Control* 2003, **31**:475-8080
3. Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos R, Costa MLM, Frota ACC, et al: **Healthcare-associated infections among neonates in neonatal units in Brazil.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004, **25**:772-777.
4. Safdar N, Maki DG: **Inflammation at the insertion site is not predictive of catheter-related bloodstream infection with short-term, non cuffed central venous catheters.** *Crit Care Med* 2002, **30**: 2632–35.
5. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW: **A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection.** *The New Engl. J. Med* 1977, **296**: 1305-9.
6. O’Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al: **CDC Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections.** *MMWR Recomm Rep* 2011. **51**:1–29.
7. Cleri D, Corrado M, Seligman S: **Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts.** *J Infect Dis* 1980, **141** (Suppl 6): 781–6.
8. Brun-Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M: **Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures.** *Arch InternMed* 1987, **147** (Suppl 5): 873–7.
9. Tenover FC, Arbeit RV, Goering PA, Mickelsen BE, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B: **Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**:2233-9.

10. Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar: *Diagnóstico e Prevenção de IRAS em neonatologia* 2011
11. Koneman EW et al: *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: JB Lippincott; 1997.
12. Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA: **Comparison of methods for the identification of coagulase-negative *Staphylococcus***. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004, **99**: 855-860.
13. CLSI 2011. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S21. 31**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
14. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC: **Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database**. *Journal of Clinical Microbiology* 2003, **41**: 5113-5120.
15. Storti A, Manzato AJ, Pizzolitto AC, Pizzolitto EL: **Assessment of central venous catheter-associated infections using semi-quantitative or quantitative culture methods** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2009 **27**(Suppl 3);213-220
16. Bouza E, Alvarado N, Alcalá L, et al: **A prospective, randomized, and comparative study of 3 different methods for the diagnosis of intravascular catheter colonization**. *Clin Infect Dis* 2005, **40**: 1096–100
17. Worthington T, Elliott TS: **Diagnosis of central venous catheter related infection in adult patients**. *J Infect* 2005, **51**:267–280.
18. Koh DBC, Robertson IK, Watts M, Davies AN: **Density of Microbial Colonization on External and Internal Surfaces of Concurrently Placed Intravascular Devices** *Am J Crit Care* May 2012, **21**:162-171
19. Siegman-Igra Y, Anglim AM, Shapiro DE, Adal KA, Strain BA, Farr BM: **Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: a meta analysis**. *J Clin Microbiol* 1997, **35** (Suppl 4): 928–36.

20. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS). **System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004.** *Am J Infect Control* 2004, **32**: 470–485.
21. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. NHSN. **Annual Update: Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-associated infections. Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007.** *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008, **29** (Suppl 11):996-1011.
22. Dekema DJ, Barr J, Boyken LD, Buschelman BJ, Jones RN, Pfaller MA, et al: **A cluster of serious Escherichia Coli infections in a neonatal intensive-care unit.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997, **18**:774-6.
23. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Thomsen KM, Eckel-Passow JE, Vetter EA, Tleyjeh IM, Baddour LM: **β -Lactam and Fluoroquinolone Combination Antibiotic Therapy for Bacteremia Caused by Gram-Negative Bacilli.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(Suppl 4):1386–1394.
24. Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P: **Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant E. coli in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008** *Critical Care* 2010, **14** :R113
25. van der Donk CFM, Beisser PS, Hoogkamp-Korstanje JAA, Bruggeman CA, Stobberingh EE, behalf of the Antibiotic Resistance Surveillance Group: **A 12 year (1998–2009) antibiotic resistance surveillance of Klebsiella pneumoniae collected from intensive care and urology patients in 14 Dutch hospitals.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011, **66** (Suppl 4):855-8
26. Oteoa J, Cercenadob E, Fernández-Romeroa S, Saéza D, Padillab B, Zamorac E, Cuevasa O, Bautistaa V, Campos J: **Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Escherichia coli as a Cause of Pediatric Infections: Report of a Neonatal Intensive Care Unit Outbreak Due to a CTX-M-14-Producing Strain** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, **56**:54-58
27. Trecarichi EM, Tumbarello M, Spanu T, Caira M, Fianchi L, Chiusolo P, Fadda G, Leone G, Cauda R, Pagano L: **Incidence and clinical impact of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)**

- production and fluoroquinolone resistance in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* in patients with hematological malignancies.** *Journal of Infection* 2009, **58**:299–307
28. Tamma, Savard P, Pál T, Sonnevend A, Perl TM, Milstone AM: **An Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit.** *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2012, **33**:631-634
29. Jain A, Roy I, Gupta MK, Kumar M, Agarwal SK: **Prevalence of extended spectrum β lactamase producing Gram-negative bacteria in septicemic neo-nates in a tertiary care hospital.** *J Med Microbiol* 2003, **52**:421-425
30. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS, (2002). **Significância clínica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos.** *J Pediatr* 2002, **78**:279-288.
31. Martins A, Cunha MLRS: **Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects.** *Microbiology and Immunology* 2007, **51**:787-795
32. Bouchami O, Hassen AB, Lencastre H, Miragaia M: **High prevalence of mec complex C and ccrC is independent of SCCmec type V in *Staphylococcus haemolyticus*.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**:605–614
33. Barrosa EM, Ceottob H, Bastosb MCF, Santos KRN, Giambiagi-deMarval M: ***Staphylococcus haemolyticus* as an Important Hospital Pathogen and Carrier of Methicillin Resistance Genes.** *J. Clin. Microbiol* 2012, **50**:166-168



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de maio de 2.010

OF. 175/2010-CEP

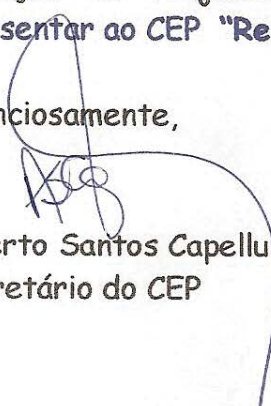
Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências do
Campus de Botucatu

Prezada Dr^ª. Maria de Lourdes,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3522-2010) Diagnóstico das infecções relacionadas a cateter pelas técnicas semiquantitativas e quantitativas, a ser conduzido por Danilo Flávio Moraes Riboli, orientado por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03 de maio de 2.010.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP