



unesp

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



PG-BGA

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA RELACIONADAS A CATETERES EM RECÉM-NASCIDOS.

LETÍCIA TEIXEIRA PAZZINI

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
Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Orientadora: Profa.Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

BOTUCATU - SP

2010



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



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS
ISOLADOS DE INFECÇÕES DA CORRENTE SANGUÍNEA
RELACIONADAS A CATETERES EM RECÉM-NASCIDOS.**

LETÍCIA TEIXEIRA PAZZINI

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES RIBEIRO DE SOUZA DA CUNHA

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 Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Orientadora: Profa.Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

BOTUCATU - SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Pazzini, Letícia Teixeira.

Caracterização genotípica de microrganismos isolados de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres em recém-nascidos / Letícia Teixeira Pazzini. – Botucatu, 2010

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Assunto CAPES: 20100000

1. Cateteres. 2. Infecções neonatais. 3. Sangue – infecções.

Palavras-chave: Cateter; Fingerprint; Neonatal; PCR; UTI.

A minha filha

Ana Luiza, que é fonte de força pra tudo que faço, obra perfeita, esta outra obra, fruto de muito trabalho e força de vontade, esperando que um dia quando entendê-la, possa ela orgulhar-se da mãe, que tentou crescer ao mesmo tempo que ela também crescia. Perdoe-me por tanta ausência.

Dedico

Aos meus pais

Homero e Ângela, esses que sempre cultivaram em mim o valor do aprendizado, pela bondade, doçura e simplicidade que me conduziram o caminho, ensinando-me a ser paciente e persistente nos momentos de dificuldade, sem esquecer a importância da honestidade e justiça, sem vocês nada seria possível. Para vocês, o resultado de mais uma caminhada

Dedico

Agradecimentos

A Deus por me permitir a realização deste trabalho, me dando força, principalmente nos momentos de provação.

Um agradecimento especial a minha orientadora Prof^a Dr^a Maria de Lourdes por me guiar, e por orientar meus passos nessa caminhada, pela compreensão, amizade e paciência com que esteve comigo nessa jornada.

Aos funcionários da secretária da Pós-graduação do IBB, pela simpatia, prontidão e atenção que sempre dispensaram em todos os momentos que necessitei de auxílio.

Ao Prof^o Dr^o José Eduardo do Departamento de Estatística, pela atenção e prontidão dispensada na execução dos testes estatísticos

A amiga Eliane, pela grande contribuição nos experimentos fenotípicos deste trabalho.

Ao amigo Adriano, pela contribuição nos experimentos deste trabalho.

Ao amigo Marcos, pela amizade e contribuição nesse trabalho.

Aos colegas do laboratório de bacteriologia, que de uma forma ou de outra contribuíram para o término deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia, por fazer deste departamento um ambiente de trabalho muito agradável .

Aos meus amigos do coração, que acompanharam a minha luta de perto, que sempre estiveram ao meu lado, escutando ou oferecendo uma palavra amiga.

Aos meus familiares, que sempre torcem por mim.

Que os vossos esforços desafiem
as impossibilidades, lembrai-vos
de que as grandes coisas do
homem foram conquistadas do que
parecia impossível.

Charles Chaplin

Sumário

Introdução.....	1
Referências Bibliográficas.....	13
Objetivos.....	21
CAPÍTULO 1	
Abstract.....	24
Resumo.....	27
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	33
Microrganismos.....	33
Critérios de inclusão.....	33
Critérios de exclusão.....	33
Cultura de cateter.....	33
Hemocultura.....	34
Identificação dos microrganismos.....	34
Identificação de <i>Estafilococos</i> coagulase-negativa (ECN).....	35
Sensibilidade às drogas antimicrobianas.....	35
Definições.....	36
Extração do DNA genômico.....	37
Seleção dos primers.....	38
Otimização do protocolo das reações baseadas em RAPD- PCR.....	39
Protocolo das reações baseadas em REP-PCR	42
Obtenção por eletroforese dos produtos amplificados.....	42
Análises dos perfis obtidos pelos métodos genotípicos.....	42
Determinação do perfil clonal das amostras de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isoladas de hemoculturas.....	43
Análise estatística.....	44
Resultados.....	44
Cultura de Cateter.....	44
Identificação dos microrganismos.....	44
Sensibilidade às drogas antimicrobianas.....	46
Análises dos perfis obtidos pelos métodos genotípicos.....	47

Comparação dos métodos genotípicos com o perfil fenotípico de similaridade.....	55
Determinação do perfil clonal das amostras de <i>Staphylococcus epidermidis</i> isoladas de hemoculturas.....	59
Discussão.....	69
Conclusão.....	77
Referências bibliográficas.....	78
CAPÍTULO 2	
Abstract.....	83
Resumo.....	85
Introdução.....	87
Patogenia e etiologia das infecções sanguíneas relacionadas a cateter vascular.....	88
ICSRC em UTI neonatal.....	92
Prevalência dos microrganismos isolados em ICSRC.....	95
Diagnóstico das ICSRC	96
Métodos de diagnósticos baseados na remoção do cateter.....	98
Métodos baseados na permanência do cateter.....	100
Métodos genotípicos no diagnóstico das ICSRC.....	102
Prevenção das ICSRC.....	107
Novas perspectivas no controle das infecções relacionadas a cateteres	112
Conclusões.....	114
Referências Bibliográficas.....	116
Apêndice.....	126

Introdução

Introdução

O uso de cateteres tem sido de grande utilidade clínica já que permitem o acesso rápido da corrente sanguínea. São utilizados para inúmeras finalidades como a administração de fluídos endovenosos, medicamentos, nutrição parenteral total, hemodiálises, entre outras. No entanto estes dispositivos não estão isentos de riscos como complicações mecânicas e infecciosas (García et al., 2003, Warren et al., 2006).

Infecções da corrente sanguínea relacionada a cateteres (ICSRC) são infecções nosocomiais comuns, sendo responsáveis por mais de 60% dos episódios de bacteremias nosocomiais em hospitais europeus. As altas taxas de ICSRC associadas ao crescente aumento das taxas de resistência tornam essas infecções particularmente preocupantes (Bouza et al., 2004). São considerados, como relacionados ao cateter venoso, tanto os episódios de infecção local, evidenciados pela colonização do cateter, quanto os episódios de infecção sistêmica que ocorrem como resultado direto da presença do dispositivo. Várias condições têm sido apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de ICSRC, tais como a duração do cateterismo, a colonização cutânea no local da introdução do cateter, a manipulação freqüente da linha venosa, sua utilização para medir a pressão venosa central, o tipo de curativo utilizado, a doença básica e a gravidade do estado clínico (Diener et al., 1996). Associados a esses fatores, mecanismos imunológicos imaturos e uso de sistemas de suporte de vida invasivos fazem com que neonatos e prematuros sejam particularmente susceptíveis a infecções nosocomiais. Aproximadamente 20% dos neonatos prematuros com peso de nascimento muito baixo (inferior a 1.500g) experimentam uma infecção sistêmica durante sua estada inicial no hospital (Kaufman & Fairchild, 2004).

Pessoa-Silva et al. (2004) em um estudo epidemiológico de infecções nosocomiais relacionadas a neonatos no Brasil, revelaram que assim como a pneumonia, as infecções da

corrente sanguínea constituem as principais infecções nosocomiais que acometem neonatos, e isso se torna substancialmente preocupante ao se tratar de neonatos com peso de nascimento muito baixo. As infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres venosos centrais (CVC) alcançaram nesse estudo a taxa de aproximadamente 35% dos casos diagnosticados e 60% das mortes entre crianças em seu primeiro ano de vida ocorrem durante o período neonatal.

As infecções da corrente sanguínea (ICS) são as mais frequentes infecções nosocomiais em pacientes de Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs) (Mahieu et al., 2001). A incidência acumulada aumentou como resultado da maior taxa de sobrevivência entre recém-nascidos e de uma maior utilização de cateteres venosos centrais (Gladstone et al., 1990). Essas infecções em UTIN contribuem significativamente para a morbidade hospitalar, bem como o aumento de custo devido à prolongada hospitalização sendo, portanto a complicação mais comum e grave relacionadas a cateteres intravenosos (Leroyer et al., 1997; Mahieu et al., 2001).

De 1992 a 2004, a incidência de infecções sanguíneas associadas a cateteres em UTIs pediátricas segundo o National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS 2004) foi de 6,6 por 1000 cateteres/dia (Tabela 2). Em UTINs a taxa de infecção é inversamente proporcional ao peso de nascimento do recém-nascido variando de 9,1 por mil cateteres dias em crianças com peso ao nascimento <1000g a 3,5 por 1000 cateteres dias em crianças com peso de nascimento >2500 g (Tabela 1).

Tabela 1: Incidência de ICSRC em neonatos de acordo com o peso ao nascimento.

Peso (g)	Taxa média 1000 cateteres/dia
≤1000	9.1
1001 - 1500	5.4
1501 - 2500	4.1
>2500	3.5

Fonte:NNIS (2004)

A mortalidade é três vezes maior em neonatos e prematuros com peso de nascimento muito baixo que desenvolvem sepse do que aqueles que não desenvolvem. Na verdade, a sepse é responsável por aproximadamente metade dos óbitos de neonatos e prematuros com peso de nascimento muito baixo e em média na segunda semana de vida (Kaufman & Fairchild, 2004).

Patogênia das ICSRC

As quatro vias pelas quais os microrganismos podem acessar os cateteres intravasculares são: extraluminal, intraluminal, hematogênica ou via infusos contaminados (Figura 1). A pele é a principal fonte para colonização e infecção de cateter de curta duração. As bactérias que estão na pele do paciente migram ao longo de sua superfície, colonizando a extremidade distal, resultando em infecção (Maki, 1991). Entretanto, esses microrganismos também podem colonizar a superfície interna do cateter, onde esses se aderem e podem tornar-se incorporados a um biofilme que permite a sustentação da infecção local e a disseminação hematogênica. Essa colonização intraluminal pode ocorrer através da manipulação da conexão e abertura do sistema pelo paciente ou por profissionais da área da saúde. Quando cateteres são utilizados por longos períodos, a colonização intraluminal é maior do que a extraluminal. Por outro lado, a contaminação por via hematogênica ou infusão de substâncias contaminadas é relativamente incomum (Elliot, 1993; Mermel et al., 2001; Donlan e Costerton, 2002). A contaminação pela via hematogênica ocorre a partir de um foco infeccioso à distância (por exemplo, pneumonia, infecção gastro-intestinal ou do trato urinário), não é uma causa importante de colonização de cateter, e raramente é comprovada (Pettigrew et al., 1985; Kovalevich et al., 1986). As soluções de nutrição parenteral e emulsões

lipídicas promovem o crescimento de muitas bactérias e fungos, como *Candida parapsilosis* e *Malassezia furfur* (CDC, 1971; Maki et al., 1976).

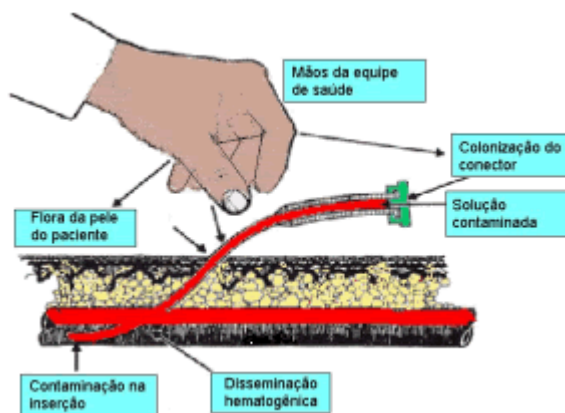


Figura1: Vias de acesso dos microrganismos aos cateteres intravasculares.

O material com o qual é feito o cateter e a virulência intrínseca do microrganismo infectante são fatores patogênicos importantes. Os cateteres feitos com PVC e poliuretano são menos resistentes à aderência microbiana em relação aos que são construídos com *Teflon*® ou silicone. Irregularidades em sua superfície favorecem a aderência de vários microrganismos, como os Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CDC, 2002). Além disso, certos materiais são mais trombogênicos do que outros, uma característica que também pode predispor à colonização do cateter. O *S. aureus* pode aderir à fibronectina, produzida pelo paciente, que recobre o dispositivo. Além disso o polissacarídeo extracelular (biofilme) produzido por ECN e espécies de *Candida*, pode atuar como barreira à fagocitose e bloquear a penetração dos antibióticos (CDC, 2002).

A Tabela 2 demonstra os dados apresentados pelo NNIS de Janeiro de 1992 a Junho de 2004 quanto à incidência de infecções associadas a cateteres de acordo com o tipo de Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Tabela 2: Incidência de ICSRC de acordo com o tipo de UTI.

Tipo de UTI	Taxa média 1000 cateteres/dia
Coronariana	3.5
Cardiotorácica	2.7
Neurocirurgia	4.6
Pediátrica	6.6
Cirúrgica	4.6
Trauma	7.4
Queimadura	7.0
Respiratória	4.8

Fonte: NNIS (2004).

Etiologia das Infecções da Corrente Sanguínea Relacionadas a Cateter

Os ECN são os agentes frequentemente isolados em ICSRC em neonatos, seguidos por *S. aureus* e *Candida parapsilosis*. Das espécies de ECN, o *S. epidermidis* tem sido o mais frequentemente isolado de infecções em neonatos e seu principal fator de virulência é a capacidade de aderir a instrumentos médicos e de formar biofilmes (Villari et al., 2000; Cunha et al., 2002; Cerca et al., 2005). O *S. haemolyticus* é a segunda espécie mais frequentemente isolada entre os ECN, e em seguida as espécies *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis* (Van der Zwet et al., 2002; Center et al., 2003 ;Nancy Tee et al., 2003; Chavez et al., 2005).

Os ECN são capazes de permanecerem viáveis no ambiente hospitalar e em equipamentos médicos por semanas a meses. O aumento da incidência de bacteremia nosocomial por ECN em neonatos nas últimas décadas tem sido associado ao aumento da sobrevivência de neonatos com peso de nascimento muito baixo, a sua longa permanência no ambiente hospitalar e ao aumento do desenvolvimento de resistência a antibióticos. A maior frequência desse microrganismo é devido a sua predominância na microbiota dos recém-nascidos. Contudo, a interpretação de hemoculturas positivas para os ECN é particularmente

difícil devido ao fato desses microrganismos colonizarem a pele e as membranas mucosas durante a coleta de sangue. A esse respeito, investigadores têm usado uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para distinguir contaminação de bacteremia. Assim, o diagnóstico de bacteremia tem sido feito com base nos dados clínicos dos pacientes e no isolamento de microrganismos idênticos em duas ou mais hemoculturas. (Cunha e Lopes, 2002; Cunha et al., 2002; Agvald-Öhman et al., 2004; Cerca et al., 2005; Garland et al., 2005; Kashu et al., 2006).

Diagnóstico das Infecções da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter

Os marcadores clínicos apresentam uma pobre correlação, não sendo em muitos casos suficiente para estabelecer o diagnóstico, em virtude da sua pouca sensibilidade e especificidade. Febre, associada ou não a calafrios, é um marcador bastante sensível, porém, pouco específico, especialmente em pacientes graves para predizer se esta infecção está relacionada ao cateter vascular em UTIs (Eggimann e Pittet, 2002). Sendo assim é de grande importância a utilização de técnicas microbiológicas para confirmação deste tipo de infecção.

Quando o paciente apresenta bacteremia, se questiona se o cateter é a fonte primária dos microrganismos presentes no sangue. A incapacidade de obter as culturas e de abordar esta questão pode levar a um diagnóstico falso-negativo ou falso-positivo. Um diagnóstico falso-negativo certamente pode aumentar a morbidade, enquanto um falso positivo pode resultar na remoção desnecessária do cateter ou na inadequada prescrição de antibióticos. Este resultado é particularmente perigoso porque promove o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos e gera custos excedentes (Hall e Farr, 2004).

Para realização do diagnóstico de infecção relacionada ao uso de cateter devem-se definir algumas categorias dos diferentes fenômenos infecciosos (Elliot, 1993; Garcia et al., 2003):

- Colonização do cateter: crescimento significativo de um microrganismo em cultura quantitativa (≥ 1000 UFC/ml) ou semiquantitativa (≥ 15 UFC) da ponta do cateter, do segmento subcutâneo ou da conexão, esse fenômeno não implica bacteremia e nem requer tratamento.
- Infecção localizada: Com isolamento de microrganismo ou não, podendo ser associada com eritema, edema e exudato purulento, podendo associar-se a outros sintomas e sinais de infecção como febre, com ou sem a presença de infecção da corrente sanguínea concomitante.
- Infecção sistêmica associada com cateter: Bacteremia ou fungemia em paciente com cateter com uma ou mais hemoculturas periféricas positivas, com presença de dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: febre (≥ 38 °C), hipotermia (< 36 °C), apnéia, bradicardia ou sinais de choque, além da presença de pelo menos uma hemocultura positiva em paciente cujo cateter vascular apresentou cultura semiquantitativa ou quantitativa positiva e sem outra fonte aparente de infecção além do cateter, apresentando o mesmo microrganismo no cateter e na hemocultura.

Diagnóstico Molecular das Infecções da Corrente Sanguínea Relacionadas a Cateter

Para a elucidação das ICSRC é fundamental determinar a similaridade das linhagens de microrganismos isoladas das pontas de cateteres e das hemoculturas. Os testes bioquímicos podem determinar o gênero e a espécie do microrganismo 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. Em estudo comparativo entre técnicas moleculares e métodos microbiológicos na determinação das fontes de infecções nosocomiais Martín-Lozano et al. (2002) avaliaram a utilidade do antibiograma para estudos epidemiológicos e concluíram que o diagnóstico da fonte de bacteremia utilizando-se de critérios clínicos convencionais e/ou microbiológicos, incluindo antibiograma, nem sempre são precisos e suficientes.

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 microrganismos é fundamental para a elucidação das ICSRC.

Os sistemas de tipificação molecular podem ser empregados para investigação de surtos, confirmação e delineamento dos padrões de transmissão de um ou mais clones, testes de hipóteses sobre a origem e veículos de transmissão destes clones e monitoramento de seus reservatórios. A análise molecular também é útil para a realização de levantamentos

epidemiológicos e avaliação de medidas de controle por meio da documentação da ocorrência de determinadas cepas ao longo do tempo e circulação de clones em populações infectadas (Nouwen et al., 1998, Santos, 2004).

A aplicação e a interpretação de ferramentas de tipagem microbiana em estudos epidemiológicos requerem a compreensão das limitações das técnicas. Além da confiabilidade, uma técnica é considerada válida quando sua habilidade de discriminação entre cepas é satisfatória e uma base biológica para o agrupamento de cepas com tipos aparentemente distintos é possível (Foxman et al., 2005).

Existem várias técnicas de tipagem molecular que se fundamentam na diferenciação de padrões de perfis genotípicos analisados em amostras de DNA total ou digeridos através de enzimas que fragmentam o DNA em diferentes partes e que podem ser analisados por meio de seus diferentes perfis de restrição. Contudo, os padrões de perfis são nitidamente complexos e os isolados necessitam ser separados através de eletroforese (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Baseado nos princípios da reação em cadeia da polimerase (PCR) o avanço da tipagem molecular foi facilitado, surgindo várias técnicas: o RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA based PCR), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR), AFLP (Amplified-Fragment-Length Polymorphism) e mais recentemente a técnica de Sau-PCR (Restriction Endonuclease Sau3AI Fragment Polymorphism), que podem ser utilizadas na análise do polimorfismo bacteriano.

Método de RAPD-PCR

Em 1990 foi apresentada a técnica de RAPD, Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso, e foi imediatamente adotada pela sua simplicidade e baixo custo, por não requerer

marcadores radioativos e utilizar quantidades mínimas de DNA em relação à técnica clássica de PCR (Enrech, 2000).

O RAPD-PCR é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintas: utiliza um “primer” único ao invés de um par de “primers” e o primer único tem sequência arbitrária, e portanto sua sequência alvo é desconhecida (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O primer único desta reação contém apenas 10 oligonucleotídeos, com um conteúdo mínimo de 60% de citosina e guanina que é anelado em uma temperatura $\geq 37^{\circ}\text{C}$ durante a reação de PCR. Ao usar primers diferentes, pode ser detectado o polimorfismo entre indivíduos (Williams et al., 1990).

No RAPD-PCR o polimorfismo detectado pode ser devido a uma simples troca de um par de bases, inserções ou deleções, que modificam ou eliminam o sítio de inserção do indicador; ou também inserções na sequência genômica que separam os sítios de inserção do indicador a uma distância que não permite a amplificação (Erench, 2000).

A técnica de RAPD quando comparada com outras metodologias, apresenta algumas vantagens. Diferentemente de outros métodos, a técnica de RAPD não necessita de trabalhos preliminares, como a construção de bancos genômicos, pois não requer o desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o microrganismo de interesse. Os segmentos RAPD uma vez amplificados e separados por eletroforese podem ser isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca genômica *in vitro* sem necessidade do uso de vetores, e amplificados via PCR, sempre que necessário. Apresenta um custo mais baixo e uma relativa facilidade metodológica, quando comparada com outras técnicas (Reiter *et al.*, 1992; Haymer & Mcinnis, 1994). A técnica de RAPD necessita de apenas uma pequena quantidade de DNA para a análise genotípica de um indivíduo. Consequentemente,

numerosas reações podem ser feitas a partir do DNA de um único indivíduo (Wilkerson *et al.*, 1995).

Outra vantagem desta técnica é que ela permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos pelo genoma e inclusive mostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os primers utilizados para a detecção de variação são arbitrários, não havendo discriminação entre as regiões codificadoras e não-codificadoras do genoma. A taxa de mutação neste tipo de DNA pode ser elevada; teoricamente qualquer modificação nucleotídica que ocorrer nos segmentos de DNA repetitivo não codificadores tem a chance de ser mantida, se tal mutação for neutra. Assim, estas seqüências de DNA constituem um imenso reservatório de variabilidade genética. Os polimorfismos de DNA produzidos pela técnica de RAPD podem se originar a partir de seqüências repetidas, como podem também ser derivados de seqüências de cópias únicas (Kazan *et al.*, 1992; Haymer & Mcinnis, 1994).

O sucesso desta metodologia a sua repetibilidade podem ser dificultadas devido a problemas relacionados com a padronização de condições de amplificação como a temperatura de anelamento dos primers (Ellsworth *et al.*, 1993; Levi *et al.*, 1993) e um alto número de variáveis envolvidas, incluindo a concentração e a qualidade do DNA molde a ser amplificado (Muralidharan & Wakeland, 1993), a concentração de cloreto de magnésio; a seqüência e a concentração do primer utilizado (Pan *et al.*, 1997), a concentração do dNTP (Stevens & Wall, 1997), a marca comercial da Taq polimerase utilizada, bem como a presença de possíveis contaminantes na mesma (Meunier & Griomont, 1993) e, ainda, o termociclador e o número de ciclos térmicos que será utilizado na reação da PCR (Penner *et al.*, 1993).

Portanto um alto nível de padronização e controle interno no laboratório é necessário para que os dados obtidos por esta metodologia possam ser analisados com confiabilidade e sejam reproduzíveis por outros laboratórios (Black *et al.*, 1992).

Método de REP-PCR

A aplicação de elementos repetitivos de DNA bacteriano (REP-PCR) é tida como uma PCR simples. Apresenta características como: um alto poder discriminatório, reprodutível, de baixo custo e é considerada uma técnica confiável para visualização de fingerprint de uma série de bactérias gram-negativas e gram-positivas. Esta técnica faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservados, com seqüências repetitivas e não codificadoras (geralmente 30 a 500pb) espalhadas pelo genoma bacteriano. Sendo uma estratégia estabelecida para a classificação de subespécies e para o delineamento de cepas das bactérias. Os múltiplos amplicons do DNA de diferentes tamanhos e de várias quantidades (intensidades) são gerados durante o PCR (Healy *et al.*, 2005; Shutt *et al.*, 2005; Gevers *et al.*, 2001).

Os elementos de REP constituem uma família de seqüências repetitivas bem conservadas de 30 a 40 bases em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Essas seqüências são sempre extragenicas e ocorrem no meio ou no final de operons transcritos em seqüências não traduzidas. Eles ocorrem frequentemente em grupos de dois a quatro cópias, essas cópias ocorrem em tandem. Estima-se, que há cerca de 500 a 1.000 seqüências REP por genoma, organizados em cerca de 100 elementos REP, o que representa cerca de 0,5 a 1,0% do genoma total (Stern *et al.*, 1984).

Estudos comparando os métodos de RAPD-PCR e REP-PCR concluem que a validade do método de epidemiologia molecular depende do microrganismo estudado, por exemplo,

segundo Cartelle et al. (2004), para amostras de *Acinetobacter baumannii* a melhor técnica de tipagem foi o REP-PCR.

Referências Bibliográficas

Agvald-Öhman C, Lund B, Edlund C. Multiresistant Coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. Crit Care. 2004;8:42-7.

Black IV, W. C., Duteau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R., Pettorini, J. M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids(Homoptera: Aphididae). Bull of Entomol. 1992;82:151-9.

Bouza E, San JR, Munoz P, Pascal J, Voss A, Desco M. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility. Clin Microbiol and Infect. 2004;10:838-42.

Cartelle M, Tomas M, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, Molina F, Villanueva R, Bou G. Risk factors for colonization and infection in a Hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. J Clin Microbiol. 2004;42:4242-9

CDC. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. MMWR. 2002;51:1-29.

Centers for Disease Control: Nosocomial bacteremia associated with intravenous fluid therapy. MMWR 20(suppl 9). 1971:S1-S2.

Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased Vancomycin susceptibility of Coagulase-negative Staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. J Clin Microbiol. 2003; 41:4660-5.

Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Res Microbiol. 2005;156:506-14.

Chavez F, Garcia-Alvarez M, Sanz F, Alba C, Otero JR. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiospticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2005;43:4877-9.

Cunha MLRS, Lopes CAM. Estudo da produção de β - lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase -negativos isolados de recém-nascidos. J de Ped. 2002;38:281-90.

Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS. Significancia clinica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. J Pediatr. 2002;78:279-88.

Diener JR, Countinho MS, Zoccoli CM. Infecções relacionadas ao cateter venoso central em terapia Intensiva. Rev Ass Med Brasil. 1996; 42: 205-14.

Donlan, RM, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002;15:167-93.

Eggimann P, Pittet D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. Clin Microbiol Infect. 2002;8:295-309.

Elliot TSJ. Line-associated bacteraemias. Comm Dis Rep Rev. 1993;3:91-5.

Ellsworth D, Rittenhouse KD, Honeycutt RL. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *BioFeedback*. 1993;14: 214-7.

Enrech NX. Una decada de aplicacion del metodo rapd: alcances y limites en el estudio de relaciones geneticas en plantas. *Acta Cient Ven*. 2000; 51: 197–206

Ferreira ME, Grattapaglia DG. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º ed. Brasília-DF: Embrapa-Cenargen, 1998.

Foxman B, Zhang L, Koopman, JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspec & Innov*. 2005;2:1-8.

Garcia PC, Payá EG, Olivares RC, Cotera EF, Rodriguez JT, Sanz MR. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrales. *Rev Chil Infect*. 2003;20:41-50.

Garland JS, Alex CP, Henrickson KJ, McAuliffe TL, Maki DG .A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. *Pediatrics*. 2005;116:198-205.

Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J*. 1990;9:819-25.

Gevers D , Huys G , Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species *FEMS Microb* . 2001: 31-36

Hall K, Farr B. Diagnosis and management of long-term central venous catheter infections. *J Vasc Interv Radiol*. 2004;15:327-34.

Haymer DS, Mcinnis DO. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Gen.* 1994; 37: 244-8.

Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick, A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. Microbial DNA typing automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43:199-207.

Kashu M, Osioviich H, Hendry D, Khotani AA, Solimano A, Speert DP. Persistent bacteremia and severe thrombocytopenia caused by Coagulase-negative *Staphylococcus* in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics.* 2006;117:340-8.

Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:638-80.

Kazan K, Manners JM, Cameron DF. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in an interspecific cross in the genus *Stylosanthes*. *Gen.* 1992 ;36: 50-6.

Kovalevich DS, Faubion WC, Bender JM, Schaberg DR, Wesley JR. Association of parenteral nutrition catheter sepsis with urinary tract infections. *Parenter Enteral Nutr.* 1986;10:639-641.

Leroyer A, Bedu A, Lombrail P, Desplanques L, Diakite B, Bingen E, Aujard Y, Brodin M. Prolongation of hospital stay and extra costs due to hospital-acquired infection in a neonatal unit. *J Hosp Infect.* 1997;35:37-45.

Levi, A., Rowland, J., Hartung, J. S. Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woods plants. *Hort. Scien.* 1993; 28: 1188-90.

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. *The J of Hosp Inf.* 2001;48:20-6.

Maki DG, Alvarado CJ, Ringer M. Prospective randomized trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet.* 1991;338:339–43.

Maki DG, Rhame FS, Mackel DC, Bennet, Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products. *Am J Med.* 1976; 60:471-485.

Martín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, Canas E, Pachón, J. Comparison of a Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Method and Clinical and Microbiological Methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbial.* 2002;40:4571-5.

Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE. Guidelines for the Management of Intravascular Catheter–Related Infections. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1249-72.

Meunier, J. R., Grimont, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 1993;144: 373-9.

Muralidharan, K., Wakeland, E. K. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechn.* 1993;14:362-3.

Nancy Tee WS, So SY, Lin R, Loo LH. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the mecA gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. J Clin Microbiol. 2003;41:519-20.

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.

Nouwen, JL, van Belkum A, Marie S, Sluijs J, Wielenga JJ, Kluytmans JAJW, Verbrugh HA. Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter-related infections in a hemato-oncologic department. J Clin Microbiol. 1998;36:2696-702.

Pan, Y. B., Burner, D. M., Ehrlich, K. C., Grisham, M. P., Wei, Q. Analysis of primer-derived, nonspecific amplification products RAPD- PCR. BioTechn. 1997;22:1071-5.

Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S. J., Fedak, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. PCR Meth Appl. 1993;2:341-5.

Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos RMR, Costa MLM, Frota ACC, Wey SB. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. Infect Control and Hosp Epidemiol. 2004;25:772-7.

Pettigrew RA, Lang DSR, Haycock DA, Parry BR, Bremner DA, Hill GL. Catheter-related sepsis in patients on intravenous nutrition: A prospective study of quantitative catheter cultures and guideline changes for suspected sepsis. Br J Surg. 1985;72:52-55.

Reiter RS, Williams JGK, Feldmann KA, Rafalski JA, Tingey SV, Scolnik PA. Global and local genome mapping in *A.thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphicDNAs. Proc. Natl. Acad, Sci. 1992;89: 1477-81.

Santos LR. Standardization of RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) for fingerprinting of *Salmonella enteritidis*. Rev Fac Zoo Vet Agro. 2004;10:72-86.

Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab Microbial Typing System using Repetitive-Sequence-Based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbial. 2005; 43:1187-92.

Stern MJ, Ames GFL, Smith NH, Robinson EC, Higgins CF. Repetitive extragenic palindromic (REP)sequences: a major component of the bacterial genome. Cell. 1984; 37:1015-26.

Stevens, J., Wall, R. Genetic variation in populations of the blowflies *L.cuprina* and *L. sericata* (Diptera: Calliphoridae). Random amplified polymorphic DNA analysis and mitochondrial DNA sequences. Biochemical Syst. Ecol.1997; 25: 81-97.

Van der Zwet WC, Debets-Ossenkopp YJ, Reinders E, Kapi M, Savelkoul PHM, Van Elburg RM, Hiramatsu K, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to Vancomycin in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbial. 2002;40:2520-5.

Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. J Clin Microbiol. 2000;38:1740-6.

Warren DK, Yokoe DS, Climo MW, Herwaldt LA, Noskin GA, Zuccotti G, Tokars JI, Perl T M, Fraser V J. Preventing catheter-associated bloodstream infections: a survey of policies for insertion and care of central venous catheters from hospitals in the prevention epicenter program. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006;27:8-13.

Wilkerson RC, Gaffigan TV, Lima JB. Identification of species related to *Anopheles albitarsis* by RAPD-PCR (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Osw Cr.* 1995;90:721-32.

Williams JK, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey, s. v. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 1990;18:6531-35.

Objetivos

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar por meio de uma tipagem molecular o perfil genômico de microrganismos relacionados a processos infecciosos isolados de cateteres e hemoculturas obtidos de recém-nascidos (RN) através de técnicas baseadas em PCR e comparar através do agrupamento por coeficientes de similaridade as amostras isoladas de cateteres e hemoculturas para o diagnóstico de infecção da corrente sanguínea relacionada com cateteres (ICSRC) em recém-nascidos.

Objetivos Específicos

- Verificar a etiologia das infecções relacionadas a cateter em recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital da FMB.
- Analisar o perfil genômico de microrganismos isolados de cateteres e hemoculturas obtidos de recém-nascidos pelas técnicas baseadas na reação de PCR: RAPD-PCR e REP-PCR, agrupados através do coeficiente de similaridade (*Sab*), na avaliação de infecções da corrente sanguínea relacionada a cateter (ICSRC).
- Comparar os métodos genotípicos com o perfil fenotípico de similaridade na avaliação de ICSRC em recém-nascidos.
- Comparar a técnica de tipagem molecular baseada em RAPD-PCR com a técnica de REP-PCR na análise do perfil genômico de microrganismos isolados de cateteres e hemoculturas obtidos de recém-nascidos, agrupados

através do coeficiente de similaridade (*Sab*), na avaliação de infecções da corrente sanguínea relacionada a cateter (ICSRC).

- Verificar a presença de clones envolvidos com as ICSRC na UTIN do Hospital da FMB.

Capítulo 1

Caracterização genotípica de microrganismos isolados de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres em recém-nascidos.

Leticia T Pazzini¹, Eliane P Silva¹, Adriano Martison¹, João C Lyra², Maria R Bentlin², Marcus P Rodrigues¹, Lígia MSS Rugolo², Maria de Lourdes RS Cunha¹

¹UNESP- Univ Estadual Paulista, Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil.

² UNESP- Univ Estadual Paulista, Departamento de Pediatria - Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente: Maria de Louders R. S. da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia-Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.Caixa Postal 510, CEP 18618-970

E-mail:

LTP: leticia-pazzini@ig.com.br

EPS: eliane_bio10@yahoo.com.br

AM: adrianomartison@hotmail.com

JCL: jc.lyra@uol.com.br

MRB: mbentlin@fmb.unesp.br

MPR: mv_rodrigues@hotmail.com

LMSSR: ligiam@fmb.unesp.br

MLRSC: cunhamlrs@ibb.unesp.br

Artigo conforme normas da revista *BMC Pediatrics*

Abstract

Introduction

Catheter-related infections constitute one of the main causes of bacteremia in neonatal ICUs. The aim of the present study was to analyze, by means of molecular typing techniques, the similarity between microorganisms isolated from catheters and blood cultures for the diagnosis of catheter-related bloodstream infection in newborns.

Methods

The evaluation included 124 catheter tips and 155 concomitant blood cultures from 107 newborns in a Neonatal Unit. For the catheter culture, the semiquantitative and qualitative method or the semiquantitative and quantitative method was used, as well as blood cultures kept by the automated system Bactec. For the phenotypic analysis of similarity between isolates from catheter tips and blood cultures, the test of sensitivity to antimicrobial drugs using the technique of drug diffusion in agar was adopted. For the genotypic analyses of similarity profiles between isolates from catheter and concomitant blood culture and for the clonal profile design of *S. epidermidis* samples isolated from blood cultures, the techniques RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-based PCR) and REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-based PCR) were employed.

Results

Of the 107 studied newborns, 45 had the same microorganism in the catheter tip and in the blood culture concomitantly; of this total, 86.7% were colonized with coagulase-negative *Staphylococcus*, 4.4% with *Staphylococcus aureus*, 4.4% with *Candida parapsilosis*, 2.2% with *Enterococcus faecalis*, and 2.2% with *Pseudomonas aeruginosa*. The assessment of similarity between isolates indicated that, of the 45 newborns, 46.7% had catheter-related bloodstream infections according to the agar disk diffusion method, and 68.9% had catheter-related bloodstream infections according to RAPD-PCR using group-1 primers (RAPD1 for *Staphylococcus* spp., RAPD 7 for *Enterococcus faecalis*, ERIC 1 for *Pseudomonas aeruginosa*, and OPR13 for *Candida parapsilosis*). The use of RAPD-PCR with group-2 primers (M13 for *Staphylococcus* spp., OP13 for *Enterococcus faecalis*, ERIC 2 for *Pseudomonas aeruginosa*, and OPR18 for *Candida parapsilosis*) indicated that 64.4% newborns had catheter-related bloodstream infection, whereas REP-PCR revealed 62.2%. The analysis of the clonal profile of *S. epidermidis* samples isolated from blood cultures indicated that all major clusters (similarity coefficient ≥ 70) were associated with catheter-related infection; in addition, the presence of clones persistent to *S. epidermidis* was detected in the neonatal ICU for up to 7 years.

Conclusions

S. epidermidis was the microorganism most frequently present in catheter-related bloodstream infections. The genotypic methods yielded the best results in the determination of similarity between microorganisms relative to the phenotypic method in the comparison of profiles of sensitivity to antimicrobials. Clones persistent to *S. epidermidis* were detected and caused catheter-related bloodstream infection in the neonatal ICU of the Clinical Hospital of

Botucatu Medical School. Both techniques, RAPD-PCR and REP-PCR, had a good discriminating capacity; however, RAPD-PCR yielded the best results when compared to REP-PCR in the determination of bloodstream infections and *S. epidermidis* clonal profile.

Resumo

Introdução

As infecções relacionadas a cateteres constituem uma das principais causas de bacteremias em UTIs neonatais. O objetivo do presente estudo foi analisar por meio de técnicas de tipagem molecular a similaridade dos microrganismos isolados de cateteres e hemoculturas para o diagnóstico de infecção da corrente sanguínea relacionada com cateteres em recém-nascidos.

Métodos

Foram avaliadas 124 pontas de cateteres e 155 hemoculturas concomitantes de 107 recém-nascidos da Unidade Neonatal. Foram utilizados para cultura de cateter o método semiquantitativo e qualitativo ou método semiquantitativo e quantitativo, e as hemoculturas cultivadas pelo sistema automatizado Bactec. Para a análise fenotípica da similaridade dos isolados de pontas de cateteres e hemoculturas foi utilizado o teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas pela técnica da difusão da droga em ágar. Para análise genotípica do perfil de similaridade dos isolados de cateter e hemocultura concomitantes e para o delineamento do perfil clonal das amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas foram utilizados as técnicas de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA based PCR) e REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR).

Resultados

Dos 107 recém-nascidos estudados, 45 apresentaram o mesmo microrganismo na ponta de cateter e na hemocultura concomitantemente, desse total 86.7% apresentaram colonização por *Staphylococcus* coagulase-negativa, 4.4% por *Staphylococcus aureus*, 4.4% por *Candida*

parapsilosis, 2.2% por *Enterococcus faecalis* e 2.2% por *Pseudomonas aeruginosa*. A determinação da similaridade dos isolados revelou que dos 45 recém-nascidos, 46.7% apresentaram infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter pelo método de disco difusão em ágar, 68.9% apresentavam infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter com a utilização da técnica de RAPD-PCR com os primers do grupo 1 (RAPD1 para *Staphylococcus* spp., RAPD 7 para *Enterococcus faecalis*, ERIC 1 para *Pseudomonas aeruginosa* e OPR13 para *Cândida parapsilosis*). A utilização de RAPD-PCR com os primers do grupo 2 (M13 para *Staphylococcus* spp., OP13 para *Enterococcus faecalis*, ERIC 2 para *Pseudomonas aeruginosa* e OPR18 para *Cândida parapsilosis*) revelou 64.4% dos recém-nascidos com infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter, enquanto a técnica de REP-PCR revelou 62.2%. A análise do perfil clonal das amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas demonstrou que todos os clusters majoritários (coeficiente de similaridade ≥ 70) estavam associados com infecção relacionada a cateter, além disso, foi verificada a presença de clones persistentes de *S. epidermidis* na UTI neonatal por um período de até 7 anos.

Conclusões

O *S. epidermidis* foi o microrganismo mais presente em infecções da corrente sanguínea relacionada a cateter. Os métodos genotípicos apresentaram melhores resultados na determinação da similaridade dos microrganismos em relação ao método fenotípico de comparação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Foi identificada a existência de clones persistentes de *S. epidermidis* ocasionando infecção da corrente sanguínea relacionada a cateter na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Ambas as técnicas RAPD-PCR e REP-PCR apresentaram um bom poder discriminatório,

porém a técnica RAPD-PCR apresentou melhores resultados quando comparada com a técnica REP-PCR para determinação de infecções da corrente sanguínea e determinação do perfil clonal de *S. epidermidis*

Introdução

O uso de cateteres vasculares representou um grande avanço no diagnóstico e na terapêutica em medicina, pois muitos procedimentos clínicos e cirúrgicos puderam ser realizados a partir do desenvolvimento desta tecnologia. Entretanto o dispositivo apresenta um fácil acesso dos microrganismos para a corrente sanguínea por ser um contato direto do meio externo com o meio interno [1]. As infecções relacionadas a cateteres constituem uma das principais causas de bacteremia nosocomial primária [2,3].

As altas taxas de Infecções da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC) associado ao crescente aumento das taxas de resistência tornam essas infecções particularmente preocupantes [4]. Várias condições têm sido apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de ICSRC, tais como a duração do cateterismo, a colonização cutânea no local da introdução do cateter, e a manipulação frequente da linha venosa. Associados a esses fatores, os mecanismos imunológicos imaturos dos recém-nascidos (RN) principalmente prematuros, fazem com estes sejam particularmente susceptíveis a essas infecções [5].

Em um estudo realizado em Hospital de Ensino do Brasil [6] analisou-se a frequência e o perfil das infecções hospitalares em neonatos para avaliação dos principais fatores de risco e óbito em 2.402 recém-nascidos, sendo encontrado uma taxa média de infecções hospitalares neonatais de 18,3%. A infecção mais freqüente foi a sepse (49,1%), que esteve relacionada ao tempo de hospitalização superior a 60 dias e aos procedimentos invasivos como o cateterismo vascular, que aumentou três vezes o risco para sepse e 2,5 vezes o risco de óbito.

O peso do recém-nascido é um fator predisponente para o desenvolvimento das ICSRC. Em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTINs) a taxa de infecção é inversamente proporcional ao peso de nascimento do recém-nascido variando de 9,1 por mil cateteres dias em crianças com peso ao nascimento <1000g a 3,5 por 1000 cateteres dias em

crianças com peso de nascimento >2500 g. Aproximadamente 20% dos neonatos prematuros com peso de nascimento muito baixo (inferior a 1.500g) experimentam uma infecção sistêmica durante sua estada inicial no hospital. [7]

Os *Estafilococos coagulase-negativa* (ECN) são importantes agentes etiológicos das bacteremias em UTINs, liderando em levantamento realizado pelo NNIS entre 1992 e 1999 [8], com 37% dos casos das infecções relacionadas com cateteres. Esses microrganismos são reconhecidos como essencialmente oportunistas, pois fazem parte da microbiota cutânea, e em pacientes imunodeprimidos como os neonatos podem causar graves infecções .

O material com o qual é feito o cateter e a virulência intrínseca do microrganismo infectante são fatores patogênicos importantes. Irregularidades em sua superfície favorecem a aderência de vários microrganismos, sendo que os cateteres mais trombogênicos também favorecem a infecção. O *S. aureus* pode aderir na fibronectina, produzida pelo paciente, que recobre o dispositivo. Um polissacarídeo extracelular é produzido por alguns microrganismos como os ECN, *Candida* e outros microrganismos formando o biofilme, que atua como barreira à fagocitose e bloqueia a penetração dos antibióticos [9].

Os marcadores clínicos apresentam uma pobre correlação, não sendo em muitos casos suficiente para estabelecer o diagnóstico de ICSRC, em virtude da sua pouca sensibilidade e especificidade. Febre, associada ou não a calafrios, é um marcador bastante sensível, porém, pouco específico, especialmente em pacientes graves para predizer se esta infecção esta relacionada ao cateter vascular em UTIs [10]. Portanto é de grande importância a utilização de técnicas microbiológicas para confirmação deste tipo de infecção.

Para a elucidação das ICSRC é fundamental determinar a similaridade das linhagens de microrganismos isoladas das pontas de cateteres e das hemoculturas. Os testes bioquímicos podem determinar o gênero e a espécie do microrganismo em questão, e o antibiograma pode

determinar a similaridade das amostras isoladas de cateter e hemocultura a partir do perfil de sensibilidade da bactéria, auxiliando não só no tratamento das ICSRC, mas também no diagnóstico dessas infecções. Entretanto, muitas vezes o diagnóstico utilizando-se de critérios clínicos convencionais e/ou microbiológicos, incluindo antibiograma, nem sempre são precisos e suficientes. Vários dos problemas são resultantes da expressão variável de características fenotípicas que são utilizadas como parâmetros.

Por essas razões, significantes esforços tem sido realizados no sentido de desenvolver métodos alternativos que combinam facilidade, confiabilidade e baixo custo. Surgiram então as técnicas de tipagem molecular que podem representar um potencial discriminatório adicional, principalmente porque não dependem da expressão de genes para avaliação. Alguns desses métodos são baseados nos princípios da reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como o RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA based PCR) e o REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR). O RAPD-PCR é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintas: utiliza um “primer” único ao invés de um par de “primers” e o primer único tem sequência arbitrária e, portanto sua sequência alvo é desconhecida [11]. O REP-PCR faz uso de primers de DNA complementares àqueles de ocorrência natural, altamente conservado, com seqüências repetitivas e não codificadoras (geralmente 30 a 500pb) [12]. Esses métodos apresentam a vantagem de um custo mais baixo e uma relativa facilidade metodológica, quando comparada com outras técnicas.

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, esse trabalho objetivou analisar por meio de técnicas de tipagem molecular o perfil genômico de microrganismos isolados de cateteres e hemoculturas através de técnicas

baseadas em PCR e comparar através do agrupamento por coeficientes de similaridade as amostras isoladas de cateteres e hemoculturas para o diagnóstico de ICSRC em recém-nascidos.

Material e Métodos

Microrganismos

Para o presente estudo foram estudados microrganismos isolados de pontas de cateteres e hemoculturas provenientes de recém-nascidos internados na Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), no período de outubro de 2001 a novembro de 2009.

CrITÉRIOS de inclusão

Foram incluídas no presente estudo pontas de cateteres isoladas de RN que possuíam hemoculturas coletadas próximas à data de remoção dos cateteres.

CrITÉRIOS de exclusão

Foram excluídas do estudo pontas de cateteres isoladas de RN que não apresentaram hemoculturas coletadas próximas à data de remoção dos cateteres ou hemoculturas negativas.

Cultura de cateter

Todas as de pontas de cateteres coletadas de 2001 a 2009 foram cultivadas pelo método semiquantitativo proposto por Maki et al.[13]. As pontas coletadas de 2001 a 2005

também foram cultivadas pelo método qualitativo e as pontas coletadas de 2005 a 2009 foram cultivadas pelo método quantitativo segundo Brun-Buisson [14].

Os cateteres foram removidos assepticamente pela equipe médica 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 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 catéter, agitando por um minuto em vortex 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 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. [15].

Identificação dos microrganismos

Os microrganismos que se desenvolveram nas culturas foram submetidos à coloração de Gram objetivando-se sua pureza e a observação de sua morfologia e coloração específica. Após a confirmação dessas características, foram feitas as provas de identificação conforme

preconizado por Koneman et al. [15]. Após identificação os isolados foram armazenados em caldo nutriente acrescido de 10% de glicerol e mantidos a -70°C para posterior análise genotípica.

Identificação de *Estafilococos* coagulase-negativa (ECN)

Para essa identificação foram utilizados os critérios propostos por Cunha et al. [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, arabinose, sacarose, trealose, manitol, maltose, lactose, xylitol, ribose e frutose, bem como da caracterização de hemolisinas, redução de nitrato, urease, ornitina descarboxilase e sensibilidade à novobiocina. Após identificação os isolados foram armazenados em caldo nutriente acrescido de 10% de glicerol e mantidos a -70°C para posterior análise genotípica.

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 [17]. Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI dos microrganismos 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 para as amostras de *Staphylococcus* foram: Penicilina G (10U), Oxacilina (1µg), Tetraciclina (30µg), Eritromicina (15µg), Cefalotina (30µg), Gentamicina (30µg), Rifampicina (5µg) e Vancomicina (30µg). Para as amostras de *Enterococcus faecalis*

foram utilizados discos de Penicilina G (10U), Ampicilina (10µg), Ciprofloxacina (5µg), Vancomicina (30µg), Estreptomicina (10µg), Tetraciclina (30µg), Teicoplanina (30µg), Gentamicina (30µg) e Nitrofurantoina (300µg); para *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizados discos de Levofloxacina (5µg), Sulfametoxazol/Trimetoprim (23,75µg /1,25µg), Ticarcilina/Ácido clavulânico (75µg/10µg), Piperacilina/Tazobactam (100µg/10µg), Imipenem (10µg), Ceftazidima (30µg), Ceftriaxone (30µg), Gentamicina (30µg), Amicacina (30µg), Cefepime (30µg), Ampicilina/Sulbactam (10µg/10µg), Tobramicina (10µg), Meropenem (10µg), Ciprofloxacina (5µg) e para *Candida parapsilosis* discos de Fluconazol (25µg) e Anfotericina B (100 µg).

Definições

- Colonização significativa dos cateteres: Este termo foi empregado para pontas de cateteres com crescimento nas placas de ágar sangue de ≥ 15 UFC pela cultura semiquantitativa e ≥ 1000 UFC/mL pela cultura quantitativa.
- Infecção da corrente sanguínea relacionada a cateteres (ICSRC): Foi definida na presença de pelo menos uma hemocultura positiva em paciente com cateter vascular e crescimento de ≥ 15 UFC na cultura semiquantitativa de cateter e/ou ≥ 1000 UFC/mL na cultura quantitativa, com isolamento do mesmo microrganismo (espécie e perfil de sensibilidade antimicrobiana) encontrado em hemocultura periférica. Pelos testes genotípicos foram definidas como ICSRC o isolamento de microrganismos da mesma espécie e com coeficiente de similaridade ≥ 70 no cateter e na hemocultura concomitante.

Extração do DNA genômico

O ácido nucleico total foi extraído a partir das linhagens 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). Após a digestão inicial das células com os tampões descritos acima, 500 µl da solução de extração foi adicionada à mistura e esta foi centrifugada a 10.000 x g por 4 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 foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µl da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida a centrifugação a 20.000 x g 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. Posteriormente foi feita a leitura espectrofotométrica nos comprimentos de onda de A_{260} e A_{280} de uma diluição 1:100 do ácido nucleico extraído, utilizando os seguintes cálculos para avaliação da quantidade e determinação da qualidade/pureza:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição}$$

$$\text{Determinação Qualidade/Pureza: } A_{280}/A_{260} \geq 2,0 \text{ ideal}$$

Seleção dos primers

Foram testados primers aleatórios da Operon Technology Inc. (OPT13, OPR18, OPR13, OPK18 e OPERON21) e da Invitrogen (RAPD1, RAPD7, M13, 1026, Random primer, ERIC1 e ERIC2) para padronização das reações de RAPD. Foram selecionados para o estudo os primers mais reprodutíveis, com maior capacidade de diferenciação e com bandas mais bem definidas e fortes para cada grupo de microrganismos. Para a avaliação da capacidade de diferenciação dos primers, foram utilizadas linhagens de padrão internacional (ATCC), incluindo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35983, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Staphylococcus simulans* ATCC 27851, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Também foram utilizadas amostras da mesma espécie das estudadas, mas não relacionadas, como por exemplo amostras provenientes de outro hospital. Procurou-se selecionar primers que apresentavam no mínimo seis bandas bem definidas. Para melhor reprodutibilidade da técnica de RAPD-PCR foram selecionados dois primers para cada gênero ou espécie de microrganismo estudado (Tabela 1).

Tabela 1: Primers selecionados para a técnica de RAPD-PCR

Microrganismo	Primers (grupo)	Nº de bases	Sequência das bases
<i>Staphylococcus sp.</i>	RAPD1(1)	10	5' -CAA TCG CCG T- 3'
	M13(2)	12	5' -GAG GTT GGC GGT- 3'
<i>C. parapsilosis</i>	OPR13(1)	10	5' -GGA CGA CAA G- 3'
	OPR18 (2)	10	5' -GGC TTT GCC A- 3'
<i>E. faecalis</i>	RAPD7 (1)	10	5' -GTG GAT GCG A-3'
	OPT13 (2)	10	5'- AGG ACT GCC A- 3'
<i>P. aeruginosa</i>	ERIC 1 (1)	22	5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C- 3'
	ERIC 2 (2)	22	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

Otimização do protocolo das reações baseadas em RAPD-PCR

A otimização do protocolo das reações baseadas em RAPD-PCR teve por objetivo definir as concentrações ideais de cada componente das reações baseadas em PCR, para cada grupo de microrganismo em estudo, a fim de se obter bandas com concentrações de DNA genômico consideráveis para realização da tipagem.

Para as reações de RAPD-PCR foram utilizadas reações iniciais baseadas segundo recomendações de Cartelle et al [18]. A 1ª reação de otimização realizada foi o estabelecimento da concentração ideal de Enzima Taq DNA Polimerase, sendo testadas as seguintes concentrações: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0 e 2.5 Unidades. Na segunda reação de otimização realizada foi feito o estabelecimento da concentração ideal de Cloreto de Magnésio, onde foram testadas as seguintes concentrações: 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.5 mM. Na terceira reação foi realizado o estabelecimento da otimização da concentração ideal do DNA alvo, sendo testadas as seguintes concentrações: 5,

10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 ng/ μ L. Finalmente na quarta reação de otimização foi realizado o estabelecimento da concentração ideal do primer onde foram testadas as seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 ng/ μ L.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados obtidos na otimização das reações de RAPD-PCR para *Staphylococcus* spp., *C. parapsilosis*, *E. faecali* e *P. aeruginosa*.

Tabela 2: Padronização das reações de RAPD-PCR para *Staphylococcus* spp.

Master mix RAPD-PCR	ECN		<i>S. aureus</i>	
	Primers		Primers	
	RAPD1 (μ l)	M13 (μ l)	RAPD1 (μ l)	M13 (μ l)
Água	16,35	15,05	13,95	13,35
Buffer 10X	3	3	3	3
DNTPs (10 mM)	0,75	2,4	0,75	3
MgCL ₂ (50 mM)	1,2	0,75	1,5	0,75
Primer (10ng/ μ l)	5	5	7	7
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,7	0,8	0,8	0,9
DNA (5 ng/ μ l)	3	3	3	2
Total	30	30	30	30

Tabela 3: Padronização das reações de RAPD-PCR para *C. parapsilosis*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

	<i>C. parapsilosis</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
			Primers			
Master mix RAPD-PCR	OPR13 (μ l)	OPR18 (μ l)	OPT13 (μ l)	RAPD7 (μ l)	ERIC1 (μ l)	ERIC2 (μ l)
Água	15,35	15,65	12,55	12,35	18,8	17,8
Buffer 10X	3	3	3	3	3,0	3,0
DNTPs (10 mM)	0,75	0,75	0,75	0,75	1,5	1,5
MgCL ₂ (50 mM)	1,5	1,2	3	1,2	1,2	1,2
Primer (10ng/ μ l)	6	6	7	9	2,0	3,0
Taq DNA polimerase (5U/ μ l)	0,4	0,4	0,7	0,7	0,5	0,5
DNA (5 ng/ μ l)	3	3	3	3	3	3
Total	30	30	30	30	30	30

Foram testadas diferentes temperaturas de anelamento em termociclador (Modelo PTC-100, MJ Researcher Inc. Watertown, MA, USA). Para os primers RAPD1, RAPD7, ERIC1, ERIC2, OPT13, OPR13 e OPR18 a condição de amplificação mais adequada foi de um 1° ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 min., anelamento a 40°C por 1 min. e extensão a 72°C por 2 min., seguidos por 33 ciclos a 94 °C por 10 seg., anelamento a 40°C por 20 seg., extensão a 72°C por 2 min. e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Para o primer M13 a condição de amplificação foi de um 1° ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 min seguidos de 35 ciclos a 94°C por 1 min., 25°C por 1 min, 72°C por 4 min e um ciclo final de 94°C por 1 min, 25°C por 1 min e 72°C por 8 min.

Protocolo das reações baseadas em REP-PCR

Para a reação de REP-PCR foi utilizado 12µl de água, 9µl de Master Mix Kit (1,5mM MgCl₂), 6 µl de primer RW3a e 3µl de DNA.

Para a reação de REP-PCR a melhor condição de amplificação foi de um ciclo de desnaturação à 94°C por 3min, seguidos de 30 ciclos à 94°C por 1 min, 54°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma extensão final à 72°C por 5 min.

Obtenção por eletroforese dos produtos amplificados

O DNA amplificado pelos métodos genotípicos utilizados (RAPD-PCR, REP-PCR) foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Vivantis) em tampão TBE 1x (Tris 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2mM pH 8,0) durante 2 horas e 40 minutos a 80 volts. Em todos os géis foram utilizados marcadores de peso molecular 100 bp (Norgen Biotek Corporation) para análises das posições dos fragmentos amplificados. Os produtos de amplificação, separados no gel, foram corados com Gel Red e, posteriormente fotografados sob luz ultravioleta.

Análises dos perfis obtidos pelos métodos genotípicos

Os dendogramas foram gerados usando coeficientes da similaridade (S_{ab}) baseados nas posições das bandas analisadas com o programa BioNumerics, Applied Maths versão 5.10 utilizando para análise o coeficiente de Sorensen-Dice/UPGMA com otimização de 1.5 e tolerância 2.0, considerando para análise valores de similaridade $S_{ab} \geq 70$ e $S_{ab} \geq 80$ [19].

O coeficiente S_{ab} mede a proporção das bandas com os mesmos pesos moleculares pelas seguintes fórmulas: $S_{ab} = 2E/(2E + a + b)$ para Coeficiente Sorensen-Dice, que desconsidera a ausência conjunta de bandas, onde E é o número de bandas comuns em A e B, a é o número de bandas somente no isolado A e b é o número de bandas encontradas somente no isolado B.

Para a verificação do coeficiente de Sorensen-Dice entre os isolados de cateter e hemocultura foram gerados 3 dendogramas para cada um dos 45 pacientes que apresentaram a mesma espécie de microrganismo no cateter e na hemocultura. Dois desses dendogramas eram provenientes de amostras processadas pelo método de RAPD-PCR, e o outro pelo método de REP-PCR.

Determinação do perfil clonal das amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas

Para a determinação do perfil clonal das amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos da UTI neonatal do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) foi utilizada a técnica de RAPD-PCR com primer RAPD1, RAPD-PCR com primer M13 e o método de REP-PCR. Foram incluídas as amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas dos 45 recém-nascidos que no período de outubro de 2001 a novembro de 2009 apresentaram o mesmo microrganismo no cateter e hemocultura. Para isso foi construído um dendograma para cada uma das técnicas e primers utilizados. Para análise foi utilizado o coeficiente de Sorensen-Dice considerando para essa análise valores de similaridade $S_{ab} \geq 70$ e $S_{ab} \geq 80$.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo teste X^2 ou teste exato de Fisher. O nível de significância para todos os testes foi $p < 0,05$.

Resultados

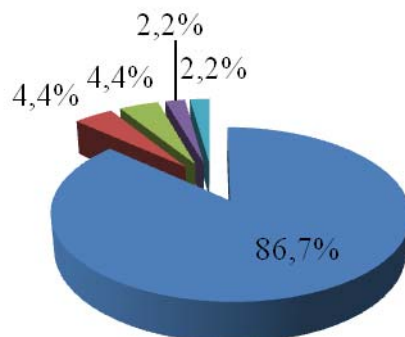
Cultura de Cateter

Foram cultivadas 124 pontas de cateteres isoladas de 107 recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de 2001 a 2009. Dessas 124 pontas 70 foram isoladas no período de 2001 a 2005 e cultivadas pelas técnicas semiquantitativa e quantitativa concomitantemente, enquanto 54 foram isoladas no período de 2005 a 2009 e cultivadas simultaneamente pelas técnicas semiquantitativa e quantitativa. Para a avaliação de ICSRC foram analisadas 155 hemoculturas coletadas próximas à data de remoção das pontas de cateteres.

Identificação dos microrganismos

Dos 107 recém-nascidos 45 (42,0%) apresentaram pontas de cateteres com crescimento significativo da mesma espécie de microrganismo isolada nas hemoculturas. Desse total 39 (86,7%) apresentaram colonização por ECN, 2(4,4%) por *Staphylococcus aureus*, 2 (4,4%) por *Candida parapsilosis*, 1(2,2%) por *Enterococcus faecalis* e 1(2,2%) por *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 1). A análise desses resultados mostrou um isolamento

significativamente maior de ECN ($p < 0,0001$) quando comparado com os outros microrganismos encontrados.



■ ECN ■ *S. aureus* ■ *C. parapsilosis* ■ *E. faecalis* ■ *P. aeruginosa*

Figura 1: Distribuição dos microrganismos isolados de pontas de cateteres e hemoculturas de recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Dos 39 (86.7%) isolados de ECN, a espécie *S. epidermidis* foi significativamente a mais encontrada ($p < 0,0001$), com 36 (80%) das amostras identificadas como *S. epidermidis*, 2 (4.4%) *S. haemolyticus* e 1 (2.2%) *S. simulans* (Figura 2).

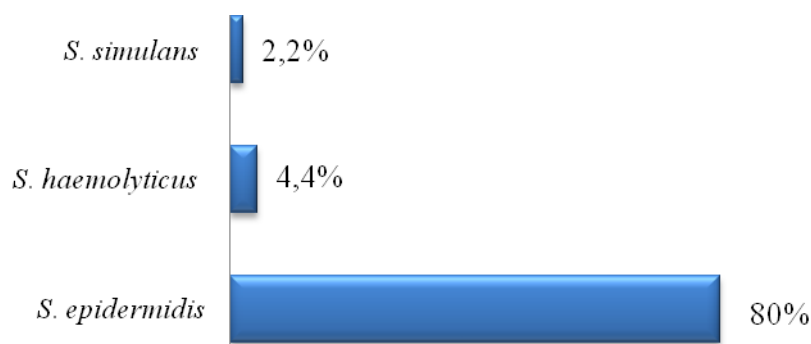


Figura 2: Distribuição dos ECNs isolados de pontas de cateteres e hemoculturas de recém-nascidos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Sensibilidade às drogas antimicrobianas

Para a análise fenotípica da similaridade dos isolados de pontas de cateteres e hemoculturas foi utilizado o teste de sensibilidade às drogas antimicrobianas pela técnica da difusão da droga em ágar, sendo observado que do total de 45 recém-nascidos com a mesma espécie de microrganismo no cateter e na hemocultura 21(46.7%) apresentaram microrganismos com o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados. Desses pacientes, 14(66,7%) apresentaram microrganismos com o mesmo perfil nas amostras obtidas a partir das duas culturas de cateter e da hemocultura, enquanto 7 (33,3%) apresentaram isolados com o mesmo perfil apenas em uma das culturas do dispositivo e na hemocultura.

Análises dos perfis obtidos pelos métodos genotípicos

Através da técnica de RAPD-PCR utilizando os primers do grupo 1 (RAPD1 para *Staphylococcus* spp., RAPD 7 para *Enterococcus faecalis*, ERIC 1 para *Pseudomonas aeruginosa* e OPR13 para *Cândida parapsilosis*) foi possível avaliar que dos 45 RNs com a mesma espécie de microrganismo isolada de cateter e hemocultura, 31 (68.9%) apresentavam ICSRC, enquanto a utilização de RAPD-PCR com os primers do grupo 2 (M13 para *Staphylococcus* spp., OP13 para *Enterococcus faecalis*, ERIC 2 para *Pseudomonas aeruginosa* e OPR18 para *Cândida parapsilosis*) foram diagnosticadas 29 (64.4%) RNs com ICSRC (Tabela 4 a 8 e Figuras 3 a 6).

A técnica de REP-PCR revelou que dos 45 pacientes com a mesma espécie de microrganismo isolada do cateter e hemocultura, 28(62.2%) apresentaram ICSRC (Tabela 4 a 8 e Figuras 3 a 6).

O método de RAPD-PCR utilizando os primers do grupo 1 revelou maior frequência de ICSRC em relação ao método de RAPD-PCR com os primers do grupo 2 e ao método de REP-PCR, porém o método de RAPD-PCR com os primers do grupo 1 agrupou os isolados responsáveis pelas ICSRC com coeficientes de similaridade mais baixos ($p=0,03745$) em relação ao método de RAPD-PCR com os primers do grupo 2 e ao método de REP-PCR (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição dos Coeficientes de similaridade (S_{ab}) que indicaram Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC).

S_{ab} (%)	RAPD-PCR		REP-PCR	Valor de p
	Nº de isolados (%) Primers 1	Nº de isolados (%) Primers 2	Nº de isolados (%) Primer RW3a	
100	2(6.5)	6(20.7)	2(7.1)	0,1540
90-99	4(12.9)	7(24.2)	4(14.3)	0,4587
80-89	13(41.9)	13(44.8)	13(46.4)	0,9395
70-79	12(38.7)	3(10.3)	9(32.2)	0,03745
Total	31	29	28	0,7957

Primers 1: RAPD1, OPR13, RAPD7, ERIC 1

Primers 2: M13, OPR18, OPT13, ERIC2

RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA based PCR

REP-PCR :Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR

A utilização da técnica de RAPD-PCR com o primer RAPD1 revelou maior frequência de ICSRC por ECN em relação à utilização da técnica de RAPD-PCR com o primer M13 e o método de REP-PCR. Entretanto, o método de RAPD-PCR utilizando o primer M13 agrupou maior número de isolados de cateter e hemocultura com coeficientes de similaridade de 100% e de 90 a 99% (Tabela 5), embora não tenha mostrado diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Tabela 5: Coeficientes de similaridade (S_{ab}) que indicaram Infecções da Corrente SanguineaRelacionadas a Cateter (ICSRC) por ECN e *S. aureus*

$S_{ab}(\%)$	ECN			<i>S. aureus</i>			<i>Staphylococcus spp</i>
	RAPD1	M13	RW3a	RAPD1	M13	RW3a	Valor de p
100	1	6	1	1	0	0	0,06712
90-99	3	4	4	0	1	0	0,6731
80-89	11	11	10	0	0	1	0,9780
70-79	10	2	7	1	1	1	0,06262
Total	25	23	22	2	2	2	0,7858

Tabela 6: Coeficientes de similaridade (S_{ab}) que indicaram Infecção da Corrente SanguíneaRelacionada a Cateter (ICSRC) por *Enterococcus faecalis*

$S_{ab}(\%)$	<i>E. faecalis</i>		
	RAPD7	OPT13	RW3A
100	0	0	1
90-99	1	0	0
80-89	0	1	0
70-79	0	0	0
Total	1	1	1

Tabela 7: Coeficientes de similaridade (S_{ab}) que indicaram Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC) por *Pseudomonas aeruginosa*.

S_{ab} (%)	<i>P. aeruginosa</i>		
	ERIC1	ERIC2	RW3A
100	0	0	0
90-99	0	0	0
80-89	1	1	1
70-79	0	0	0
Total	1	1	1

Em relação à *C. parapsilosis*, os dois isolados encontrados associados com ICSRC agruparam com o mesmo coeficiente (90 a 99%) com o primer OPR18 na técnica de RAPD, porém na mesma técnica com o primer OPR13 e na técnica de REP-PCR uma agrupou com o coeficiente de 80 a 89% e a outra com o coeficiente de 70 a 79% (Tabela 8).

Tabela 8: Coeficientes de similaridade (S_{ab}) que indicaram Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter (ICSRC) por *Candida parapsilosis*.

S_{ab} (%)	<i>C. parapsilosis</i>		
	OPR13	OPR18	RW3A
100	0	0	0
90-99	0	2	0
80-89	1	0	1
70-79	1	0	1
Total	2	2	2

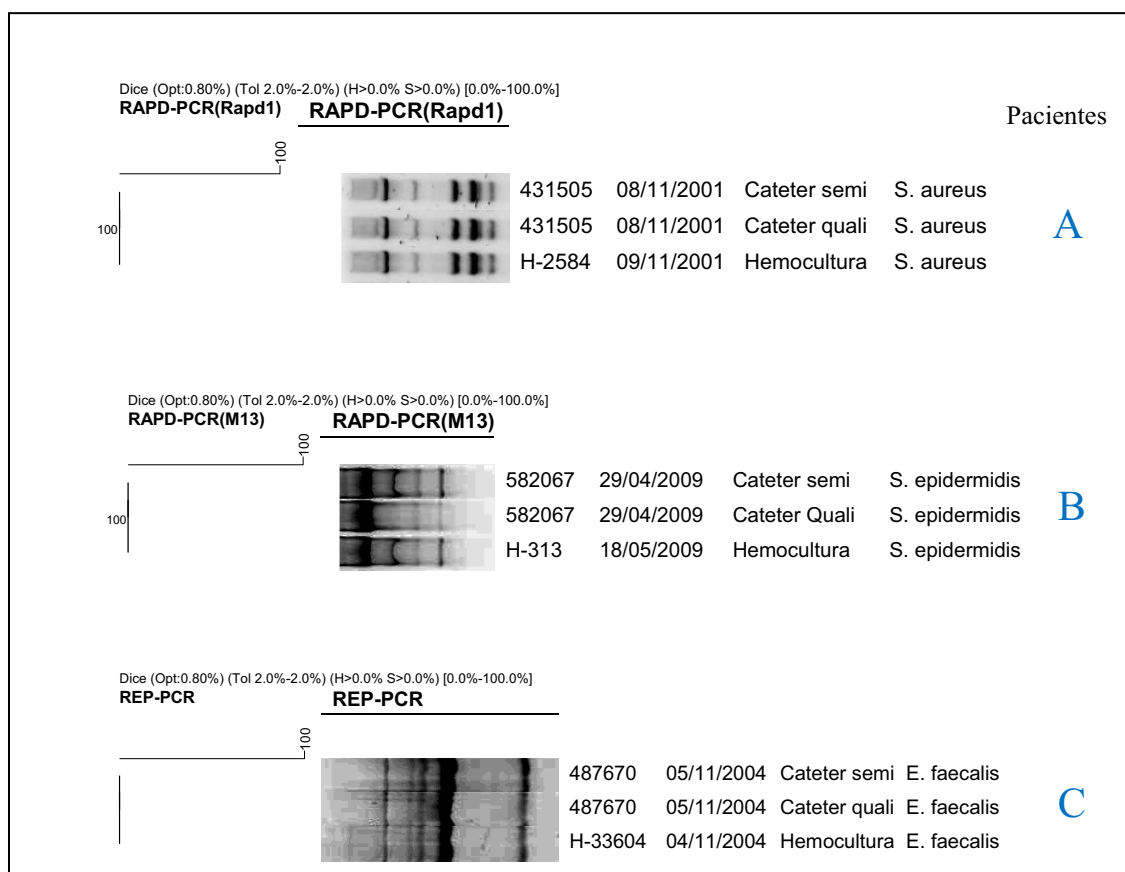


Figura 3: Dendogramas obtidos pela técnica de RAPD-PCR com o primer RAPD1 (paciente A), RAPD-PCR com M13 (paciente B) e REP-PCR (paciente C), com coeficiente de similaridade 100%.

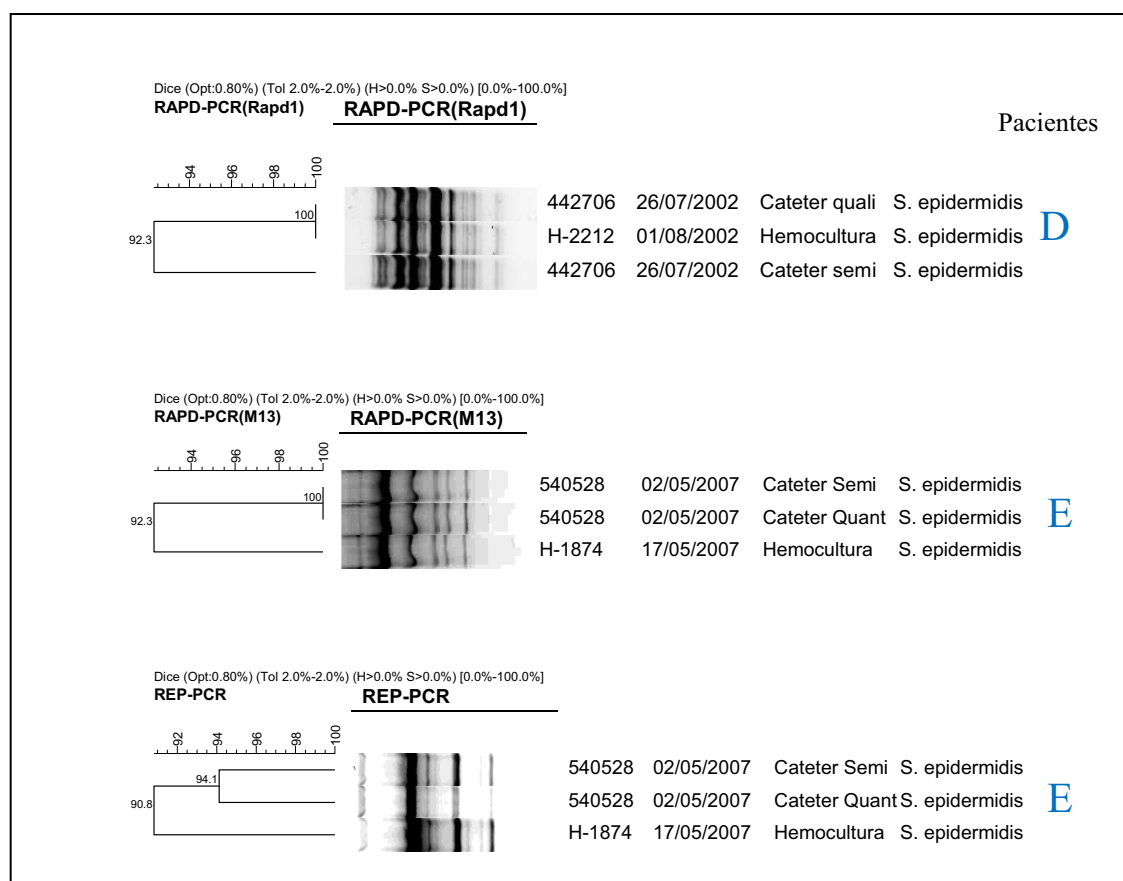


Figura 4: Dendogramas obtidos pela técnica de RAPD-PCR com o primer RAPD 1(paciente D), RAPD-PCR com o primer M13 (paciente E) e REP-PCR (paciente E), com coeficiente de similaridade entre 90 e 99,9%.

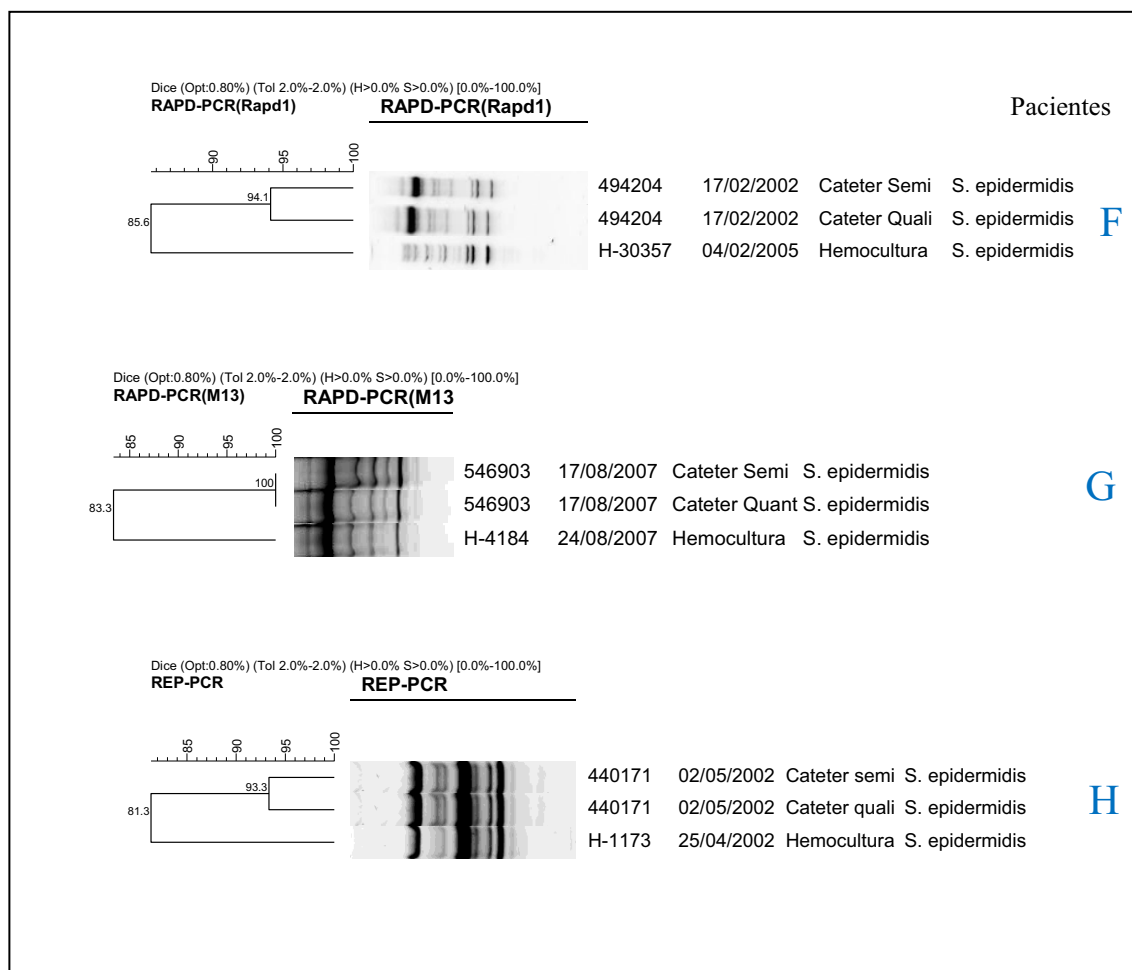


Figura 5: Dendogramas obtidos pela técnica de RAPD-PCR com o primer RAPD 1 (paciente F), RAPD-PCR com M13 (paciente G) e REP-PCR (paciente H) respectivamente, com coeficiente de similaridade entre 80 e 89,9%.

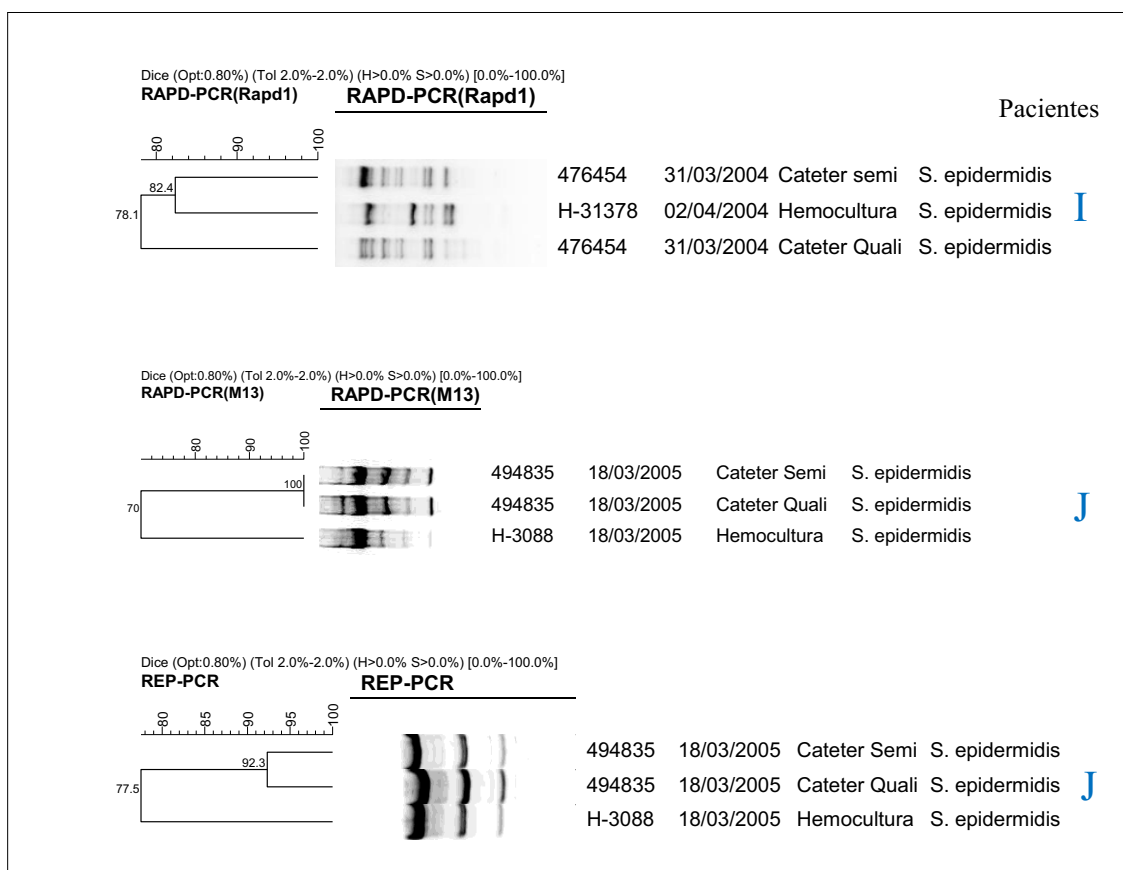


Figura 6: Dendogramas obtidos pela técnica de RAPD-PCR com o primer RAPD 1 (paciente I), RAPD-PCR com M13 (paciente J) e REP-PCR (paciente J), com coeficiente de similaridade entre 70 e 79,9%.

Comparação dos métodos genotípicos com o perfil fenotípico de similaridade

A comparação dos métodos genotípicos (RAPD e REP-PCR) na avaliação de ICSRC com a determinação da similaridade dos isolados pela técnica de disco difusão em ágar está apresentada na Tabela 9.

Todas as amostras positivas para ICSRC no teste fenotípico (21, mesmo perfil de sensibilidade entre os isolados de cateter e hemocultura) foram também positivas para ICSRC pelos métodos genotípicos. Entretanto 10 amostras foram positivas em todos os testes genotípicos e negativas no teste fenotípico, sendo que dessas, 7 foram positivas na técnica de RAPD com os primers dos grupos 1 e 2 e na técnica de REP-PCR e três foram positivas na técnica de RAPD com o primer RAPD 1, e dessas somente uma foi positiva com o primer M13. Entretanto não foi verificada diferença estatística significativa entre os resultados obtidos no teste de disco difusão com a técnica de RAPD com os primers do grupo 1 ($p=0,05476$), RAPD com os primers do grupo 2 ($p=0,1376$) e REP-PCR ($p=0,2041$).

Tabela 9: Comparação dos métodos genotípicos com o perfil fenotípico de similaridade na avaliação de Infecção da Corrente Sanguínea Relacionada a Cateter.

Pacientes	Métodos genotípicos			Método Fenotípico
	RAPD-PCR Primer1	RAPD-PCR Primer2	REP-PCR	ATB
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	+	+	+	-
8	-	-	-	-
9	+	+	+	-
10	-	-	-	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	+	+	+
14	+	+	+	-
15	-	-	-	-
16	+	+	+	-
17	+	+	+	+
18	+	+	+	-
19	+	+	+	+
20	-	-	-	-
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	+	+	+
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	+	+	+	+
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	+	+	+	+
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	-	-	-	-
35	+	+	+	+
36	+	+	-	-
37	+	+	+	+
38	+	+	+	+
39	-	-	-	-
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	+	+	+	+
43	+	+	+	+
44	+	+	+	-
45	+	+	+	+
Total	31	29	28	21

* Isolados com o mesmo perfil apenas em uma das culturas do dispositivo e na hemocultura

ATB- teste de disco difusão em ágar, RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA based PCR, REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR

Dos 21 pacientes que apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos nos isolados de cateter e hemocultura, ou seja, que apresentaram episódio de ICSRC, 18 pacientes apresentaram *Staphylococcus* spp, 2 *C. parapsilosis*, 1 *P. aeruginosa*. Dos pacientes que apresentaram *Staphylococcus* spp, 14 apresentaram a espécie *Staphylococcus epidermidis*, 1 *S. haemolyticus*, 1 *S. simulans* e 2 *S. aureus*,

Dos 31 pacientes que apresentaram o mesmo perfil genotípico nos isolados de cateter e hemocultura pelo método de RAPD-PCR com os primers do grupo 1, 27 pacientes apresentaram *Staphylococcus* spp., 2 *C. parapsilosis*, 1 *P. aeruginosa* e 1 *E. faecalis*. Dos pacientes que apresentaram *Staphylococcus* spp, 22 apresentaram a espécie *Staphylococcus epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. simulans* e 2 *S. aureus*,

Dos 29 pacientes que apresentaram o mesmo perfil genotípico nos isolados de cateter e hemocultura pelo método de RAPD-PCR com os primers do grupo 2, 25 pacientes apresentaram *Staphylococcus* spp., 2 *C. parapsilosis*, 1 *P. aeruginosa* e 1 *E. faecalis*. Dos pacientes que apresentaram *Staphylococcus* spp, 20 apresentaram a espécie *Staphylococcus epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. simulans* e 2 *S. aureus*,

Dos 28 pacientes que apresentaram o mesmo perfil genotípico nos isolados de cateter e hemocultura pelo método de REP-PCR, 24 pacientes apresentaram *Staphylococcus* spp, 2 *C. parapsilosis*, 1 *P. aeruginosa* e 1 *E. faecalis*. Dos pacientes que apresentaram *Staphylococcus* spp, 19 apresentaram a espécie *Staphylococcus epidermidis*, 2 *S. haemolyticus*, 1 *S. simulans* e 2 *S. aureus*,

As Figuras 7 e 8 demonstram a distribuição dos microrganismos associados com ICSRC, sendo observado uma detecção significativa de bactérias do gênero *Staphylococcus* em todos os métodos utilizados para avaliação de ICSRC ($p < 0,0001$). Em relação às espécies

de *Staphylococcus*, a análise dos resultados revelou uma frequência maior de *S. epidermidis* associadas a essas infecções ($p < 0,0001$).

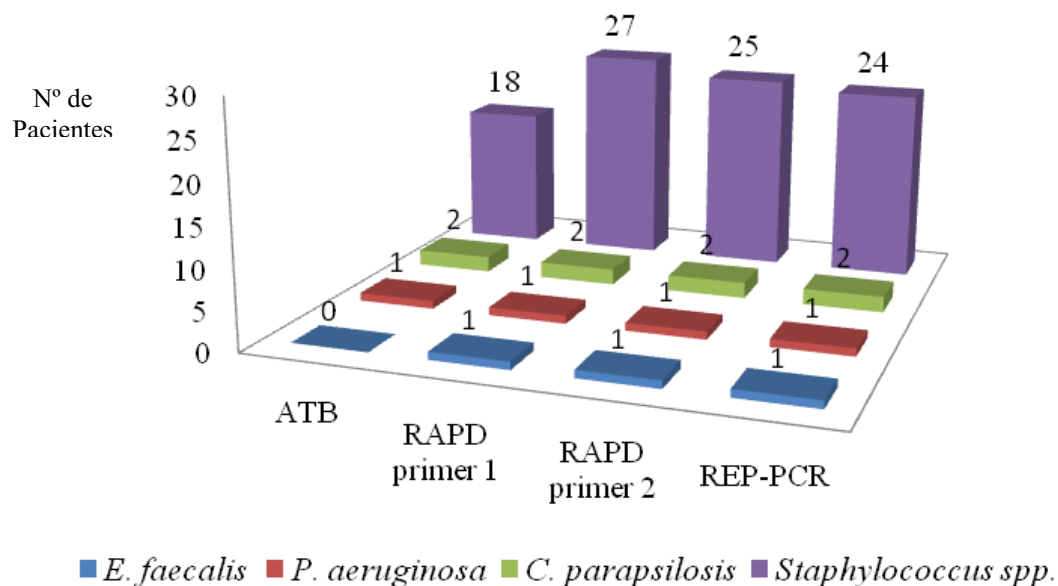


Figura 7: Distribuição dos microrganismos associados com infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter de acordo com o método utilizado.

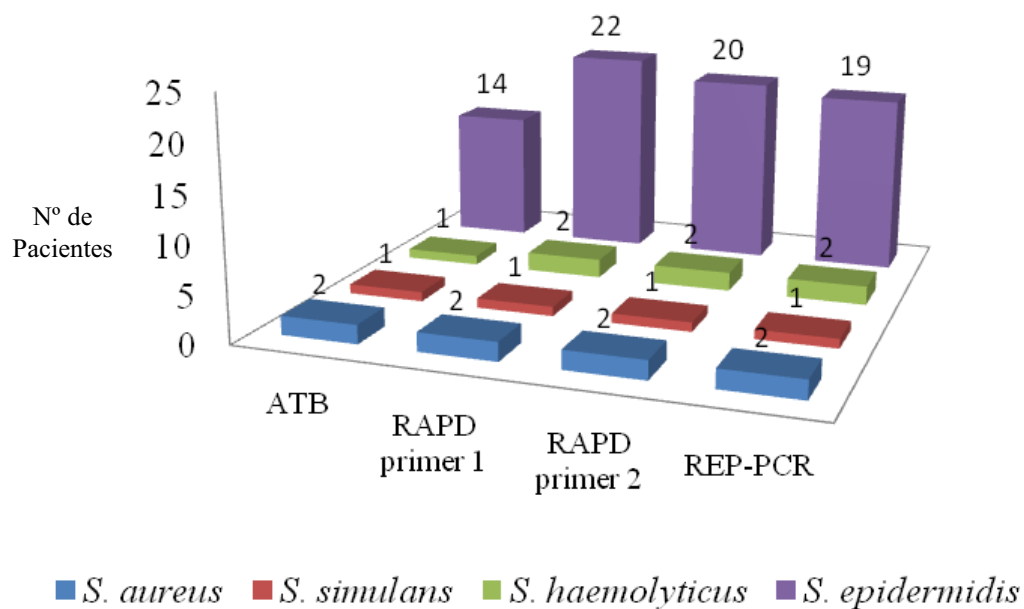


Figura 8: Distribuição dos *Staphylococcus* spp. associados com infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter de acordo com o método utilizado.

Determinação do perfil clonal das amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas

Os dendogramas das amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas de RNs da UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu no período de outubro de 2001 a novembro de 2009, genotipadas pelo método de RAPD-PCR com primer RAPD1, mostraram a distribuição em 10 grupos utilizando o coeficiente $S_{ab} \geq 70\%$ (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J), sendo que o grupo mais frequente foi o cluster chamado de Grupo A ($S_{ab} = 70.5\%$) com 6 isolados, sendo que 3 isolados se agruparam com coeficiente de 90,9%. Os isolados dos grupos A foram isolados em 2002 e 2009, mostrando ser clones persistentes, já que foram coletados em um intervalo de 7 anos.

O Grupo F apresentou 4 isolados (2 isolados subgrupo F1) que também agruparam com coeficiente superior a 90% e persistiram de 2002 a 2005. Enquanto os grupos B, H e I agregaram 3 isolados, sendo que o grupo H apresentou dois isolados subgrupo H1 com coeficiente de 94,7%. Os clusters grupos C, D, E, G e J apresentaram 2 isolados cada grupo. Os grupos B, E, I e J também foram persistentes com os isolados coletados com diferença de 3 a 5 anos (Figura 9).

A amostra de *S. epidermidis* ATCC 35983 e o controle externo (isolado da mesma espécie, mas sem relação com as amostras estudadas) apresentaram coeficiente de similaridade ≤ 70 em relação aos clones isolados de hemocultura, demonstrando que a técnica de RAPD-PCR com RAPD 1 foi adequada para diferenciar clones de amostras de *S. epidermidis* (Figura 9).

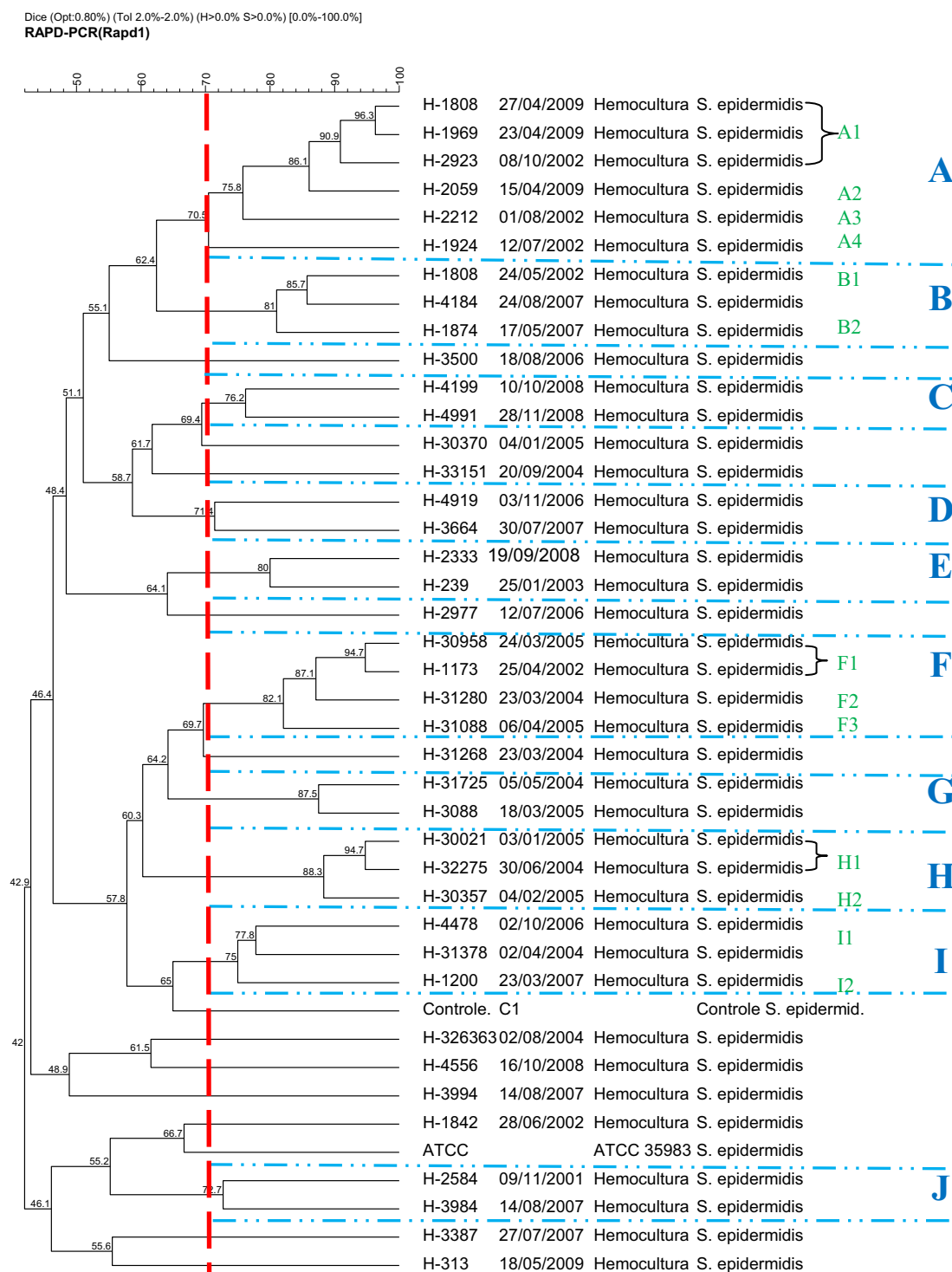


Figura 9: Dendograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis RAPD-PCR com primer RAPD1 das 41 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que apresentaram o mesmo microrganismo no cateter distribuídos dentro dos 10 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$)

Analisando as amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas que se apresentaram positivas para ICSRC pelo método de RAPD-PCR com primer RAPD1 (Figura 10), pode-se observar que essas foram distribuídas em 6 grupos ($S_{ab} \geq 70\%$), sendo que os clusters de *S. epidermidis* prevalentes nas hemoculturas permaneceram como agentes de ICSRC, sendo que o mais freqüente foi o Grupo F com S_{ab} 72,1% com 4 isolados (2 isolados subtipo F1). Também foi possível perceber que as amostras com esse perfil foram persistentes, já que foram coletadas em um intervalo superior a 1 ano. Os Grupos I e H apresentaram 2 isolados, sendo que os clones do grupo I também foram persistentes, com amostras isoladas em 2004 e 2007. Todos os clusters prevalentes isolados de hemoculturas (Grupos A, B, F, I e H) foram também encontrados como clones também prevalentes associados com ICSRC. Dos grupos com somente 2 isolados (C, D, E e G), somente o grupo E foi associado com ICSRC (Figuras 9 e 10).

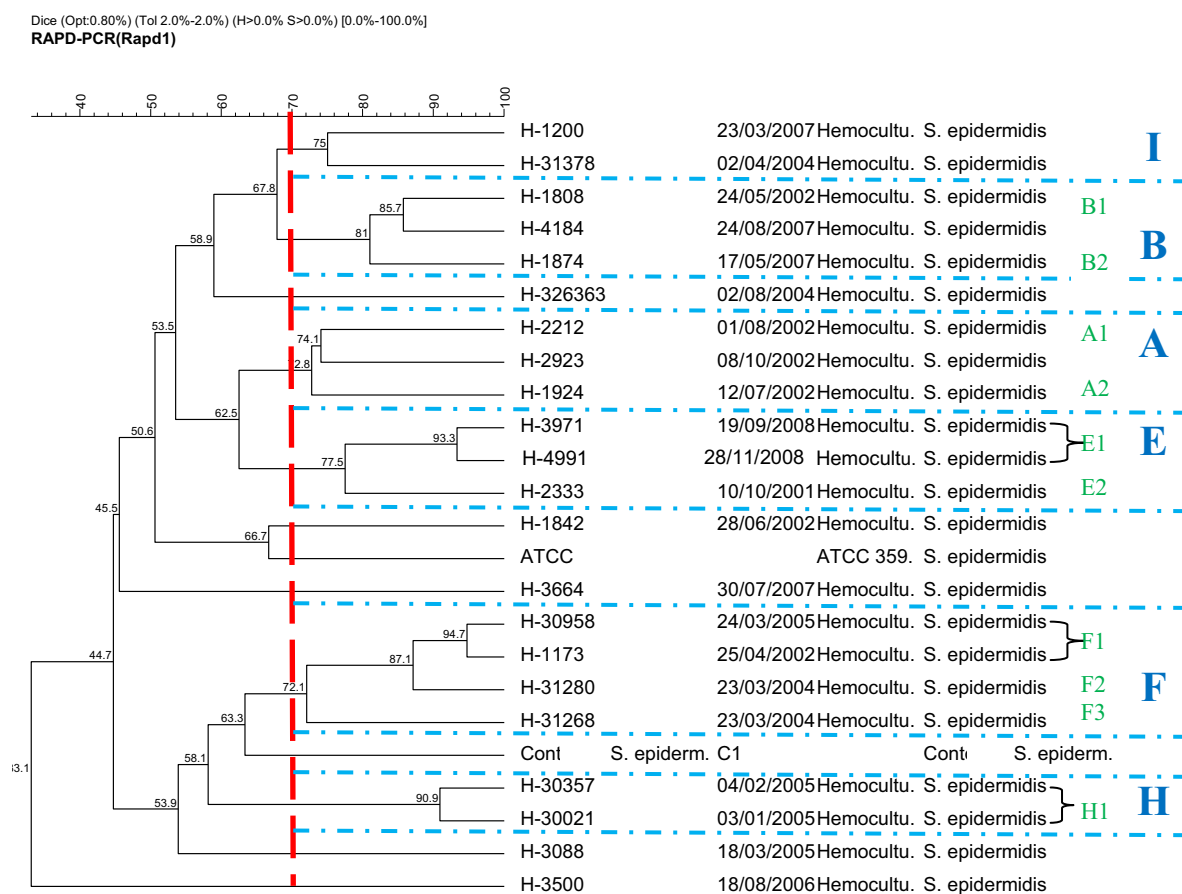


Figura 10: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis RAPD-PCR com primer RAPD1 das 22 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que causaram ICSRC distribuídos dentro dos 6 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$) .

Na análise das amostras de hemoculturas que apresentaram a mesma espécie de microrganismo isolada do cateter e que foram tipadas pelo método de RAPD-PCR com o primer M13, observou-se 8 grupos (K, L, M, N, O, P, Q, R) com $S_{ab} \geq 70$. O cluster chamado de Grupo P foi o mais freqüente apresentando 8 isolados ($S_{ab} = 70,4\%$), sendo 3 do subtipo P1 com coeficiente de similaridade de 100% e 3 do subtipo P3 com similaridade de 90 a 100%. No grupo P também foi possível perceber que as amostras foram persistentes, já que foram coletadas em um intervalo de quatro anos. Outros dois clusters prevalentes foram os grupos M e R, apresentando 4 isolados, também persistentes, com amostras isoladas em intervalos de 3 a 7 anos. Os isolados dos grupos L e O se apresentaram persistentes pois foram coletados com diferença de 2 a 3 anos (Figura 11).

A cepa de *S. epidermidis* ATCC 35983 e o controle externo (amostra de *S. epidermidis* sem relação com as amostras de hemocultura) apresentaram coeficiente de similaridade ≤ 70 em relação aos clones isolados de hemocultura, demonstrando que a técnica de RAPD-PCR com primer M13 diferencia clones de *S. epidermidis* (Figura 11).

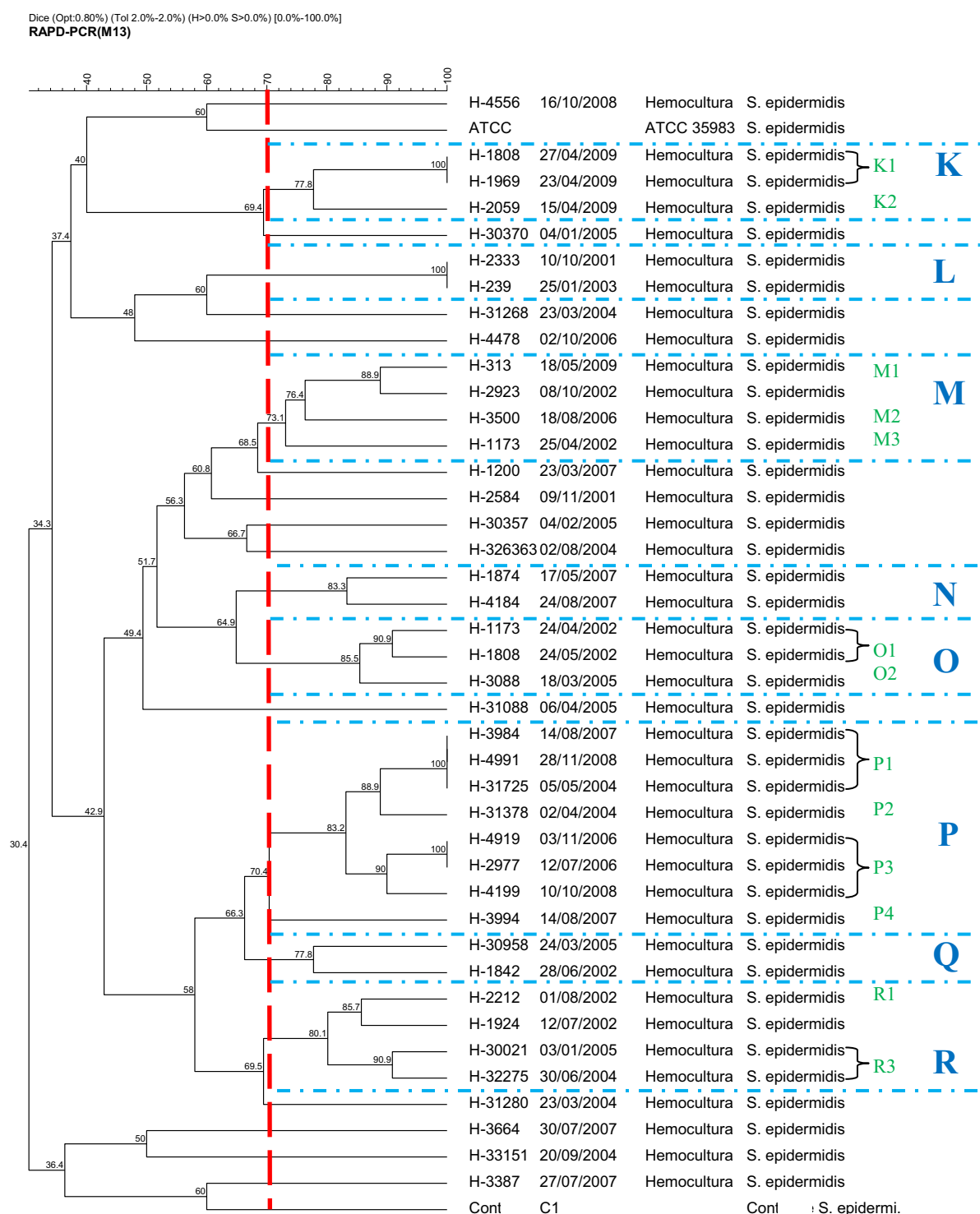


Figura 11: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis RAPD-PCR com primer M13 das 41 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que apresentaram o mesmo microrganismo no cateter distribuídos dentro dos 7 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$).

Analisando as amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura que se apresentaram positivas para ICSRC pelo método de RAPD-PCR com primer M13, pode-se observar que essas amostras foram distribuídas em 5 grupos (M, N, O, P, Q) com $S_{ab} \geq 70$. Os resultados mostraram que todos os clusters prevalentes isolados de hemoculturas foram agentes de ICSRC (M, P, R), sendo que cada um desses clusters apresentou 3 isolados relacionados com infecção associada a cateter. Todos os grupos foram persistentes com os isolados coletados com diferença de 3 a 5 anos (Figura12).

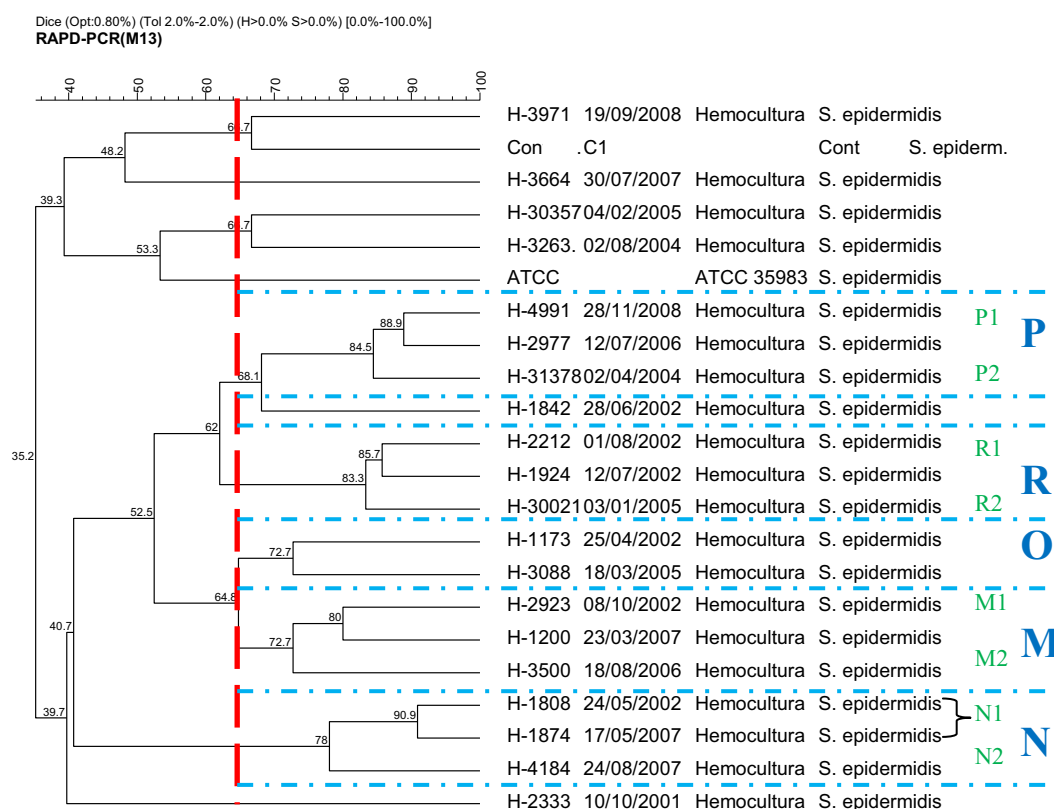


Figura 12: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis RAPD-PCR com primer M13 das 20 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que causaram ICSRC distribuídos dentro dos 5 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$).

O dendograma de similaridade das amostras de hemoculturas que apresentaram a mesma espécie de microrganismo isolada no cateter e que foram genotipadas pelo método REP-PCR, revelou 8 grupos (S, T, U, V, W, X, Y e Z) com $S_{ab} \geq 70\%$. O cluster majoritário chamado de Grupo S com S_{ab} 70,3% apresentou 8 isolados, sendo 2 isolados subtipos S1, 2 isolados subtipo S3 e dois isolados subtipo S4, sendo que os subtipos S1 e S3 apresentaram 100% de similaridade. No grupo S também foi possível perceber que as amostras foram persistentes, já que foram coletadas em um intervalo de 2 a 7 anos. Foi observado a presença de mais dois grandes clusters, grupo T com 4 isolados e o grupo U com 5. O grupo T apresentou 4 isolados persistentes de 2002 a 2007 com um subgrupo T2 com dois isolados e 90,9% de similaridade. O grupo U também apresentou isolados persistentes com amostras isoladas com intervalo de 7 anos. Os grupos V, W, X, Y e Z apresentaram somente dois isolados cada um, sendo que desses o grupo V foi o que apresentou isolados mais persistentes, pois esses foram coletados com diferença de 6 anos, sendo que os dois isolados do grupo V apresentam 100% de similaridade (Figura 13).

A cepa de *S. epidermidis* ATCC 35983 e o controle externo (amostra de *S. epidermidis* sem relação com as amostras de hemocultura) apresentaram coeficiente de similaridade $\leq 70\%$ em relação aos clones isolados de hemocultura, demonstrando que a técnica de REP-PCR é adequada para diferenciar clones de *S. epidermidis* (Figura 13).

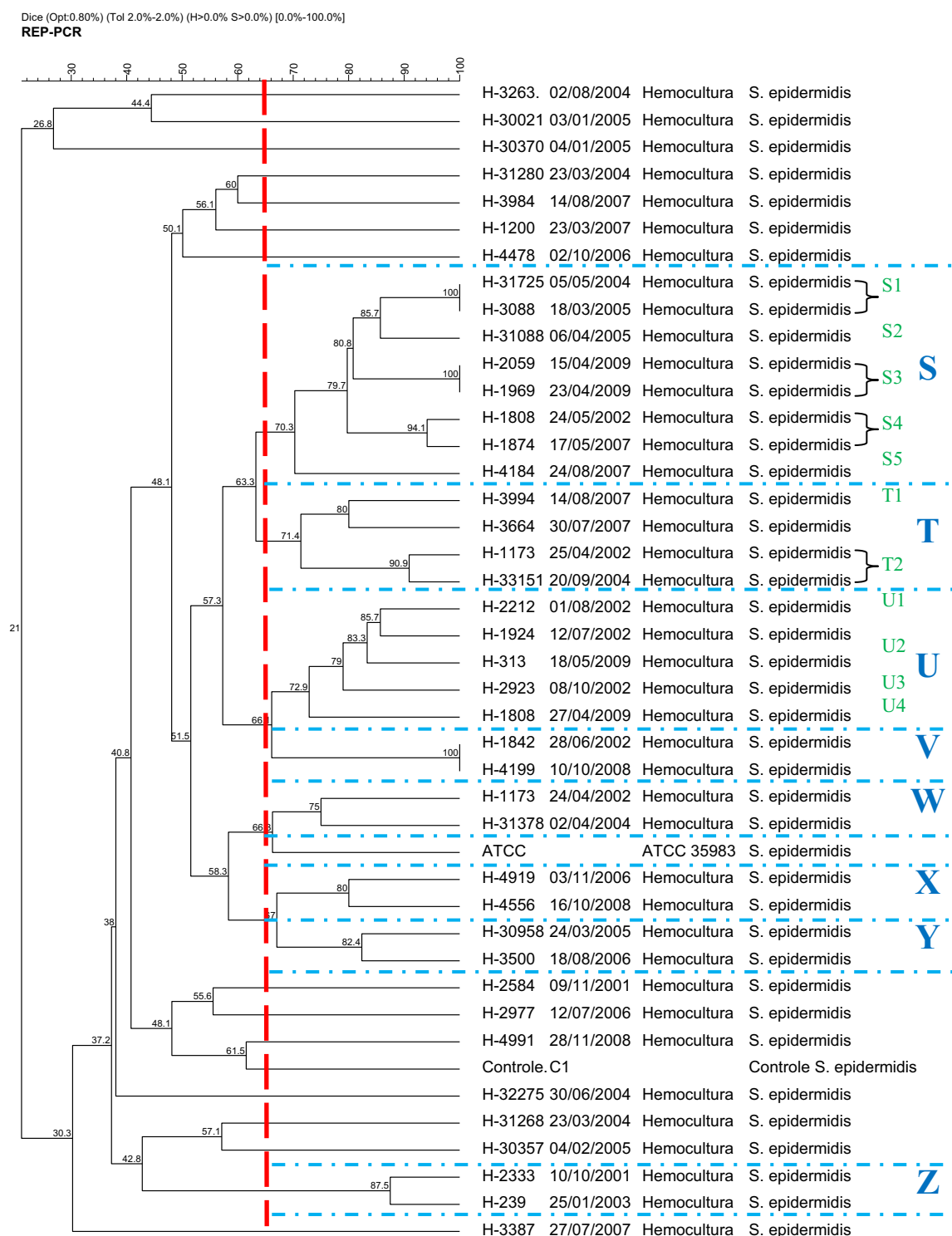


Figura 13: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis REP-PCR com primer RW3a das 41 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que apresentaram o mesmo microrganismo no cateter distribuídos dentro dos 7 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$).

Analisando as amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemocultura que se apresentaram positivas para ICSRC pelo método de REP-PCR com primer RW3a, pode-se observar que essas amostras foram distribuídas em 2 grupos (S e U) com $S_{ab} \geq 70\%$. Os resultados mostraram que os clusters mais prevalentes isolados de hemoculturas foram agentes de ICSRC (U e S), sendo que esses clusters apresentaram 4 isolados relacionados com infecção associada a cateter. Todos os grupos foram persistentes com os isolados coletados com diferença de 5 a 7 anos (Figura 14).

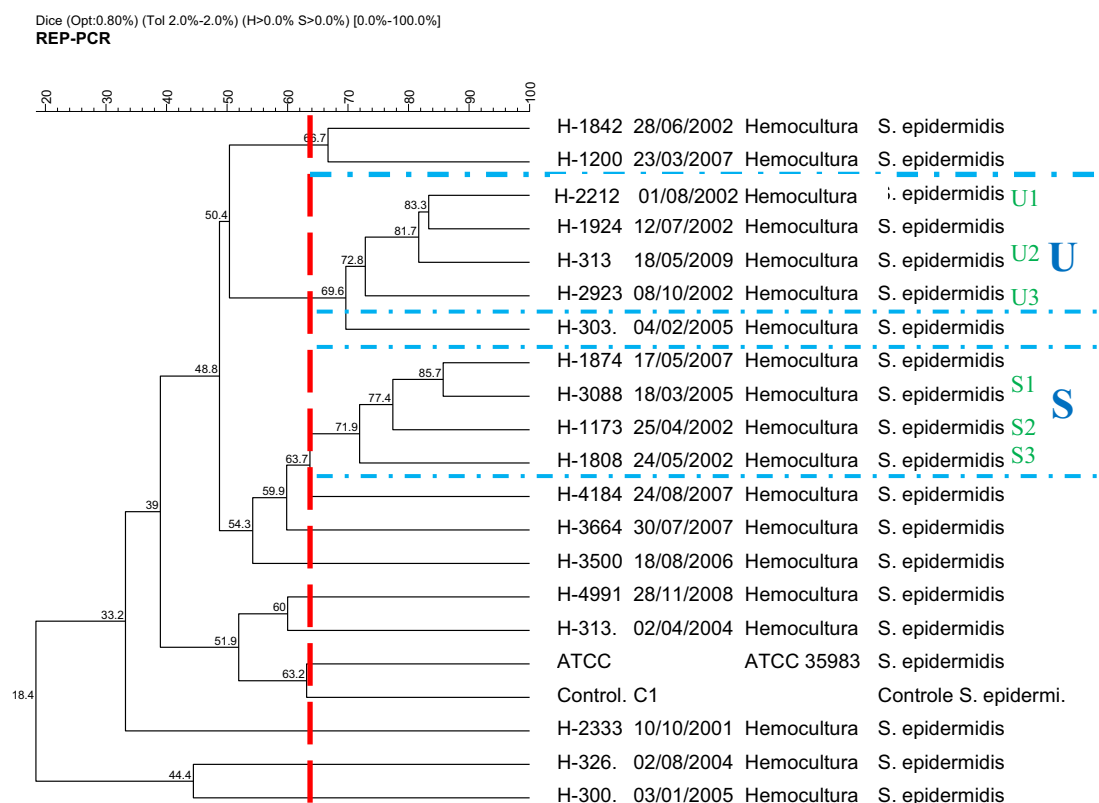


Figura 14: Dendrograma gerado pela análise Dice/UPGMA (Bionumerics, Applied Maths) dos perfis REP-PCR com primer RW3A das 19 amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemocultura que causaram ICSRC distribuídos dentro dos 2 grupos formados (similaridade $\geq 70\%$) .

Em relação às técnicas genotípicas quanto a sua utilização para o delineamento do perfil clonal das 22 amostras de *S. epidermidis* provenientes das hemoculturas associadas com ICSRC pelo método de RAPD-PCR com o primer RAPD1 (Figura 10), 17 foram agrupadas em 6 clusters e 5 apresentaram perfis policlonais ($S_{ab} < 70\%$). Dos 20 isolados de *S. epidermidis* de hemoculturas associados com ICSRC pelo método de RAPD-PCR com primer M13 (Figura 12), 14 foram agrupados em 5 clusters e 6 apresentaram perfis policlonais. Dos 19 isolados associados com ICSRC pelo método de REP-PCR (Figura 14), 8 formaram 2 clusters e 11 apresentaram perfis policlonais.

Discussão

O uso dos cateteres representa um grande avanço no diagnóstico e na terapêutica em medicina. Muitos procedimentos clínicos e cirúrgicos puderam ser realizados a partir do desenvolvimento desta tecnologia. Entretanto, com este advento, houve também uma grande e crescente preocupação com a infecção hospitalar, pois esse dispositivo representa um acesso direto do meio exterior com o intravascular [1]. O contato direto do CVC com a corrente sangüínea oferece um risco iminente de disseminação, principalmente de bactérias para o sangue, podendo desencadear posterior bacteremias ou até sepse [20].

As infecções hospitalares, em geral são mais freqüentes e graves em recém-nascidos do que em crianças maiores e adultos. As deficiências imunológicas desta fase da vida, que levam à maior susceptibilidade as infecções, a sobrevivência de um número crescente de neonatos prematuros de extremo baixo peso anteriormente incompatíveis com a vida, à custa de longos períodos de hospitalização, associado ao uso de antimicrobianos de amplo espectro e ao uso de procedimentos invasivos, são os responsáveis por esta problemática.

Os ECN são importantes agentes etiológicos das bacteremias em UTIs neonatais, mas geralmente são considerados como contaminantes de hemoculturas, pois esses agentes são parte da microbiota cutânea, e podem ser coletados junto com o sangue, não estando associado a nenhum processo infeccioso. Entretanto, esses microrganismos podem também colonizar superfícies de cateteres ou outros dispositivos e migrar para a corrente sanguínea, estando diretamente associados a sérios processos infecciosos. Dessa forma, cria-se a grande dúvida para os médicos na hora da interpretação dos resultados de processo infeccioso ocasionados por essas bactérias [21]. Os resultados totais das culturas de cateter e hemoculturas concomitantes avaliadas nesse estudo revelaram que os ECN (86,7%) foram os microrganismos predominantes em ICSRC na UTI Neonatal do Hospital da FMB. Devido ao isolamento freqüente de ECN é de grande importância a atenção aos sinais clínicos e ao método de diagnóstico para confirmação das ICSRC. Cunha et al [22] em um estudo sobre a significância clínica de estafilococos coagulase-negativa verificaram que de 117 amostras de ECN, 60 foram consideradas de significância clínica, incluindo 35 (58,3%) isoladas a partir de hemoculturas e 21 (35%) de corpos estranhos. Vários outros autores como Drews et al. [23], Gaynes et al. [24], Góngora-Rubio et al. [25] e Leroyer et al. [26], tem relatado a importância de ECN em infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos.

Entre os ECN a espécie *Staphylococcus epidermidis* é mais frequentemente isolada e nesse estudo representou 80% do total de microrganismos presentes nos cateteres e nas hemoculturas concomitantes. Das 39 amostras de ECN isoladas, 25 (64,1%) foram associadas com ICSRC por pelo menos uma das técnicas genotípicas utilizadas no estudo, sendo 22 (88%) causadas por *S. epidermidis*, 2(8%) por *S. haemolyticus* e 1(4%) por *S. simulans*. Infecções por *Staphylococcus epidermidis* associadas a cateter geralmente se relacionam com os cuidados de assepsia utilizados no procedimento de colocação dos cateteres e ao tempo de

permanência do dispositivo [27]. Esta maior frequência do *S. epidermidis* nesta intercorrência é esperada já que, segundo D'Angio [28] esta é a espécie predominante na flora do RN por volta do quarto dia de vida. Esta predominância na colonização dos indivíduos e a maior patogenicidade de algumas cepas podem explicar o fato do *S. epidermidis* ser a espécie mais comumente associada aos processos infecciosos em RNs. Outros autores [22] relatam o *S. haemolyticus* como a segunda espécie mais frequentemente isolada entre os ECN, estando de acordo com o encontrado nesse estudo.

Em menor proporção outros gêneros e espécies de microrganismos também foram isolados de pontas de cateteres e hemoculturas concomitantes dos pacientes da UTI neonatal do Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, sendo que 4,4% dos RNs apresentaram *Staphylococcus aureus*, 4,4% *Candida parapsilosis*, 2,2% *Enterococcus faecalis* e 2,2% *Pseudomonas aeruginosa*. Todos esses isolados foram confirmados como agentes de ICSRC através das técnicas genotípicas. Esses resultados estão de acordo com o CDC [8] que relata as bactérias Gram positivas como os principais agentes isolados nessas infecções e os ECN lideram em levantamento realizado pelo National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) entre 1992 e 1999 [8], com 37% dos casos, seguido pelo *Enterococcus* com 13,5%. Também o *S. aureus* se destaca correspondendo a 12,6% e os bacilos Gram negativos como as enterobactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella pneumoniae* e Bacilos Gram-negativos não fermentadores, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* correspondem a 14% dos microrganismos isolados. A *Candida* spp. representa 8% dos achados, sendo a maioria das espécies não-albicans, incluindo a *Candida parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

A aderência de microrganismos na superfície de cateter é dependente da interação de três fatores, hospedeiro, microrganismos e o material do cateter. O hospedeiro reage contra o

cateter, considerado corpo estranho, e forma ao seu redor uma cobertura de fibrina e fibronectina. Esses componentes protéicos do hospedeiro que estão recobrendo a superfície do cateter permitem a aderência de *S. aureus*. Esses microrganismos são produtores de coagulase, promovendo a trombogênese, além de várias outras proteínas que estão em sua superfície e tem receptores para proteínas liberadas pelo hospedeiro, como fibrinogênio e fibronectina que permitem a aderência e colonização do cateter [29]. Os estafilococos coagulase-negativa podem colonizar a superfície nativa do cateter como superfícies condicionadas por essas proteínas do hospedeiro. Uma vez aderidas, essas bactérias proliferam, formando múltiplas camadas e produzem um polissacarídeo extracelular, conhecido como *slime* ou biofilme, que potencializa sua patogenicidade. O biofilme não só favorece a aderência dos microrganismos como também sua manutenção, atuando como barreira ao ataque dos antibióticos, neutrófilos, fagócitos, macrófagos e anticorpos. A concentração de antibiótico requerida para destruir bactérias em um biofilme é 100 a 1000 vezes maior do que a necessária para destruir as mesmas espécies em suspensão, dificultando o tratamento e aumentando a possibilidade de infecções recorrentes, uma vez que as bactérias ficam protegidas do sistema imune do hospedeiro [30].

A *Candida* também figura como microrganismo preocupante uma vez que há estudos mostrando ser responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar. Em adição, algumas espécies, na presença de soluções contendo glicose, podem produzir o biofilme similar ao bacteriano, o que explica o aumento da proporção de ICSRC devido à patógenos fúngicos especialmente em pacientes recebendo nutrição parenteral [31].

No presente estudo dos 39 pacientes com ECN isolados de pontas de cateter e hemoculturas concomitantes, 18 pacientes (46,1%) tiveram seus isolados associados com ICSRC na avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, 27 (69,2%) tiveram suas

amostras associadas com ICSRC pelo método de RAPD-PCR utilizando-se do primer RAPD1, 25 (64,1%) tiveram suas amostras associadas com ICSRC pelo método de RAPD-PCR com primer M13 e 24(61,5%) tiveram suas amostras associadas com ICSRC pelo método de REP-PCR. Embora não tenha sido constatada diferença estatisticamente significativa entre os métodos, foi observada uma diferença entre os resultados dos métodos genotípicos e a utilização do perfil fenotípico de sensibilidade dos isolados na avaliação de ICSRC. Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que cepas de *S. epidermidis* apresentam resistência a diferentes classes de antimicrobianos, e a mesma cepa pode apresentar variação frente a algumas classes de antimicrobianos. Os resultados desse trabalho demonstraram que em alguns casos o mesmo perfil genotípico apresentou variação de susceptibilidade frente aos antibióticos. Cepas de *S. epidermidis* constituindo organizações em biofilme são mais resistentes a antimicrobianos quando comparadas com as mesmas cepas em formação planctônica, e que esta resistência pode ser aumentada pela presença de outros microrganismos, inclusive agentes fúngicos [32]. Porém o mecanismo de resistência de cepas organizadas em biofilme não está associado aos mecanismos de resistência usualmente descritos para células planctônicas como: mutações alvo, baixa permeabilidade celular, superexpressão ou modificação de proteínas sítio alvo [33]. Mecanismos de repressão e superexpressão de genes essenciais à fisiologia celular estão diretamente relacionados à resistência em biofilme [34]. Como a expressão de biofilme é uma condição variável, a susceptibilidade antimicrobiana agregada a este mecanismo também se faz instável. Villari et al. [35] relataram através de uma análise comparativa que a utilização dos padrões de resistência as drogas como perfis fenotípicos não são satisfatórias, uma vez que algumas cepas monoclonais diferem em seus padrões de resistência às drogas, e algumas cepas policlonais tinham o mesmo fenótipo de resistência.

Os resultados obtidos também estão de acordo com Martín-Lozano et al. [36] em estudo comparativo entre técnicas moleculares e métodos microbiológicos na determinação das fontes de infecções nosocomiais, onde esse autores avaliaram a utilidade do antibiograma para estudos epidemiológicos e concluíram que o diagnóstico da fonte de bacteremia utilizando-se de critérios clínicos convencionais e/ou microbiológicos, incluindo antibiograma, nem sempre são precisos e suficientes.

Estudos comparando os métodos de RAPD-PCR e REP-PCR concluem que a validade do método de epidemiologia molecular depende do microrganismo estudado, por exemplo, segundo Cartelle et al. [18], para amostras de *Acinetobacter baumannii* a melhor técnica de tipagem foi o REP-PCR. Entretanto, segundo Wieser e Busse [37] no método de REP-PCR para amostras de *Staphylococcus* spp. os padrões de bandas formadas nesse método não foram suficientes para identificação de *Staphylococcus* spp. Os resultados encontrados no presente trabalho não estão de acordo com o estudo realizado por Wieser e Busse [37], pois os padrões de bandas formadas pelo método de REP-PCR foi suficiente para diferenciar as amostras de *Staphylococcus* spp., apesar de não ter sido considerado o melhor método para genotipagem desses microrganismos.

O método de RAPD-PCR utilizando o primer RAPD 1 para genotipagem de *Staphylococcus* spp. revelou maior frequência de ICSRC em relação ao método de RAPD-PCR com o primer M13 e ao método de REP-PCR, porém agrupou as amostras associadas com ICSRC com coeficientes de similaridade mais baixos ($p=0,03745$) em relação aos outros métodos. Portanto, para uma maior confiabilidade no diagnóstico das ICSRC por *Staphylococcus* spp aconselha-se a utilização do método de RAPD-PCR utilizando os primers RAPD1 e M13 simultaneamente em duas diferentes reações, já que o primer RAPD1 agrupou

uma quantidade maior de amostras e o primer M13 agrupou a maioria dos isolados com coeficientes maiores.

Segundo Tenover et al.[38], a combinação de dois ou mais métodos de tipagem proporciona maior possibilidade de discriminação dos padrões das estirpes estudadas. Neste sentido, observou-se que apesar das diferenças encontradas nas técnicas, a realização das técnicas de RAPD-PCR e de REP-PCR foi importante para a segurança na confirmação das ICSRC, além disso, devido à baixa reprodutibilidade do método de RAPD-PCR a realização de duas reações RAPD-PCR com diferentes primers auxilia em atenuar esse problema.

A determinação do perfil clonal das amostras de *Staphylococcus epidermidis* isoladas de hemoculturas demonstrou clones de *Staphylococcus epidermidis* persistentes de 1 a 7 anos na UTI neonatal da Faculdade de Medicina de Botucatu. Todos os clusters majoritários apresentaram isolados que foram associados com ICSRC e, em algumas situações clusters menores também apresentaram isolados associados com ICSRC. Dos 6 clusters observados pelo método de RAPD-PCR com primer RAPD 1 na avaliação de clones associados com ICSRC, 4 clusters apresentaram clones persistentes de 3 a 7 anos; dos 5 clusters formados pelo método de RAPD-PCR com primer M13 na avaliação de clones associados com ICSRC, 5 clusters apresentaram clones persistentes de 3 a 5 anos; e dos 2 clusters formados pelo método de REP-PCR na avaliação de clones associados com ICSRC, os 2 clusters apresentaram clones persistentes de 5 a 7 anos. Trabalhos realizados por Villari et al. [35], Huebner et al. [39], Neumeister et al [40] também revelaram clones persistentes de *Staphylococcus epidermidis* em ambiente hospitalar. Villari et al. [35] sugerem que a uma parcela significativa de infecções por *S. epidermidis* pode ser atribuída à transmissão entre pacientes e que certas cepas podem tornar-se endêmicas durante longos períodos.

Estes resultados confirmam a importância da infecção cruzada dos ECN na UTIN. O sucesso dos clones predominantes nestes e outros estudos podem estar relacionadas a fatores ainda não caracterizados que fornecem os microrganismos, vantagens na colonização ou na sua capacidade de infectar pacientes, sendo que possivelmente entre esses fatores estão a formação de biofilme e a resistência a antibióticos.

Tenover [38] em estudo para comparação de métodos moleculares para a tipificação de isolados de *Staphylococcus aureus* apresentou alguns padrões para validade de boas técnicas moleculares, como reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de uso e a facilidade de interpretação das técnicas, além disso, uma intensidade maior das bandas pode auxiliar na interpretação dos resultados [41]. No presente estudo as técnicas RAPD-PCR e REP-PCR apresentaram um bom poder discriminatório, pois diferenciaram as amostras estudadas das cepas ATCC e de isolados não relacionados com um valor de coeficiente de similaridade ≤ 70 . Entretanto, o método de RAPD-PCR com os primers RAPD1 e M13 para amostras de *Staphylococcus spp.* apresentou melhores padrões das bandas quando comparados com o REP-PCR, facilitando assim a interpretação dos resultados. Também foi possível verificar na determinação do perfil clonal das amostras de *S. epidermidis* isoladas de hemoculturas um maior agrupamento dos isolados associados com ICSRC, além da maior facilidade de aplicação do método de RAPD-PCR quando comparado com método de REP-PCR. Apesar de relatos de baixa reprodutibilidade na técnica de RAPD-PCR [42] não foi verificada dificuldade referente a esse aspecto nesse estudo.

As técnicas de tipagem molecular apresentaram um poder discriminatório adicional, principalmente nas infecções causadas por ECN, sendo esse resultado de grande importância, uma vez que esses microrganismos fazem parte da microbiota normal, e o entendimento das relações entre esses microrganismos é fundamental para a elucidação das ICSRC.

Conclusão

O *S. epidermidis* foi o microrganismo mais associado com ICSRC na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Os métodos genotípicos (RAPD-PCR e REP-PCR) empregados nesse estudo apresentaram melhores resultados na determinação da similaridade das amostras no diagnóstico de ICSRC em relação ao método fenotípico de comparação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados.

Foi identificada a existência de clones persistentes de *S. epidermidis* ocasionando ICSRC na UTI neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ambas as técnicas RAPD-PCR e REP-PCR apresentaram um bom poder discriminatório, pois diferenciaram as amostras estudadas das cepas ATCC e isolados não relacionados, porém a técnica RAPD-PCR apresentou melhores resultados quando comparada com a técnica REP-PCR para o diagnóstico de ICSRC e determinação do perfil clonal de *S. epidermidis*.

Referências Bibliográficas

1. Beghetto M, Victorino J, Teixeira L: **Fatores de risco para infecção relacionada a cateter venoso central.** *Revi Bras de Terapia Intensiva* 2002, **14**:107-113.
2. Garcia PC, Payá EG, Olivares RC, Cotera EF, Rodriguez JT, Sanz MR: **Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrals.** *Rev Chil Infect* 2003, **20**:41-50.
3. Warren DK, Yokoe DS, Climo MW, Herwaldt LA, Noskin GA, Zuccotti G, Tokars JL, Perl T M, Fraser V J: **Preventing catheter-associated bloodstream infections: a survey of policies for insertion and care of central venous catheters from hospitals in the prevention epicenter program.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006, **27**:8-13.
4. Bouza E, San JR, Munoz P, Pascal J, Voss A, Desco M: **A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility.** *Clin Microbiol and Infect* 2004, **10**:838-842.
5. Kaufman D, Fairchild KD: **Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**:638-680.
6. Lopes GK, Rossetto EG, Belei RA, Capobianco JD, Matsuo T: **Estudo epidemiológico das infecções neonatais no Hospital Universitário de Londrina, Estado do Paraná.** *Acta Sci Health Sci* 2008, **30**:55-63.
7. National Nosocomial Infections Surveillance System: **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 to June 2004,** *Am J Infect Control* 2004, **32**:470-485.
8. CDC: **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999.** *Am J Infect Control* 1999, **27**:520-532.
9. CDC: **Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections.** *MMWR* 2002, **5**:1-29.
10. Eggimann P, Pittet D: **Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs.** *Clin Microbiol Infect* 2002, **8**:295-309.

11. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick, A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. **Microbial DNA typing automated repetitive-sequence-based PCR.** *J Clin Microbial.* 2005, 43:199-207
12. Ferreira ME, Grattapaglia DG: **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3º ed. Brasília-DF: *Embrapa-Cenargen*,1998.
13. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW: **A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection.** *N Engl J Med* 1977, **296**:1305-1309.
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**:873–877.
15. Koneman EW: **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5 ed. Philadelphia: *Lippincott* 1997, 500-530.
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. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement (M100-S19).** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2009, 29.
18. Cartelle M, Tomas M, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, Molina F, Villanueva R, Bou G: **Risk factors for colonization and infection in a Hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:4242-4249.
19. Soll DR: **The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi.** *Clin Microb Rev* 2000, **13**:332-370.
20. Menezes EA, Favali CBF, Cunha FA, Salviano MNC, Ângelo MRF: **Caracterização bacteriana em culturas de ponta de cateter no hospital geral de Fortaleza.** *Rev Bras de An Clín* 2002, **34**:151-154.
21. Silbert S, Rosa DD, Matte U, Goldim JR, Barcellos SH, Procianoy RS: ***Staphylococcus sp.* coagulase-negativa em hemoculturas de pacientes com menos de sessenta dias de idade: infecção versus contaminação.** *J Pediatr* 1997, 73
22. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS: **Significancia clinica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos.** *J Pediatr* 2002, **78**:279-288.

23. Drews MB, Ludwig AC, Leititis JU, Daschner FD: **Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit.** *J Hosp Infect* 1995, **30**:65-72
24. Gaynes RP, Edwards JR, Jarvis WR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ: **Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States.** *Pediatrics* 1996,**98**:357-361.
25. Góngora-Rubio F, Pignatari ACC, Costa LMD, Bortolloto VI, Machado AM, Góngora DVN: **Significância clínica, epidemiologia e microbiologia das bacteremias por estafilococos coagulase-negativos em Hospital de Ensino.** *Rev Ass Med Brasil* 1997, **43**:9-14.
26. Leroyer A, Bedu A, Lombrail P, Desplanques L, Diakite B, Bingen E . **Prolongation of hospital stay and extra costs due to hospital-acquired infection in a neonatal unit.** *J Hosp Infect* 1997, **35**:37-45.
27. Michelim L, Lahude M, Araújo PR, Giovanaz DSH, Müller G, Delamare APL, Costa SOP, Echeverrigaray S: **Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units.** *Braz J Microbiol* 2005, **36**:17-23
28. D'Angio CT, McGowan KL, Baumgart S, St Geme J, Harris MC: **Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates.** *J Pediatr* 1989, **114**:1029-1034.
29. Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, Lerch PG: **Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheters.** *J Infect Dis* 1993, **167**:633-641.
30. Cunha MLRS, Lopes CAM: **Estudo da produção de β -lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase-negativos isolados de recém-nascidos.** *J de Ped.* 2002, **38**:281-290.
31. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo k, Pitula A: **Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model.** *Infect and Immun* 2004, **72**:6023-6031.
32. Adam B, Baillie GS, Douglas J: **Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*.** *J of Med Microb* 2002, **51**: 344-349.
33. Stewart PS: **Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria biofilms.** *J of Med Micr* 2002, **292**:107-113.

34. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M: **Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms.** *J of Infect Dis* 2005, **191**:289-298.
35. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L: **Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:1740-1746
36. Martín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, Canas E, Pachón, J: **Comparison of a Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Method and Clinical and Microbiological Methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:4571-4575.
37. Wieser M, Busse H: **Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*.** *Intern J of Syst and Evol Microbiol* 2000, **50**:1087-1093.
38. Tenover FC, Arbeit R, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hébert GA, Hill B, Hollis R: **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*.** *J Clin Microbiol* 1994, **32**:407-415.
39. Huebner J, Pier GB, Maslow JN, Muller E, Shiro H, Parent M, Kropec A, Arbeit RD, Goldmann DA: **Endemic nosocomial transmission of *staphylococcus epidermidis* bacteremia isolates in a neonatal intensive care unit over 10 years.** *J Infect Dis* 1994, **169**:526-31.
40. Neumeister B, Kastner S, Conrad S, Klotz G, Bartmann P: **Characterization of coagulase-negative *Staphylococci* causing nosocomial infections in preterm infants.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995, **14**:856-63.
41. Kremer K, Van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PWM, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakus MA, Musser JM, Van Embde JDA: **Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility.** *Clin Microbiol* 1999, **37**:2607-2618.
42. Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G: **Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories.** *PCR Methods Appl* 1993, **2**:341-345.

Capítulo 2

***Infecções Sanguíneas Relacionadas a Cateter Vascular com Ênfase em Unidade de
Terapia Intensiva Neonatal***

Letícia T Pazzini¹, Maria de Lourdes R.S. da Cunha¹

¹UNESP- Univ Estadual Paulista, Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências, Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente: Maria de Lourdes R. S. da Cunha

Departamento de Microbiologia e Imunologia-Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.Caixa Postal 510, CEP 18618-970.

Artigo conforme normas do *Jornal de Pediatria*

Abstract

Intravascular catheters are indispensable in modern-day medical practice to obtain intravenous access for the administration of fluids and medications, particularly in intensive care units; however, these catheters are an important source of bloodstream infection in these units. The infection associated with the use of intravascular devices represents from 10 to 20% of the total nosocomial infections and is one of the most frequent causes of morbidity and mortality, which represents a source of bacteremia and sepsis in hospitalized patients and increases the costs of hospital admission and the time of hospital stay. In Neonatal Intensive Care Units the rate of infection is inversely proportional to the newborn birth weight. Approximately 20% of the premature neonates with very low birth weight (less than 1,500g) experience a systemic infection during their stay in hospital. Gram-positive agents are the main organisms isolated in these infections, of which Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) were the most frequent ones, followed by *Enterococcus* and *Staphylococcus aureus*. Gram-negative bacilli are also isolated, with emphasis to the increasing participation of enterobacteria that produce extended-spectrum β -lactamase. Species of *Candida* with increasing resistance to fluconazole are also frequently isolated. In all of these microorganisms, the low microbial sensitivity is a worrying and increasing phenomenon. Catheter-related bloodstream infections are diagnosed when identical microorganisms are isolated from catheter cultures and hemocultures without apparent source of infection, except for its catheter. The reliability of catheter culture for Catheter-related bloodstream infections diagnosis depends on the culture technique applied. Molecular techniques can help diagnose and understand these infections because some of these techniques are capable of establishing phylogenetic relationships between catheter-tip isolates and hemoculture. It is of great importance to have a special attention to the good practices of catheter insertion and

maintenance to help prevent infections caused by these devices. The aim of this paper was to review the several aspects of Catheter-related bloodstream infections as for pathogenesis, etiology, diagnosis and new prevention strategies based on the knowledge of mechanisms of bacterial adhesion and biofilm formation. Biofilm is a virulence factor of several microorganisms involved in these infections and its formation is regulated by the exchange of chemical signals between cells in a process known as quorum-sensing. A new way to prevent the colonization of catheters and reduce infections related to these devices is to interfere with this cell-cell communication that gives microorganisms the capacity of organizing themselves in complex biofilms that protect them from the host immune system and provide more resistance to antimicrobials.

Resumo

Os cateteres intravasculares são indispensáveis na prática da medicina moderna para obter acesso intravenoso para administração de fluídos e medicamentos, particularmente em Unidades de Terapia Intensiva, sendo, no entanto, importante fonte de infecção da corrente sanguínea nestas unidades. A infecção associada ao uso de dispositivos intravasculares representa 10 a 20% de todas as infecções nosocomiais e é uma das causas mais frequentes de morbidade e mortalidade, representando uma fonte de bacteremia e sepse em pacientes hospitalizados, aumentando os custos de internação e tempo de permanência hospitalar. Em Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais a taxa de infecção é inversamente proporcional ao peso de nascimento do recém-nascido. Aproximadamente 20% dos neonatos prematuros com peso de nascimento muito baixo (inferior a 1.500g) experimentam uma infecção sistêmica durante sua estada inicial no hospital. Os Gram-positivos são os principais agentes isolados nessas infecções, sendo os *Estafilococos* coagulase-negativa os mais frequentes, seguido pelo *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus*. Os bacilos Gram-negativos também são isolados, com destaque para crescente participação das enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido. Espécies de *Candida* com resistência crescente ao fluconazol, também são isoladas com frequência. Em todos estes microrganismos, a baixa sensibilidade microbiana aos antibióticos tradicionalmente empregados é um fenômeno preocupante e crescente. As infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter são diagnosticadas quando microrganismos idênticos são isolados de culturas de cateteres e das hemoculturas sem fonte aparente de infecção, exceto o cateter. A confiabilidade da cultura de cateter para o diagnóstico de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter depende da técnica de cultura empregada. As técnicas moleculares podem auxiliar no diagnóstico e entendimento destas infecções, pois algumas dessas técnicas são capazes de estabelecer as

relações filogenéticas entre os isolados da ponta do cateter e hemocultura. É de grande importância que haja atenção especial às boas práticas de inserção e manutenção do cateter para auxiliar na prevenção das infecções ocasionadas por esses dispositivos. O objetivo desse trabalho foi revisar vários aspectos das infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter quanto à patogênese, etiologia, diagnóstico e novas estratégias de prevenção, baseadas no conhecimento dos mecanismos de adesão bacteriana e formação de biofilme. O biofilme é um fator de virulência de muitos microrganismos envolvidos nessas infecções, sendo sua formação regulada pela troca de sinais químicos entre as células, num processo conhecido como “quorum-sensing”. Uma nova forma de prevenir a colonização de cateteres e diminuir as infecções relacionadas a esses dispositivos é interferir com essa comunicação célula-célula que confere a esses microrganismos a capacidade de se organizar em biofilmes complexos que os protege do sistema imune do hospedeiro e confere maior resistência aos antimicrobianos.

Introdução

O uso de cateteres tem sido de grande utilidade clínica já que permitem o acesso rápido da corrente sanguínea, sendo utilizados para inúmeras finalidades como a administração de fluídos endovenosos, medicamentos, nutrição parenteral total, hemodiálises, entre outras. No entanto estes dispositivos não estão isentos de riscos de complicações mecânicas e infecciosas. As infecções relacionadas a cateteres constituem uma das principais causas de bacteremia nosocomial primária.^{1,2}

As Infecções da corrente sanguínea relacionada a cateteres (ICSRC) são responsáveis por mais de 60% dos episódios de bacteremias nosocomiais em hospitais europeus. As altas taxas de ICSRC associadas ao crescente aumento das taxas de resistência bacteriana tornam essas infecções particularmente preocupantes.³ São considerados, como relacionados ao cateter venoso, tanto os episódios de infecção local, evidenciados pela colonização do cateter, quanto os episódios de infecção sistêmica que ocorrem como resultado direto da presença dele. Várias condições têm sido apontadas como fatores de risco para o desenvolvimento de ICSRC, tais como a duração do cateterismo, a colonização cutânea no local da introdução do cateter, a manipulação frequente da linha venosa, sua utilização para medir a pressão venosa central, o tipo de curativo utilizado, a doença básica e a gravidade do estado clínico.⁴ Associados a esses fatores, mecanismos imunológicos imaturos e uso de sistemas de suporte de vida invasivos fazem com que recém-nascidos (RN) principalmente prematuros sejam particularmente susceptíveis a essas infecções. Aproximadamente 20% dos neonatos prematuros com peso de nascimento muito baixo (inferior a 1.500g) experimentam uma infecção sistêmica durante sua estada inicial no hospital⁵.

Pessoa-Silva et al.⁶ em um estudo epidemiológico de infecções nosocomiais relacionadas a neonatos no Brasil, revelaram que assim como a pneumonia, as infecções da

corrente sanguínea constituem as principais infecções nosocomiais que acometem neonatos, e isso se torna substancialmente preocupante ao se tratar de neonatos com peso de nascimento muito baixo. As infecções da corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres venosos centrais (CVC) alcançaram nesse estudo a taxa de aproximadamente 35% dos casos diagnosticados.

Segundo Pessoa-Silva et al.⁶ 60% das mortes entre crianças em seu primeiro ano de vida ocorrem durante o período neonatal. A mortalidade é três vezes maior em neonatos e prematuros com peso de nascimento muito baixo que desenvolvem sepse do que aqueles que não desenvolvem. Na verdade, a sepse é responsável por aproximadamente metade dos óbitos de neonatos e prematuros com peso de nascimento muito baixo e em média na segunda semana de vida.⁵

Em vista da importância das ICSRC este trabalho de revisão bibliográfica tem como objetivo abordar a patogenia, etiologia, diagnóstico e prevenção destas infecções, com ênfase às infecções relacionadas a esses dispositivos em neonatos.

Patogenia e etiologia das infecções sanguíneas relacionadas a cateter vascular

Os tipos de cateteres intravasculares são: cateter venoso periférico (CVP), cateter central inserido perifericamente (PICC), cateter venoso central não tunelizado (é o tipo de CVC mais utilizado), cateter venoso central tunelizado, cateter totalmente implantável (CAT), flebotomia, cateter da artéria pulmonar e cateter umbilical. Os CVCs podem ser classificados quanto ao tempo de uso, tipo de material utilizado, tipo de implantação, pela presença ou não de válvulas e pelo número de lumens e vias.

As quatro vias pelas quais os microrganismos podem acessar os cateteres intravasculares são: extraluminal, intraluminal, hematogênica ou via infusos contaminados

(Figura 1). A pele é a principal fonte para colonização e infecção de cateter de curta duração. As bactérias que estão na pele do paciente migram ao longo de sua superfície, colonizando a extremidade distal, resultando em infecção.⁷ Entretanto, esses microrganismos também podem colonizar a superfície interna do cateter, onde esses se aderem e podem tornar-se incorporados a um biofilme que permite a sustentação da infecção local e a disseminação hematogênica. Essa colonização intraluminal pode ocorrer através da manipulação da conexão e abertura do sistema pelo paciente ou por profissionais da área da saúde. Quando cateteres são utilizados por longos períodos, a colonização intraluminal é maior do que a extraluminal. Por outro lado, a contaminação por via hematogênica ou infusão de substâncias contaminadas é relativamente incomum.^{8,9,10}

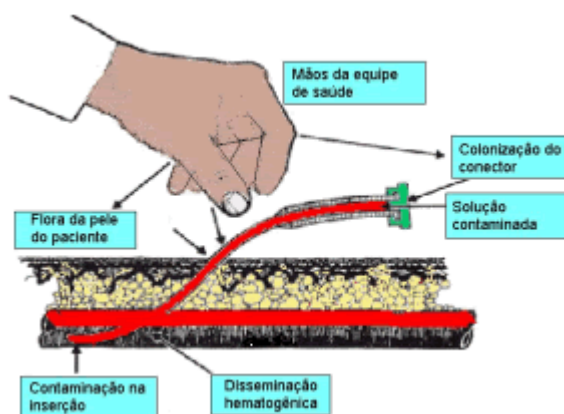


Figura1: Vias de acesso dos microrganismos aos cateteres intravasculares.

O material com o qual é feito o cateter e a virulência intrínseca do microrganismo infectante são fatores patogênicos importantes. Os cateteres feitos com PVC e poliuretano são menos resistentes à aderência microbiana em relação aos que são construídos com *Teflon*® ou silicone. Irregularidades em sua superfície favorecem a aderência de vários microrganismos, como os Estafilococos Coagulase-Negativa (ECN), *Acinetobacter calcoaceticus* e *Pseudomonas aeruginosa*.¹¹ Além disso, certos materiais são mais

trombogênicos do que outros, uma característica que também pode predispor à colonização do cateter. O *S. aureus* pode aderir à fibronectina, produzida pelo paciente, que recobre o dispositivo. Além disso o polissacarídeo extracelular (biofilme) produzido por ECN e espécies de *Candida*, pode atuar como barreira à fagocitose e bloquear a penetração dos antibióticos.¹¹

As bactérias Gram positivas são os principais agentes isolados nessas infecções e os ECN lideram em levantamento realizado pelo National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) entre 1992 e 1999¹², com 37% dos casos, seguido pelo *Enterococcus* com 13,5%, dos quais 25,9% foram resistentes a vancomicina. Também o *S. aureus* se destaca correspondendo a 12,6%, sendo mais da metade resistente à oxacilina. Os bacilos Gram negativos correspondem a 14% dos microrganismos isolados, com destaque para crescente participação das enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL). Espécies de *Candida* spp. são responsáveis por 8% das ICSRC, sendo a *Candida albicans* associada com 48% dos casos, cedendo espaço à *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* com resistência crescente ao fluconazol.

Através dos dados da Tabela 1, pode-se verificar a etiologia das infecções da corrente sanguínea (ICS) nos anos de 1986 a 1989 e 1992 a 1999, com uma maior frequência de ECN nos dois períodos analisados.

Tabela 1: Microrganismos mais isolados em infecções nosocomiais da corrente sanguínea.

Microrganismo	1986-1989 (%)	1992-1999 (%)
ECN	27	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	13
<i>Enterococcus</i>	8	13
Bacilos gram-negativos	19	14
<i>Escherichia coli</i>	6	2
<i>Enterobacter</i>	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	3
<i>Cândida</i> spp.	8	8

Fonte: CDC¹¹.

A Tabela 2 demonstra os dados apresentados pelo NNIS de Janeiro de 1992 a Junho de 2004 quanto à incidência de infecções associadas a cateteres de acordo com o tipo Unidade de Terapia Intensiva (UTI).

Tabela 2: Incidência de ICSRC de acordo com o tipo de UTI.

Tipo de UTI	Taxa média 1000 cateteres/dia
Coronariana	3.5
Cardiotorácica	2.7
Neurocirurgia	4.6
Pediátrica	6.6
Cirúrgica	4.6
Trauma	7.4
Queimadura	7.0
Respiratória	4.8

Fonte: NNIS¹³

Mais de 90% das ICSRC estão associadas com cateteres vasculares centrais.⁷ Estima-se que 248.000 infecções sanguíneas ocorrem em hospitais dos E.U.A. e acredita-se que uma grande parte destas infecções está associada com a presença de um CVC.¹⁴ Os CVC inseridos em veia jugular estão associados com duas vezes e meia mais infecção que cateteres inseridos em veia subclávia.¹⁵ A taxa de mortalidade atribuída à utilização de cateter venoso central é de 12% a 25%, prorrogando a hospitalização por 10 a 40 dias, onde se acrescenta custos para o tratamento em torno de US\$ 33.000-35.000 por paciente.^{16,17}

ICSRC em UTI neonatal

A maior susceptibilidade à infecção durante o período neonatal se deve às deficiências no desenvolvimento do sistema de defesa no RN, tanto local como sistêmica.^{18,19,20,21}

A aquisição da microbiota neonatal é influenciada pela flora genital materna, o tipo de aleitamento, o pessoal em contato, o ambiente onde o bebê nasce e permanece, pela flora dos objetos e de outros RN desse ambiente. A colonização normal do RN inicia-se durante o nascimento, com o contato com a mãe e com o ambiente, até atingir um equilíbrio e ser estabelecida a flora normal endógena neonatal.^{22,23,24,25,26}

A pele só se torna madura por volta das 32^o a 34^o semanas de gestação, portanto os recém-nascidos pré-termos (RNPT) são mais suscetíveis às infecções. As superfícies epiteliais da pele e mucosas do trato gastrointestinal e respiratório podem perder sua integridade com a manipulação rotineira e agressiva dentro das unidades de terapia intensiva neonatal (UTIN) por meio de punções venosas, instalação de dispositivos invasivos, sondas nasogástricas, tubos endotraqueais e outros, facilitando a entrada de microrganismos na corrente sanguínea.²⁷ O cordão umbilical, pelo aumento da permeabilidade e a colonização por patógenos, também pode ser a porta de entrada para o agente infeccioso, principalmente pela proximidade do sistema circulatório. Portanto crianças criticamente doentes que recebem cuidados em UTIN têm risco aumentado de adquirir infecção hospitalar, devido a imaturidade imunológica e uma série de diagnósticos invasivos e procedimentos terapêuticos.²⁸

As ICS são as mais frequentes infecções nosocomiais em pacientes de UTINs.²⁹ A incidência acumulada aumentou como resultado da maior taxa de sobrevivência entre recém-nascidos e de uma maior utilização de cateteres venosos centrais.³⁰ Essas infecções em UTIN contribuem significativamente para a morbidade hospitalar, bem como o aumento de custo devido à prolongada hospitalização sendo, portanto a complicação mais comum e grave relacionadas a cateteres intravenosos.^{31,29}

De 1992 a 2004, a incidência de infecções sanguíneas associadas a cateteres em UTIs pediátricas segundo o NNIS¹³ foi de 6,6 por 1000 cateteres/dia (Tabela 2). Em UTINs a taxa

de infecção é inversamente proporcional ao peso de nascimento do recém-nascido variando de 9,1 por mil cateteres dias em crianças com peso ao nascimento <1000g a 3,5 por 1000 cateteres dias em crianças com peso de nascimento >2500 g (Tabela 3).

Tabela 3: Incidência de ICSRC em neonatos de acordo com o peso ao nascimento.

Peso (g)	Taxa média 1000 cateteres/dia
≤1000	9.1
1001 - 1500	5.4
1501 - 2500	4.1
>2500	3.5

Fonte: NNIS¹³

A disponibilidade de um acesso venoso seguro que possa permanecer durante período de tempo prolongado é muito importante em crianças em UTIs. Os CVC são usados preferencialmente em UTINs por tempo mais prolongado, ao contrário do CVP, que é indicado por um curto período de tempo, e possuem limitações como a dificuldade de acesso e o tipo de medicamento que podem ser neles infundidos. Por isso, em UTIN é geralmente necessário o CVC que além de permitir infusão de uma vasta gama de medicamentos, permite infusão de nutrição parenteral e pode ser até utilizado para monitorização hemodinâmica.^{32,33}

Os PICCs são usados no tratamento de neonatos há quase três décadas e são os mais utilizados ultimamente por apresentarem algumas vantagens: procedimento rápido, a veia continua visível após a cateterização, medicação irritante ou de alta osmolaridade pode ser seguramente administrada, permitindo melhor controle de risco de contaminação. Também deve ser lembrado que diminui a necessidade de várias tentativas de punção periférica eliminando a dor e a instabilidade psicológica, e são recomendados para pacientes que requerem acesso por mais de sete dias e menos de três meses.^{34,35}

No entanto, o acesso vascular central através dos vasos umbilicais em muitos casos ainda se mantém como primeira opção. O uso desse cateter é muitas vezes limitado pelas graves complicações que pode ocasionar, incluindo trombose, perfuração vascular, necrose hepática, perfuração cardíaca, enterocolite necrosante.^{36,37} Entretanto, seguem tendo suas indicações e podem ser muito úteis, sobretudo em situações de emergência (reanimação) e em recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento nos primeiros dias de vida. Os CVCs inseridos cirurgicamente (flebotomia) apresentam maior risco de infecção quando comparados aos demais tipos cateteres.^{36,29}

Dados sobre o risco de infecção sanguínea relacionados com PICC em pacientes internados são limitados. Um estudo prospectivo realizado por Safdar e Maki¹⁷ mostraram que PICCs utilizados em pacientes de alto risco estão associados com uma taxa de ICSRC semelhante ao CVC convencional colocado na jugular interna ou veias subclávia (2 a 5/ 1.000 cateteres-dia), muito superiores às taxas de infecção com PICCs utilizados exclusivamente no ambulatório (cerca de 0,4/1.000 cateteres-dia) e também superior às taxas de ICSRC com CVCs tunelizados (cerca de 1/1.000 cateteres-dia).

Prevalência dos microrganismos isolados em ICSRC

Os ECN são os agentes freqüentemente isolados em ICSRC em neonatos, seguidos por *S. aureus* e *Candida parapsilosis*. Das espécies de ECN, o *S. epidermidis* tem sido o mais frequentemente isolado de infecções em neonatos e seu principal fator de virulência é a capacidade de aderir a instrumentos médicos e de formar biofilmes.^{38,39,40} O *S. haemolyticus* é a segunda espécie mais frequentemente isolada entre os ECN, e em seguida as espécies *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri* e *S. capitis*.^{41,42,43,44}

Os ECN são capazes de permanecerem viáveis no ambiente hospitalar e em equipamentos médicos por semanas a meses. O aumento da incidência de bacteremia nosocomial por ECN em neonatos nas últimas décadas tem sido associado ao aumento da sobrevivência de neonatos com peso de nascimento muito baixo, a sua longa permanência no ambiente hospitalar e ao aumento do desenvolvimento de resistência a antibióticos.^{45,46,47,40,48,49} A maior frequência desse microrganismo é devido a sua predominância na flora dos recém-nascidos. Atualmente os ECN são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas que se prevalecem de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções. Contudo, a interpretação de hemoculturas positivas para os ECN é particularmente difícil devido ao fato desses microrganismos colonizarem a pele e as membranas mucosas durante a coleta de sangue. A esse respeito, investigadores têm usado uma variedade de critérios clínicos e laboratoriais para distinguir contaminação de bacteremia. Assim, o diagnóstico de bacteremia tem sido feito com base nos dados clínicos dos pacientes e no isolamento de microrganismos idênticos em duas ou mais hemoculturas. Entretanto, como o volume sangüíneo é pequeno em recém-nascidos prematuros com baixo peso, somente uma hemocultura é geralmente realizada para se evitar a necessidade e os riscos de transfusões devido a venopunções constantes.

Diagnóstico das ICSRC

Os marcadores clínicos apresentam uma pobre correlação, não sendo em muitos casos suficiente para estabelecer o diagnóstico, em virtude da sua pouca sensibilidade e especificidade. Febre, associada ou não a calafrios, é um marcador bastante sensível, porém, pouco específico, especialmente em pacientes graves para predizer se esta infecção esta

relacionada ao cateter vascular em UTIs.⁵⁰ Sendo assim é de grande importância a utilização de técnicas microbiológicas para confirmação deste tipo de infecção.

Quando o paciente apresenta bacteremia, se questiona se o cateter é a fonte primária dos microrganismos presentes no sangue. A incapacidade de obter as culturas e de abordar esta questão pode levar a um diagnóstico falso-negativo ou falso-positivo. Um diagnóstico falso-negativo certamente pode aumentar a morbidade, enquanto um falso positivo pode resultar na remoção desnecessária do cateter ou na inadequada prescrição de antibióticos. Este resultado é particularmente perigoso porque promove o aparecimento de patógenos resistentes aos antibióticos e gera custos excedentes.⁵¹

Para realização do diagnóstico de infecção relacionada ao uso de cateter devem-se definir algumas categorias dos diferentes fenômenos infecciosos:^{8,1}

- Colonização do cateter: crescimento significativo de um microrganismo em cultura quantitativa (≥ 1000 UFC/ml) ou semiquantitativa (≥ 15 UFC) da ponta do cateter, do segmento subcutâneo ou da conexão, esse fenômeno não implica bacteremia e nem requer tratamento.
- Infecção localizada: Com isolamento de microrganismo ou não, podendo ser associada com eritema, edema e exudato purulento, podendo associar-se a outros sintomas e sinais de infecção como febre, com ou sem a presença de infecção da corrente sanguínea concomitante.
- Infecção sistêmica associada com cateter: Bacteremia ou fungemia em paciente com cateter com uma ou mais hemoculturas periféricas positivas, com presença de dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: febre (≥ 38 °C), hipotermia (< 36 °C), apnéia, bradicardia ou

sinais de choque, além da presença de pelo menos uma hemocultura positiva em paciente cujo cateter vascular apresentou cultura semiquantitativa positiva.com manifestações clínicas de infecção (febre ($\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), hipotermia ($< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$), hipotermia, apnéia, bradicardia ou sinais de choque) e sem outra fonte aparente de infecção além do cateter, apresentando o mesmo microrganismo no cateter e na hemocultura no diagnóstico microbiológico.

A referência dos métodos de diagnóstico das ICSRC é baseada em técnicas de cultura da ponta do cateter após a sua remoção. No entanto, nem todos os CVC removidos por causa de uma suspeita de infecção provam realmente estar infectados, e o diagnóstico é sempre retrospectivo. Esta é a razão porque novas técnicas diagnósticas que não exigem a retirada do cateter foram desenvolvidas.⁵²

Métodos de diagnósticos baseados na remoção do cateter

As técnicas microbiológicas mais comuns são as técnicas baseadas na remoção do cateter: cultura qualitativa, cultura semiquantitativa (Maki) e cultura quantitativa. O procedimento qualitativo baseia-se na cultura da ponta do cateter em um meio de cultura líquido, sendo o resultado positivo indicado pela turvação do meio. Esse método não está em uso atualmente, devido à baixa especificidade (75%), apesar de sua alta sensibilidade (100%).^{53,54}

O método semiquantitativo proposto por Maki et al.⁵⁵ ainda é a referência internacional de diagnóstico, e é utilizado como o padrão em qualquer estudo que avalie diferentes métodos diagnósticos. Esse método consiste em rolar a ponta distal do cateter (3-5 cm) na superfície da placa de ágar sangue por no mínimo quatro vezes. O crescimento ≥ 15

unidades formadoras de colônias (UFC) indica colonização significativa do cateter⁵⁶. Marconi et al.⁵⁷ para determinação do melhor ponto de corte para o diagnóstico de ICSRC em neonatos da Unidade Neonatal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu verificaram que o ponto de corte de 122 UFC, apresentou uma sensibilidade de 91%, especificidade de 81,1%, com um valor preditivo positivo (VPP) de 41,7% e um valor preditivo negativo (VPN) de 98,4%, comparado com a sensibilidade de 91,0%, especificidade de 71,6%, e VPP de 32,3% com o ponto de corte de 15 UFC, como recomendado pelo CDC.¹¹

Para evitar a falta de detecção de microrganismos presentes no lúmen do cateter um sistema de cultivo foi desenvolvido por Cleri et al.⁵⁸ onde as culturas quantitativas são obtidas por lavagem da porção interna do cateter com meio de cultura. O número de unidades formadoras de colônias é determinado pela semeadura de diluições desse caldo e contagem do número de colônias. Os autores definiram o valor $\geq 10^3$ UFC/ml como sendo significativo, sendo esta definição baseada na comparação desses resultados com a evidência de bacteremia associada ao cateter. Esse procedimento foi modificado por Brun-Buisson et al.⁵⁴ para uso em rotina, o qual consiste na lavagem da superfície interna da ponta do cateter com 1,0 ml de água estéril, seguida de agitação em vórtex por 1 minuto e semeadura de uma alíquota de 100µl na superfície de uma placa de ágar sangue. A contagem após incubação a 37°C por até 72h de 100 colônias (ponto de corte $\geq 10^3$ UFC/ml) indica colonização significativa do cateter. Este teste apresentou em uma Meta-análise uma sensibilidade de 100%, especificidade de 92%, VPP de 45% e um VPN de 100%.⁵⁹

O valor preditivo dessas culturas pode variar dependendo do tipo e local do dispositivo endovenoso e da fonte da colonização. Para aqueles inseridos há mais de uma semana, onde a disseminação intraluminal da bactéria ocorre a partir da conexão do cateter, o

método semiquantitativo é menos sensível quando comparado com os métodos quantitativos que detectam amostras das superfícies internas e externas do cateter.⁶⁰

Uma desvantagem dessas metodologias de cultura semiquantitativa e quantitativa é a necessidade de retirada do cateter para a realização da cultura, de forma que outras metodologias de diagnóstico de ICSRC que dispensam a retirada do dispositivo devem ser consideradas. Os métodos mais promissores são aqueles que permitem a manutenção do acesso. Esta vantagem é particularmente marcante em pacientes críticos, com dificuldade de acesso, e naqueles com cateteres de longa permanência. Isso tem levado ao uso de novas técnicas para o diagnóstico de ICSRC sem remoção do cateter.

Métodos baseados na permanência do cateter

Os procedimentos para a avaliação das ICSRC sem a remoção do cateter incluem a escovação intraluminal do cateter proposta por Markus et al.⁶¹ onde se utiliza uma escova estéril que é passada na porção intraluminal do cateter. Essa escovação pode capturar biofilme, microrganismos e trombos de fibrina. Os poucos estudos desta técnica têm mostrado resultados discordantes quanto à sensibilidade, especificidade e riscos para o paciente.⁶²

Rusforth et al.⁶³ descreveram uma nova técnica em 1993, onde aproximadamente 1 ml de sangue é aspirado pelo cateter e colocado em um tubo contendo 1,2 ml de solução salina hipotônica e submetido à centrifugação. Posteriormente o sobrenadante é descartado e corado em uma lâmina com laranja de acridina (0,001%) e examinado sob luz ultravioleta para visualização dos microrganismos. Esta é uma técnica simples, rápida (30 min) e barata e apresenta uma sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 87%, 94%, 87% e 93%, respectivamente, segundo uma meta-análise realizada por Safdar et al.⁵⁹

As hemoculturas quantitativas diferenciais de amostras colhidas simultaneamente do cateter e de uma veia periférica são também utilizadas para o diagnóstico das ICSRC. Esse método é considerado positivo quando culturas são positivas em ambas as amostras e a concentração de microrganismos presentes na cultura da amostra coletada a partir do dispositivo é de 3 a 5 vezes maior que a cultura da amostra periférica. Por outro lado, quando a fonte da bacteremia não é o cateter, a contagem de microrganismos é semelhante nas duas amostras. A sensibilidade deste método varia de 79 a > 80% e especificidade de 94 a 100%.^{64,65} Esta técnica pode facilitar o acompanhamento da eficácia do tratamento antibacteriano que deve ser efetuado se o cateter é deixado no local, porém normalmente, os hospitais não têm metodologias para hemoculturas quantitativas e essa técnica não é utilizada rotineiramente na prática clínica.^{66,50}

Outra metodologia que pode ser utilizada sem a remoção do cateter foi descrita por Blot et al.⁶⁷ na qual o tempo de positividade diferencial (DTP) de amostras pareadas, coletadas através do cateter e pela punção venosa indicam ICSRC. O DTP é obtido a partir dos métodos de monitorização contínua de crescimento de microrganismos no sangue (BACTEC, BactAlert). Esse método é considerado positivo para ICSRC quando a amostra de sangue coletada do cateter torna-se positiva 2 horas antes da hemocultura coletada por veia periférica. O valor desta técnica provavelmente é maior em pacientes com CVC de longa permanência, em virtude da via endoluminal ser a rota predominante de colonização destes cateteres, enquanto nos CVCs de curta permanência há o predomínio da superfície externa do cateter como via de colonização e infecção. Outra questão frequente é quanto à necessidade de coleta de amostras de todas as vias do CVC quando este apresenta múltiplos lúmens. Dobins et al.⁶⁸ estudando CVCs de triplo lúmen, observaram que na coleta randômica de apenas um dos lúmens foi detectado apenas 60% dos CVCs colonizados e associados com

ICSRC. Portanto para estes autores cada lúmen deveria ser considerado como possível fonte de ICSRC. Em estudo de Safdar et al.⁵⁹ esse método apresentou uma sensibilidade e especificidade de 94% e 99%, respectivamente e um VPP e VPN de 94% e 91%, respectivamente.

Métodos genotípicos no diagnóstico das ICSRC

Para a elucidação das ICSRC é fundamental determinar a similaridade das linhagens de microrganismos isoladas das pontas de cateteres e das hemoculturas. Os testes bioquímicos podem determinar o gênero e a espécie do microrganismo 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. Em estudo comparativo entre técnicas moleculares e métodos microbiológicos na determinação das fontes de infecções nosocomiais Martín-Lozano et al.⁶⁹ avaliaram a utilidade do antibiograma para estudos epidemiológicos e concluíram que o diagnóstico da fonte de bacteremia utilizando-se de critérios clínicos convencionais e/ou microbiológicos, incluindo antibiograma, nem sempre são precisos e suficientes.

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 microrganismos é fundamental para a elucidação das ICSRC.

Os sistemas de tipificação molecular podem ser empregados para investigação de surtos, confirmação e delineamento dos padrões de transmissão de um ou mais clones, testes de hipóteses sobre a origem e veículos de transmissão destes clones e monitoramento de seus reservatórios. A análise molecular também é útil para a realização de levantamentos epidemiológicos e avaliação de medidas de controle por meio da documentação, da ocorrência de determinadas cepas ao longo do tempo e circulação de clones em populações infectadas.^{70,71}

A aplicação e a interpretação de ferramentas de tipagem microbiana em estudos epidemiológicos requerem a compreensão das limitações das técnicas. Além da confiabilidade, uma técnica é considerada válida quando sua habilidade de discriminação entre cepas é satisfatória e uma base biológica para o agrupamento de cepas com tipos aparentemente distintos é possível.⁷² Existem várias técnicas de tipagem molecular que se fundamentam na diferenciação de padrões de perfis genotípicos analisados em amostras de DNA total ou digeridos através de enzimas que fragmentam o DNA em diferentes partes e que podem ser analisados por meio de seus diferentes perfis de restrição. Contudo, os padrões de perfis são nitidamente complexos e os isolados necessitam ser separados através de eletroforese.⁷³

Baseado nos princípios da reação em cadeia da polimerase (PCR) o avanço da tipagem molecular foi facilitado, surgindo várias outras técnicas: o RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA based PCR), REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Sequence based PCR), ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR), AFLP (Amplified-Fragment-Length Polymorphism) e mais recentemente a técnica de Sau-PCR (Restriction Endonuclease Sau3AI Fragment Polymorphism), que podem ser utilizadas na análise do polimorfismo bacteriano.

Em 1984, Schwartz e Cantor⁷⁴ descreveram a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), introduzindo uma nova maneira de separar o DNA, onde o tamanho limite de separação de DNA em agarose foi ampliado de 30-50 kb para bem mais de 10 Mb (10.000 kb). Em vez da clonagem de um grande número de pequenos fragmentos de DNA, o PFGE permite a clonagem e análise de um número menor e de grandes dimensões de partes de um genoma. O método de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) é a ferramenta de tipagem molecular mais difundida e utilizada no mundo e é considerada como método de escolha para diversos microrganismos, como por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).^{75,76} Em geral, PFGE é a técnica de tipagem molecular mais reprodutível e discriminatória disponível. As maiores dificuldades relacionadas ao PFGE são a dificuldade da técnica de implementação e o custo inicial do equipamento. A preparação de uma amostra de DNA genômico apropriado requer em média de 1 a 3 dias, dependendo do organismo testado. Entretanto, uma vez que o método é implementado no laboratório, ele pode ser prontamente aplicado a uma grande quantidade de microrganismos com apenas algumas modificações mínimas.⁷⁷

Gori et al.⁷⁸, em estudo comparativo entre as técnicas de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e PFGE para tipagem de cepas *Klebsiella pneumoniae* ESBL, verificaram que ambas as técnicas demonstraram concordância de resultados e discriminação de grupos epidemiologicamente relatados dessas cepas. Mais variantes subclonais foram determinadas entre os clones epidêmicos pela análise do PFGE do que a técnica de RAPD. Sendo assim, ambos são úteis para tipagem de cepas de *K. pneumoniae* em investigações epidemiológicas, entretanto o método de RAPD mostrou-se mais eficiente em relação a sua viabilidade e custo. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Renders et al.⁷⁹ para cepas de *P. aeruginosa* que concluíram que a técnica de RAPD pode ser usada com confiança como

primeira triagem nos estudos epidemiológicos e não como única técnica de tipagem microbiana, entretanto, a habilidade na avaliação das taxas de evolução molecular das cepas depende da escolha das enzimas de restrição e dos primers, tanto se tratando de RAPD quanto PFGE. Outros estudos recomendam a utilização de ambas as técnicas de RAPD e PFGE visando aumentar o poder discriminatório.^{80,70,81} O método de REP-PCR usa primers específicos que se liga a múltiplas seqüências repetitivas não-codificadoras (geralmente 30 a 500pb) espalhadas pelo genoma bacteriano. Sendo uma estratégia estabelecida para a classificação de subespécies e para o delineamento de cepas das bactérias. Os múltiplos amplicons do DNA de diferentes tamanhos e de várias quantidades (intensidades) são gerados durante o PCR.^{82,83}

SAU-PCR é uma técnica baseada na digestão do DNA genômico com a endonuclease de restrição Sau3AI e subsequente amplificação com seqüência de primers que é baseado no reconhecimento Sau3AI. O método foi testado em cepas de bactérias lácticas, mas poderia ser proposto para praticamente qualquer organismo cultivável. O Sau-PCR pode ser considerado uma possível alternativa para a técnica de RAPD, nos casos em que os níveis de reprodutibilidade e polimorfismo não são satisfatórios, e também como uma alternativa mais viável economicamente quando a abordagem for a utilização de enzimas de restrição e amplificação em relação a técnica de AFLP. Seu sítio de ligação, GATC, é de 4 pb de comprimento com valores percentuais de G+C de 50, o que a torna capaz de produzir um grande número de pequenos fragmentos da digestão total do DNA da maioria dos microrganismos. Esta enzima gera cortes coesivos (sticky-ends) com 4 pares de bases nas extremidades. Além disso, todos os primers são dotados de 7 nucleotídeos de cadeia longa CCGCCGC na extremidade 5', que não participa do anelamento inicial (fase de baixa estringência), com o objetivo de conferir, através apenas do uso de C e G, uma temperatura de

anelamento convenientemente alta para amplificação dos sucessivos ciclos de alta estringência.⁸⁵

A técnica de ERIC-PCR é baseada na análise de seqüências cromossomais repetidas, que tem sido usada para a caracterização clonal de diferentes espécies de enterobactérias e para o estudo da relação genética entre isolados. Entretanto, o ERIC-PCR tem sido utilizado com êxito para a diferenciação clonal de cepas de *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio cholerae*^{86,87}, e no estudo de variabilidade genética de *E. coli* patogênicas para aves.⁸⁸

Estudos comparando os métodos de RAPD-PCR, REP-PCR e ERIC-PCR concluem que a validade do método de epidemiologia molecular depende do microrganismo estudado, por exemplo, segundo Cartelle et al.⁸⁴ apesar das técnicas de ERIC-PCR e RAPD-PCR apresentarem os mesmos números de genótipos para *Klebsiella pneumoniae*, a técnica de ERIC foi o melhor método baseado em PCR para tipagem desse microrganismo, entretanto para amostras de *Acinetobacter baumannii* a melhor técnica de tipagem foi o REP-PCR.

A técnica de REP-PCR possui grande capacidade discriminatória e reprodutível em relação ao PFGE para diversas espécies de enterobactérias e também para algumas leveduras.^{89,84,82}

Uma excelente correlação foi obtida entre os resultados das análises com RAPD-PCR e ERIC-PCR para tipagem de *Aeromonas* spp., sendo que todas as cepas apresentaram mesmo perfil tanto nas análises com RAPD-PCR quanto nas análises com ERIC-PCR, confirmando o bom poder discriminatório dessas técnicas para essa espécie. Entretanto, os autores não recomendam a técnica de REP-PCR para tipagem de *Aeromonas* spp., pois através dela não foi possível analisar todas as cepas, demonstrando a presença de baixo número de produtos amplificados, sugerindo que seqüências palindrômicas extragênicas repetitivas podem não estar amplamente distribuídas no genoma de *Aeromonas* spp.⁹⁰

Prevenção das ICSRC

As medidas para minimizar o risco de infecção associada com terapias intravasculares devem encontrar um equilíbrio entre a segurança do paciente e a relação custo-benefício.¹¹ Esforços intensivos têm sido dispensados com vista à prevenção e controle dessas infecções, por meio de agência local, estadual e federal, sociedades de profissionais, universidades, institutos de pesquisa, organizações nacionais e internacionais. Assim, programas educacionais baseados em evidências, juntamente com estratégias que reforcem o comportamento profissional desejado, figuram como instrumento valioso para modificar as atitudes dos profissionais de cuidado à saúde.⁹¹

A Europa e os Estados Unidos são destaque na utilização das estratégias educacionais como instrumentos facilitadores para diminuição das taxas de infecção relacionadas a cateteres vasculares, nesse sentido nos Estados Unidos o Guideline publicado pelo CDC¹¹, recomenda a prevenção de ICSRC em várias categorias baseadas em evidências, ou seja, utiliza resultados de pesquisas, envolvendo estudos experimentais, estudos clínicos ou epidemiológicos para recomendar a implementação de uma determinada medida de prevenção (Tabela 4).

Tabela 4: Categorias segundo CDC.¹¹

Categorias	Natureza do Estudo
IA	Fortemente recomendado para implementação e fortemente embasado por estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem elaborados.
IB	Fortemente recomendado para implementação e embasado por alguns estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos e uma racionalidade teórica forte.
IC	Exigido por regulamentações, regras ou padronizações estatais ou federais.
II	Sugerido para a implementação embasada por estudos clínicos sugestivos ou epidemiológicos ou uma racionalidade teórica.
Não resolvido	Práticas para as quais a evidência não é suficiente ou não há consenso em relação à existência de eficácia.

Fonte: CDC¹¹.

Segundo o CDC, formação e educação da equipe de saúde, incluindo técnicas de passagem, cuidados de manutenção e inserção de cateteres vasculares são classificadas como IA. Sherertz et al.⁹² relataram que um programa de educação de médicos em formação pode diminuir o risco de ICSRC. Um curso de 1 dia em práticas de controle de infecção e sobre os procedimentos de inserção de acesso vascular demonstrou reduzir a taxa de infecção em 73%, de 3.3 para 2.4 por 1000 cateteres/dia.

Yilmaz et al.⁹³, observaram melhora significativa ($p = 0,004$) na taxa de ICSRC após um período de treinamento. A taxa de infecção foi baixa durante os primeiros 3 meses de treinamento, mas aumentou 2,08 vezes após o terceiro mês. Os autores concluíram que o treinamento regular dos profissionais que estão no comando da inserção e manutenção de cateteres é altamente eficaz na redução das taxas ICSRC.

Com relação à técnica de inserção do cateter, diversas recomendações baseadas em evidências IA estão disponíveis, incluindo as técnicas de inserção asséptica. De acordo com as orientações, a inserção e a manutenção dos cateteres venosos centrais, exigem uma atenção

especial à rigorosa higiene das mãos, portanto a punção do acesso deve ser sempre precedida pela higienização das mãos. A limpeza das mãos deve ser realizada com água e sabão ou um antisséptico como o álcool^{94,95} e o uso de luvas não é considerado um substituto para uma boa higiene das mãos.

As diretrizes recomendam uma desinfecção da pele do paciente com um produto à base de clorexidina 2% antes da inserção do cateter. Outros antissépticos são aceitáveis para a utilização na pele, como a tintura de iodo, Iodóforos, e soluções de álcool 70%. Antissépticos contendo iodo podem prejudicar a glândula tireóide do recém-nascido e não devem ser utilizados com cateter umbilical.^{7,97} A literatura é vasta no que tange à avaliação da atividade antimicrobiana dos antissépticos; e, tem demonstrado a eficácia da utilização de clorexidina 2% quando comparada com preparações à base de tintura de iodo 10% ou álcool 70%. Em um estudo de meta-análise com 08 ensaios clínicos controlados randomizados, Chaiyakunapruk et al.⁹⁷ demonstraram que a incidência de ICSRC foi significativamente menor em pacientes cuja antisepsia do sítio de inserção ocorreu com clorexidina. Young et al.⁹⁸ avaliaram o uso de cloroxedina 2% na inserção de CVC comparado com solução à base de iodo na concentração de 10%, e comprovaram redução de ICSRC de 11,3 por 1000 CVC/dia para 3,7 por 1000 cateteres/dia.

Quanto à técnica de inserção do cateter, especialistas recomendam a utilização de barreiras máximas estéreis, que incluem o uso de avental, luvas e campos estéreis, além de gorro e máscara visando à prevenção de infecções associadas ao dispositivo.^{11,98}

Além das competências profissionais, a escolha do local de inserção deve também levar em consideração fatores inerentes ao paciente, como deformidades anatômicas, traqueostomia, complicações mecânicas e o risco de sangramento, entre outros.¹¹

Ainda quanto aos fatores de risco envolvidos, a utilização de CVC de múltiplos lumens resulta em vantagens para pacientes que necessitam de diversas medicações intravenosas, testes laboratoriais, transfusões de hemoderivados e nutrição parenteral. Desde a sua introdução, esses cateteres têm sido preferidos para pacientes que exigem um acesso central. No entanto, podem induzir a taxa mais altas de colonização e ICSRC devido à frequência de manipulação, com possibilidade de inoculação de microrganismos, portanto a utilização de CVC com o número mínimo de lumens é essencial para o tratamento do paciente conforme recomendação com grau de evidência IB do CDC.¹¹

De acordo com o CDC¹¹ o uso de antibióticos tópicos (polimixina, bacitracina e neomicina) no sítio de inserção do cateter não é recomendado. Os estudos realizados em relação a esse aspecto não foram capazes de determinar seu efeito profilático, além disso, pode promover infecções fúngicas e resistência antimicrobiana.

Pelas recomendações da categoria IA também não é apropriada a utilização de frascos com múltiplas doses de medicação. O acesso ao diafragma do recipiente de múltiplas doses deve se manter estéril e ser limpo com uma solução alcoólica 70% antes da retirada do fluido. Apenas dispositivos estéreis devem ser utilizados para retirar o conteúdo do frasco e, o frasco deve ser eliminado se há suspeita da contaminação do conteúdo. Uma vez aberto, o recipiente de múltiplas doses deve ser colocado na geladeira apenas se recomendado pelo fabricante.^{99,100,101}

Em se tratando de curativos no local de inserção do cateter, os mais utilizados nos cateteres vasculares são os transparentes semipermeáveis de poliuretano, assim como os realizados com gaze e fita adesiva (categoria IA¹¹). A taxa de colonização de curativos transparentes é comparável àqueles com gaze. Em estudo realizado por Maki e Ringer¹⁰² a colonização de cateteres com curativos transparentes foi de 5.7%, e a com curativos feitos

com gaze de 4.6%, não revelando diferença significativa na incidência de colonização do cateter ou flebites. É importante destacar que aspectos relacionados a curativos são complexos e controversos, todos têm vantagens e desvantagens.¹⁰³ O curativo transparente promove a visualização do sítio de inserção e as trocas são menos frequentes, porém, pode favorecer a formação de umidade, não sendo recomendado em pacientes que apresentam intensa saída de exsudato. Nos casos que houver drenagem (sangue ou fluido corporal) o curativo com gaze é preferido.^{103,11}

Cateteres cobertos com agentes antimicrobianos ou antissépticos podem diminuir o risco de ICSRC e potencialmente diminuir os custos hospitalares associados com o tratamento dessas infecções, apesar do custo desses dispositivos. Esses cateteres têm sido aprovados pelo FDA para uso em pacientes com peso ≥ 3 Kg¹¹. A decisão do uso de cateteres impregnados com antimicrobianos e ou antissépticos deve ser baseada na melhora da prevenção de ICSRC após os procedimentos padrões terem sido implementados, tais como a educação da equipe, precauções de barreira máxima, e uso de 2% de clorexidina na antisepsia da pele.¹¹

Com a infusão de heparina e vancomicina em CVC, Schwartz et al.⁷⁴ diminuíram a frequência de bacteremia relacionada ao cateter por microrganismos sensíveis à vancomicina, que colonizam o lúmen de cateter. Em um estudo realizado por Garland et al.⁴⁸ o uso profilático de vancomicina-heparina para a prevenção de ICSRCs em UTIN reduziu acentuadamente a incidência de ICSRC em neonatos de alto risco e não promoveu a resistência à esse antimicrobiano, mas foi associado com hipoglicemia assintomática. Entretanto, Segundo recomendação do CDC (categoria IA) não é aconselhável o uso rotineiro de soluções antimicrobianas, especialmente aquelas que contêm vancomicina para a prevenção de infecções sanguíneas. A lavagem do cateter com uma solução antimicrobiana pode ser considerada em circunstâncias especiais, tais como quando um paciente tem uma

história de múltiplas infecções sanguíneas e a utilização de cateter por longos períodos, e a instituição já aderiu a um rigoroso processo de controle de infecção (CDC,2002). O uso de vancomicina como agente profilático na prevenção de ICSRC é um fator de risco independente para aquisição de enterococos resistentes a vancomicina, bem como, o uso prolongado desse antimicrobiano pode levar à emergência de estafilococos com resistência intermediária a vancomicina.

A remoção dos dispositivos intravasculares assim que seu uso não for necessário é recomendação com grau de evidência IA do CDC.¹¹

Novas perspectivas no controle das infecções relacionadas a cateteres

O biofilme é responsável pela maioria das infecções bacterianas e por 65% das infecções relacionadas ao cateter vascular. A formação de biofilme foi considerada como resultado de adesão, formação de microcolônias e produção de polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos. Após 24 horas de inserção, a maioria dos CVC pode se tornar colonizado por microrganismos envolvidos em um biofilme sobre a superfície do cateter, e após oito dias de permanência, dentro do lúmen do cateter. Em alguns casos os microrganismos proliferarão em número suficiente resultando em ICSRC. Nesse contexto, a determinação da produção de biofilme por microrganismos isolados dessas hemoculturas colhidas do cateter pode contribuir para a tomada de decisão de retirada ou não do dispositivo, pois o biofilme contribui com a sobrevivência do microrganismo presente no cateter, pois impedem a penetração dos antimicrobianos conferindo maior resistência aos microrganismos.³⁹

Atualmente são utilizados diversos métodos para detecção de biofilmes em *Staphylococcus* e ainda em complemento a esses métodos são utilizados os moleculares

(Reação em Cadeia da Polimerase, PCR), que fornece evidência direta das bases genéticas da produção de biofilme. Entretanto existem métodos mais simples disponíveis, que poderiam ser utilizados na rotina de um laboratório clínico, como os métodos qualitativos descrito por Christensen et al.¹⁰⁴ e o método Agar Vermelho Congo (AVC) descrito por Freeman et al.¹⁰⁵ O mais comumente usado é o método de aderência ao tubo descrito por Christensen et al.²⁰⁰⁴. Vários autores utilizaram esse método obtendo resultados confiáveis, e mostrando ser eficiente com excelente sensibilidade e adequada especificidade, fornecendo diagnóstico confiável e adequado para uso em rotina.¹¹

Vários sistemas reguladores estão envolvidos na determinação da virulência de *S. aureus*, de todos esses sistemas regulatórios existentes, os mais caracterizados são o *agr* e o *sar*¹⁰⁶. O sistema *agr* engloba dois operons transcritos em direção oposta. O operon transcrito a partir de P2 codifica a molécula de RNA II, que regula a expressão dos genes *agrB*, *agrD*, *agrC* e *agrA* que interagido com o sistema *sar* controla a transcrição de um RNAm, chamado RNAIII que controla a expressão dos genes de virulência de *S. aureus*. Na fase logarítmica de crescimento bacteriano ocorre a expressão dos genes que codificam adesinas, enquanto na fase estacionária a molécula de RNAIII inibe a expressão dos genes que codificam adesinas e induz a expressão dos genes que codificam toxinas. O sistema *agr* é controlado pelo *quorum sensing*, linguagem utilizada pelas bactérias que quando estão em alta densidade celular podem “sentir” qual o melhor momento para expressar os fatores de virulência e garantir que o ataque conjunto ao hospedeiro seja eficiente. O princípio do *quorum-sensing* é simples, quando uma única bactéria libera um auto-indutor no ambiente, sua concentração é muito baixa para ser detectada; no entanto, quando um número suficiente de bactérias está presente a concentração de auto-indutores alcança um nível suficiente para fazer com que as células respondam ao estímulo, ativando ou inibindo genes alvo.

Uma nova forma de prevenir a colonização e formação de biofilme por *S. aureus* e *S. epidermidis* é interferir com essa comunicação célula-célula que leva ao fenótipo de virulência. A síntese de RNAIII é regulada por um mecanismo de *quorum-sensing* e pode ser inibida por um peptídeo inibidor de RNAIII (RIP). O RIP é um peptídeo linear de sete aminoácidos produzido por estafilococos coagulase-negativa (sugerido ser *S. warneri* ou *S. xylosus*) e tem a sequência YSPXTNF, onde X pode ser uma cisteína, um triptofano, ou um aminoácido modificado.^{107,108} Ambos, RIP natural e um análogo sintético YSPXTNF são extremamente efetivos na inibição da síntese de RNAIII *in vitro* e *in vitro*. Estudos mostram que quando *S. aureus* é pré-incubado na presença de RIP, o potencial patogênico da bactéria é grandemente reduzido. Vários estudos com modelos animais têm verificado forte atividade na prevenção de infecções por *S. aureus*, incluindo aquelas causadas por linhagens resistentes às drogas, como *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) e *S. aureus* vancomicina intermediários (VISA).^{107,108}

Estes resultados suportam a hipótese que RIP poderia ser usado para cobrir cateteres para prevenir a colonização e conseqüentes infecções relacionadas a esses dispositivos. A prevenção de formação de biofilme por RIP pode portanto não só diminuir a taxa de infecção, mas também preservar a suscetibilidade das bactérias aos antibióticos (Cunha, 2009).

Conclusões

As ICSRC são responsáveis por grande parte dos episódios de bacteremias nosocomiais e constituem uma das principais infecções que acometem neonatos prematuros de baixo peso. A maioria das infecções sanguíneas relacionadas com cateteres vasculares (ICSRC) é causada pelos Estafilococos coagulase-negativa (ECN), sendo a patogênese dessas infecções complexa e especula-se estar diretamente relacionada à aderência dos

microrganismos, que se tornam capazes de colonizar o dispositivo, formando o biofilme, que potencializa sua patogenicidade.

O diagnóstico definitivo das ICSRC é estabelecido quando o cateter é significativamente colonizado com o mesmo microrganismo encontrado na hemocultura. Vale acrescentar que a falta de padronização de critérios clínicos, diagnósticos e a diversidade de conceitos de infecção, comprometem os sistema de vigilância epidemiológica das infecções, bem como, dificulta a generalização dos resultados de pesquisas realizadas. Os marcadores clínicos apresentam uma pobre correlação nas ICSRC, não sendo em muitos casos suficiente para estabelecer o diagnóstico, sendo assim de grande importância a utilização de técnicas microbiológicas para confirmação deste tipo de infecção. A tipagem molecular pode representar um potencial discriminatório adicional, principalmente em infecções onde o patógeno pode fazer parte da microbiota normal, e também pode proporcionar o entendimento das relações entre esses microrganismos que é fundamental para a elucidação das ICSRC.

O treinamento e educação da equipe de saúde abordando técnicas na passagem, cuidados na manutenção e inserção dos cateteres vasculares, bem como o uso racional de antimicrobianos e atenção aos protocolos de uso de cateteres, é de grande importância na prevenção das ICSRC.

A hipótese de que um peptídeo inibidor de RNAlII (RIP) possa ser utilizado para revestimento de cateteres, a fim de prevenir a formação de biofilme e consequentes infecções relacionadas a esses dispositivos é uma perspectiva futura para auxiliar na prevenção das ICSRC. Novos estudos sobre a prevenção de ICSRC são necessários para esclarecer questões ainda sem resposta e ajudar na tomada de decisões tendo em vista as controvérsias existentes e apoiar a implementação de novas tecnologias e sua aplicação na prática clínica, o que

certamente será refletido na qualidade do atendimento prestada aos pacientes com cateteres venosos centrais.

Referências Bibliográficas

1. Garcia PC, Payá EG, Olivares RC, Cotera EF, Rodriguez JT, Sanz MR. Diagnóstico de las infecciones asociadas a catéteres vasculares centrais. *Rev Chil Infect* 2003; 20:41-50.
2. Warren DK, Yokoe DS, Climo MW, Herwaldt LA, Noskin GA, Zuccotti G, Tokars JJ, Perl T M, Fraser V J. Preventing catheter-associated bloodstream infections: a survey of policies for insertion and care of central venous catheters from hospitals in the prevention epicenter program. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27:8-13.
3. Bouza E, San JR, Munoz P, Pascal J, Voss A, Desco M. A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, etiology and antimicrobial susceptibility. *Clin Microbiol and Infect*. 2004;10:838-42.
4. Diener JR, Coutinho MS, Zoccoli CM. Infecções relacionadas ao cateter venoso central em terapia Intensiva. *Rev Ass Med Brasil*. 1996; 42: 205-14.
5. Kaufman D, Fairchild KD. Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:638-80.
6. Pessoa-Silva CL, Richtmann R, Calil R, Santos RMR, Costa MLM, Frota ACC, Wey SB. Healthcare-associated infections among neonates in Brazil. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2004;25:772-7.
7. Maki DG, Alvarado CJ, Ringer M. Prospective randomized trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. *Lancet*. 1991;338:339-43.
8. Elliot TSJ. Line-associated bacteraemias. *Comm Dis Rep Rev*. 1993;3:91-5.
9. Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE. Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infections. *Clin Infect Dis*. 2001;32:1249-72.
10. Donlan, RM, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:167-93.

11. CDC. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. MMWR. 2002;5:1-29.
12. CDC. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999. Am J Infect Control. 1999;27:520-532.
13. 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.
14. Klevens RM, Edward JR, Richards CL, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. Pub Health Rep. 2007;122:160-6.
15. O'Gray NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA. Prevention guidelines for catheter-related infections. Clin Infect Dis. 2002;35:1281-307.
16. Digiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in intensive care unit. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160:976-81.
17. Safdar N, Maki DG. Risk of catheter-related bloodstream infection with peripherally inserted central venous catheters used in hospitalized patients. Chest. 2005; 128:489-95.
18. Schelonka RL, Infante AJ. Neonatal Immunology. Seminars in Perinatology. 1998; 22: 2-14.
19. Levy O, Martin S, Eichenwald E, Ganz T, Valore E, Carroll SF, Lee K, Goldmann D, Thorne GM. Impaired innate immunity in the newborn: newborn neutrophils are deficient in bactericidal/permeability-increasing protein. Pediatrics. 1999;104:1327-33.
20. Le Champion A, Bourgeois C, Lambolez F, Martin B, Léaument S, Dautigny N, Tanchot C, Pénit C, Lucas B. Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/ self-MHC complexes. PNAS. 2002;99:4538-43.
21. Malick A, Hui CPS, Pennie RA, Kirpalani H. Beyond the complete blood cell count and C reactive protein. A systematic review of modern diagnostic tests for neonatal sepsis. Arch Pediatr Adolesc Med. 2003;157:511-6.
22. Sun CQ, O'Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. Chem-Biol Int. 1998;31:113-7.

23. Wilson CB, Lewis D, English BK. Immunity in the neonate. *Semin in Ped Inf Dis*. 1999;10:83-90.
24. Carr. Neutrophil production and function in newborn infants. *Brit J of Haemat*. 2000;110:18-8.
25. Yoshio H, Lagercrantz H, Gudmundsson GH. Agerberth B. First line of defense in early human life. *Semin in Perin*. 2004;28:304-11
26. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Sem. in Immun*. 2007;19:70-83.
27. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. Tradução de Claudia Reali. Elsevier. 2005;5:283-305.
28. Auriti C, Maccallini A, Di Liso G, Di Ciommo V, Ronchetti MP, Orzalesi M. Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. *J Hosp Infect*. 2003;53:25-30.
29. 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. *The J of Hosp Inf*. 2001;48:20-6.
30. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. *Pediatr Infect Dis J*. 1990;9:819-25.
31. Leroyer A, Bedu A, Lombrail P, Desplanques L, Diakite B, Bingen E, Aujard Y, Brodin M. Prolongation of hospital stay and extra costs due to hospital-acquired infection in a neonatal unit. *J Hosp Infect*. 1997;35:37-45.
32. Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A, Pendray M, Synnes A, Whyte R, Chien L, Sale J. The Canadian NICU Network. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU Network:1996-1997. *Pediatrics*. 2000;106:1070-9.
33. D'Elia C, Correia MS, Oliveira SD, Barbosa NMM. Bronchovascular fistula-complication of percutaneous central venous catheter in a neonate. *J Pediatr*. 2002;78:347-50.
34. Quero J, Omeñaca F, García FE, Escorihuela R, PérezRJ, García SP, Salas S. Parenteral nutrition in management of sick low birth weight infant (under 2,000g). *An Esp Pediatr*. 1977;10:141-52
35. Trotter CW. A national survey of percutaneous central venous catheter practices in neonates. *Neon Netw*. 1998;17:31-38.

36. Sastre JBL, Cotallo GDC. Estudio prospectivo sobre el empleo de cateteres umbilicales en el recién nacido. Grupo de Hospitales Castrillo. An Esp Pediatr. 2000;53:470-8.
37. Macias AE, Munoz JM, Galvan A, Gonzalez JA, Medina H, Alpuche C, Cortes G, Ponce-de-Leon S. Nosocomial bacteremia in neonates related to poor standards of care. The Pediatr Infect Dis J. 2005;24:713-6.
38. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. J Clin Microbiol. 2000;38:1740-6.
39. Cunha MLRS. Catheter-Related Infections: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis and Prevention. Cross Infections: Types, Causes and Prevention. Hauppauge, NY, United States.: Nova Science Publishers, Inc. 2009.
40. Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. Res Microbiol. 2005;156:506-14
41. Van der Zwet WC, Debets-Ossenkopp YJ, Reinders E, Kapi M, Savelkoul PHM, Van Elburg RM, Hiramatsu K, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to Vancomycin in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2002;40:2520-5.
42. Center KJ, Reboli AC, Hubler R, Rodgers GL, Long SS. Decreased Vancomycin susceptibility of Coagulase-negative *Staphylococci* in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. J Clin Microbiol. 2003;41:4660-5.
43. Nancy Tee WS, So SY, Lin R, Loo LH. *Staphylococcus lugdunensis* carrying the mecA gene causes catheter-associated bloodstream infection in premature neonate. J Clin Microbiol. 2003;41:519-20.
44. Chavez F, Garcia-Alvarez M, Sanz F, Alba C, Otero JR. Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiospticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2005;43:4877-9.
45. Cunha MLRS, Lopes CAM. Estudo da produção de β - lactamase e sensibilidade às drogas em linhagens de estafilococos coagulase -negativos isolados de recém-nascidos. J de Ped. 2002;38:281-90.
46. Cunha MLRS, Lopes CAM, Rugolo LMSS, Chalita LVAS. Significancia clinica de estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos. J Pediatr. 2002;78:279-88.
47. Agvald-Öhman C, Lund B, Edlund C. Multiresistant Coagulase-negative *Staphylococcus* disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit. Crit Care. 2004;8:42-7.

48. Garland JS, Alex CP, Henrickson KJ, McAuliffe TL, Maki DG .A vancomycin-heparin lock solution for prevention of nosocomial bloodstream infection in critically ill neonates with peripherally inserted central venous catheters: a prospective, randomized trial. *Pediatrics*. 2005;116:198-205.
49. Kashu M, Osiovič H, Hendry D, Khotani AA, Solimano A, Speert DP. Persistent bacteremia and severe thrombocytopenia caused by Coagulase-negative *Staphylococcus* in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*. 2006;117:340-8.
50. Eggimann P, Pittet D. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:295-309.
51. Hall K, Farr B. Diagnosis and management of long-term central venous catheter infections. *J Vasc Interv Radiol*. 2004;15:327-34.
52. Liñares J, Dominguez MA, Martin R. Diagnosis of catheter-related infection. *Rev Clin Esp*. 1997;197:19-26.
53. Michel L, Marsh H, McMichan J, Southorn P, Brewer N. Infection of pulmonary artery catheters in critically ill patients. *JAMA*. 1981;245:1032–6.
54. 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.
55. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW: A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977, 296:1305-1309.
- 56.** Maki DG, Stolz SM, Wheeler S, Mermel LA, Prevention of Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection by Use of an Antiseptic-Impregnated Catheter. *Ann Int Med*. 1997;127:257-66.
57. Marconi C, Cunha MLRS, Lyra JC, Bentlin MR, Batalha JEN, Sugizaki MF, Corrente JE, Rugolo LMSS. Usefulness of catheter tip culture in the diagnosis of neonatal infections. *J Pediatr*. 2009;85:80-3.
58. Cleri DJ, Corrado ML, Seligman SJ. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J Infect Dis*. 1980;141:781–6.
59. Safdar N, Fine JP, Maki DG. Meta-Analysis: Methods for diagnosing intravascular device-related bloodstream infection. *Ann Intern Med*. 2005;142:451-66.
60. Liñares J, Sitges-Serra A, Garau J, Perez JL, Martin R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semiquantitative cultures of catheter hub and segments. *J Clin Microbiol*. 1985;21:357-60.

61. Markus S, Buday S. Culturing indwelling central venous catheters in situ. *Infect Surg.* 1989;157–62.
62. Tighe MJ, Kite P, Fawley WN, Thomas D, McMahon MJ. An endoluminal brush to detect the infected central venous catheter in situ: a pilot study. *BMJ.* 1996;313:1528-9
63. Rusforth JA, Hoy CM, Kite P, Puntis JW. Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. *Lancet.* 1993;342:402–3.
64. Flynn PM, Shenep JL, Barrett FF. Differential quantitation with a commercial blood culture tube for diagnosis of catheter-related infection. *J Clin Microbiol.* 1988;26:1045-6.
65. Douard MC, Arlet G, Longuet P, Troje C, Rouveau M, Ponscarne D, Eurin B. Diagnosis of venous access port-related infections. *Clin Infect Dis.* 1999;29:1197-202.
66. Bouza E, Burillo A, Muñoz P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol and Infect.* 2002;8:265-74.
67. Blot F, Nitenberg G, Chachaty E, Raynard B, Germann N, Antoun S, Laplanche A, Brun-Buisson C, Tancrède C. Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet.* 1999;354:1071-7.
68. Dobbins BM, Catton JA, Kite P, McMahon MJ, Wilcox MH. Each lumen is a potential source of central venous catheter-related bloodstream infection. *Crit Care Med.* 2003;31:1688-90
69. Martín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, Canas E, Pachón J. Comparison of a Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-Based PCR Method and Clinical and Microbiological Methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4571-5.
70. Nouwen JL, van Belkum A, Marie S, Sluijs J, Wielenga JJ, Kluytmans JAJW, Verbrugh HA. Clonal expansion of *Staphylococcus epidermidis* strains causing Hickman catheter-related infections in a hemato-oncologic department. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2696-702.
71. Santos LR. Standardization of RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) for fingerprinting of *Salmonella enteritidis*. *Rev Fac Zoo Vet Agro.* 2004;10:72-86.
72. Foxman B, Zhang L, Koopman JS, Manning SD, Marrs CF. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspec & Innov.* 2005;2:1-8.
73. Ferreira ME, Grattapaglia DG. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3º ed. Brasília-DF: Embrapa-Cenargen, 1998.

74. Schwartz C, Henrickson KJ, Roghmann K, Powell K. Prevention of bacteremia attributed to luminal colonization of tunneled central venous catheters with vancomycin-susceptible organisms. *J Clin Oncol*. 1990;8:591-7.
75. Matsuda J, Hirakata Y, Iori F, Mochida C, Ozaki Y, Nakano M, Izumikawa K, Yamaguchi T, Yoshida R, Miyazaki Y, Maesaki S, Tomono K, Yamada Y, Khono S, Kamihira S. Genetic relationship between blood and nonblood isolates from bacteremia patients determined by pulsed-Field gel Electrophoresis. *J Clin Microbial*. 1998;38:3081-4.
76. Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Solh NE, Cuny C, Wite W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindell A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggmen S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B. Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbial*. 2003;41:1574-85.
77. 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 Microbial*. 1995;33:2233-9.
78. Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Randomly Amplified DNA Polymorphism analysis for typing extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbial*. 1996;34:2448-53.
79. Renders N, Römmling U, Verbrugh H, Belkum A. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-field Gel Electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol*. 1996;34: 3190-5.
80. Van Belkum AJ, Kluytmans JAJK, van Leewen, Goessens W, Averst E, Wielenga JJ, Verbrug HA. Monitoring persistence of Coagulase-negative staphylococci in a hematology department using phenotypic and genotypic strategies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1996;17:660-7.
81. Sloos JH, Dijkshoorn L, Vogel L, van Boven CPA. Performance of phenotypic and genotypic methods to determine the clinical relevance of serial blood isolates to determine the clinical relevance of serial blood isolates of *Staphylococcus epidermidis* in patients with septicemia. *J Clin Microbial*. 2000;38:2488-93..
82. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick, A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. Microbial DNA typing automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbial*. 2005;43:199-207.

83. Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. Clinical evaluation of the DiversiLab Microbial Typing System using Repetitive-Sequence-Based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 2005; 43:1187-92.
84. Cartelle M, Tomas M, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, Molina F, Villanueva R, Bou G. Risk factors for colonization and infection in a Hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. J Clin Microbiol. 2004;42: 4242-9.
85. Corich V, Mattiazzi A, Soldati E, Carraro A, Giacomini A. Sau-PCR, a Novel Amplification Technique for Genetic Fingerprinting of Microorganisms Appl and Environm Microbiol. 2005;71:6401-6.
86. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acid Res. 1991;19:6823-31.
87. Rivera IG, Chowdhury MAR, HUQ A, Jacobs D, Martius MT, Colwell RR. Enterobacterial repetitive Intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. Appl Environ Microbiol. 1995;61:2898-904.
88. Silveira WD, Ferreira A, Lancellotti M, Barbosa IA, Leite DS, Castro AF, Brocchi M. Clonal relationships among avian *Escherichia coli* isolates determined by Enterobacterial Repetitive Intergenic consensus (ERIC)-PCR. Vet Microbiol. 2002;89:323-8.
89. Bedendo J, Pignatari ACC. Typing of *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction and pulsed field gel electrophoresis. Braz J Med Biol Res. 2000;33:1269-74.
90. Szczka E, Kaznowski A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence PCR. J Clin Microbiol. 2004;42:220-8.
91. Lobo RD, Levin AS, Gomes LM, Cursino R, Park M, Figueiredo VB Taniguchi L, Polido CG, Costa SF. Impact of an educational program and policy changes on decreasing catheter-associated bloodstream infections in a medical intensive care unit in Brazil. Am J Infect Control. 2005;33:83-7.
92. Sherertz RJ, Ely EW, Westbrook DM, Gledhill KS, Stephen A, Streed SA, Kiger B, Flynn L, Hayes S, Strong S, Cruz J, Bowton DL, Hulgán T, Haponik EF. Education of physicians-in-training can decrease the risk for vascular catheter infection. Ann Intern Med. 2000;132:641-8.

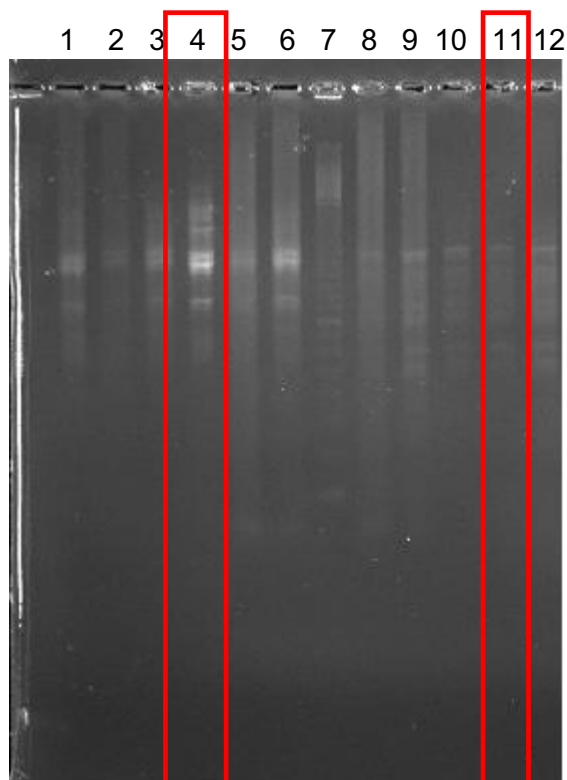
93. Yilmaz G, Caylan R, Aydin K, Topbas M, Koksai I. Effect of education on the rate of and the understanding of risk factors for intravascular catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28:689-94.
94. Larson EL. APIC guideline for handwashing and hand antisepsis in health care settings. *Am J Infect Control*. 1995;23:251–69.
95. Pittet D, Hugonnet S, Harbath S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, Perneger T. Effectiveness of a hospitalwide programme to improve compliance with hand hygiene. *Lancet*. 2000;356:1307–12.
96. Garland JS, Buck RK, Maloney P, Maloney P, Durkin DM, Toth-Lloyd S, Duffy M, Szocik P, Mcauliffe TL, Goldmann D. Comparison of 10% povidone-iodine and 0.5% chlorhexidine gluconate for the prevention of peripheral intravenous catheter colonization in neonates: a prospective trial. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14:510–6
97. Chaiyakunapruk N, Veenstra DL, Lipsky BA, Saint S. Chlorhexidine compared with povidone-iodine solution for vascular catheter-site care: a meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2002;136:792-801.
98. Young E, Commiskey M, Wilson S. Translating evidence into practice to prevent central venous catheter-associated bloodstream infections: A systems-based intervention. *Am J Infect Control*. 2006;34:503-6.
99. Arrington ME, Gabbert KC, Mazgaj PW, Wolf MT. Multidose vial contamination in anesthesia. *Aana J*. 1990;58:462–6.
100. Plott RT, Wagner RF Jr., Tying SK. Iatrogenic contamination of multidose vials in simulated use. A reassessment of current patient injection technique. *Arch Dermatol*. 1990;126:1441-4.
101. Salzman MB, Isenberg HD, Rubin LG. Use of disinfectants to reduce microbial contamination of hubs of vascular catheters. *J Clin Microbiol*. 1993;31:475–9.
102. Maki DG, Ringer M. Evaluation of dressing regimens for prevention of infection with peripheral intravenous catheters: gauze, a transparent polyurethane dressing, and an iodophor-transparent dressing. *JAMA*. 1987;258:2396–403.
103. Bijma R, Girbes AR, Kleijer DJ, Zwaveling JH. Preventing central venous catheter-related infection in a surgical intensive-care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999; 20 :618-20.
104. Christensen GD; Bisno AL, Simpsom WA, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 1982;37:318-26.

105. Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol.* 1989;42:872-4.
106. Garvis S, Mei JM, Ruiz-Albert J, Holden DW. *Staphylococcus aureus* *svrA*: a gene required for virulence and expression of the *agr* locus. *Microbi.* 2002;148:3235-43.
107. Balaban, N, Gov Y, Bitler A, Boelaert JR. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm on dialysis catheters and adherence to human cells. *Kidney Int.* 2003;63:340-5.
108. Balaban, N, Giacometti A, Cirioni O, Gov Y, Ghiselli R, Mocchegiani F, Viticchi C, Del Prete MS, Saba V, Scalise G, Dell'Acqua. G. Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* 2003;187:625-630.

Apêndice

Otimização da reação de RAPD-PCR

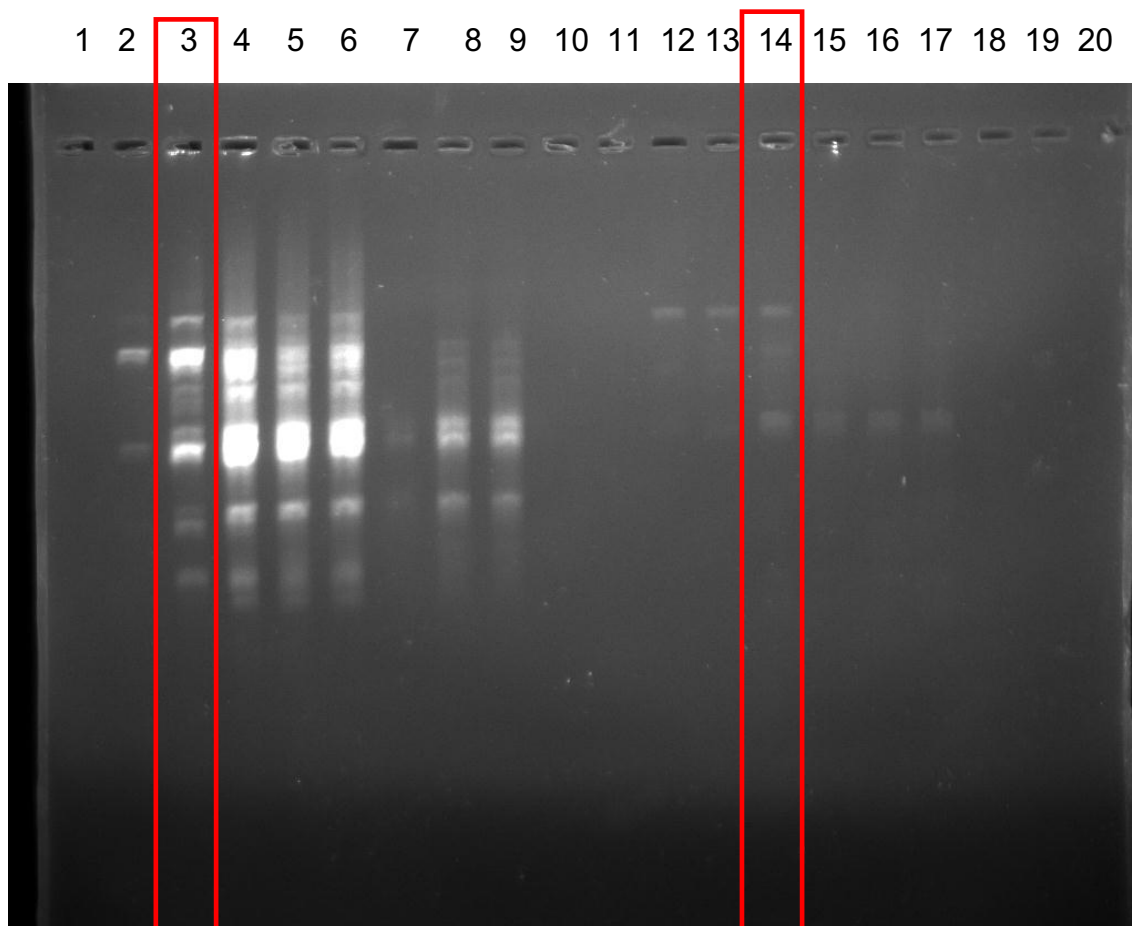
Otimização de Taq DNA polimerase com o primer M13 para *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*.



Eletroforese em gel de agarose: linhas 1 a 6 (*S. epidermidis*) e linhas 7 a 12 (*S. aureus*) com diferentes concentrações de Taq DNA polimerase: linhas 1 e 7 (2,5U), 2 e 8 (3,0U), 3 e 9 (3,5 U), 4 e 10 (4,0U), 5 e 11(4,5 U) 6 e 12 (5,0 U).

Para *S. epidermidis* observou-se uma melhor reação em uma concentração de 4U (0,8µl) de Taq DNA polimerase e para *S. aureus* uma concentração de 4,5U (0,9 µl) .

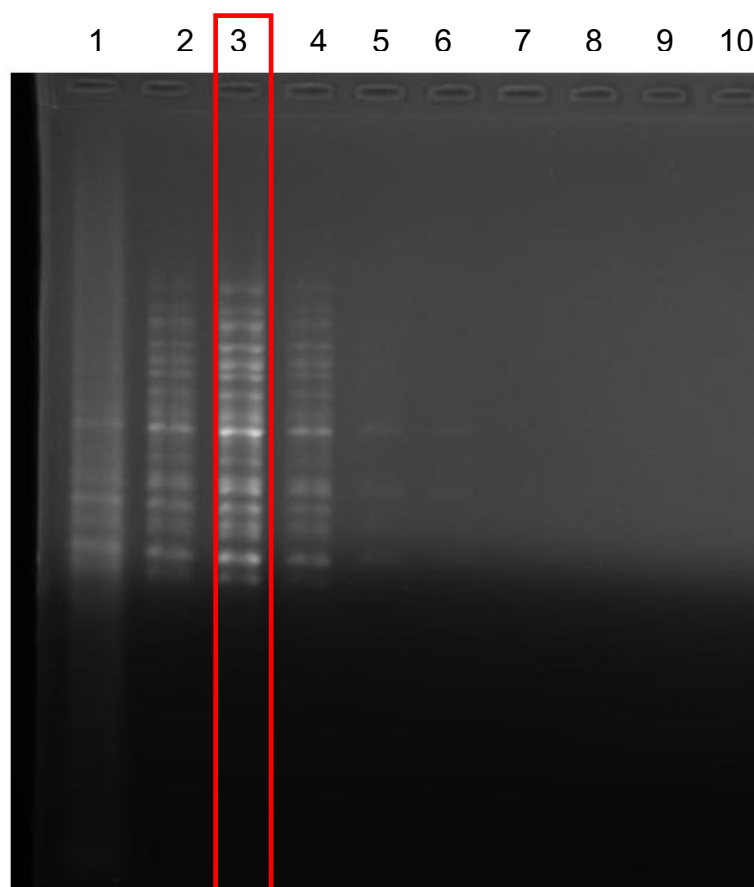
Reação de otimização, Cloreto de Magnésio, para o primer M13



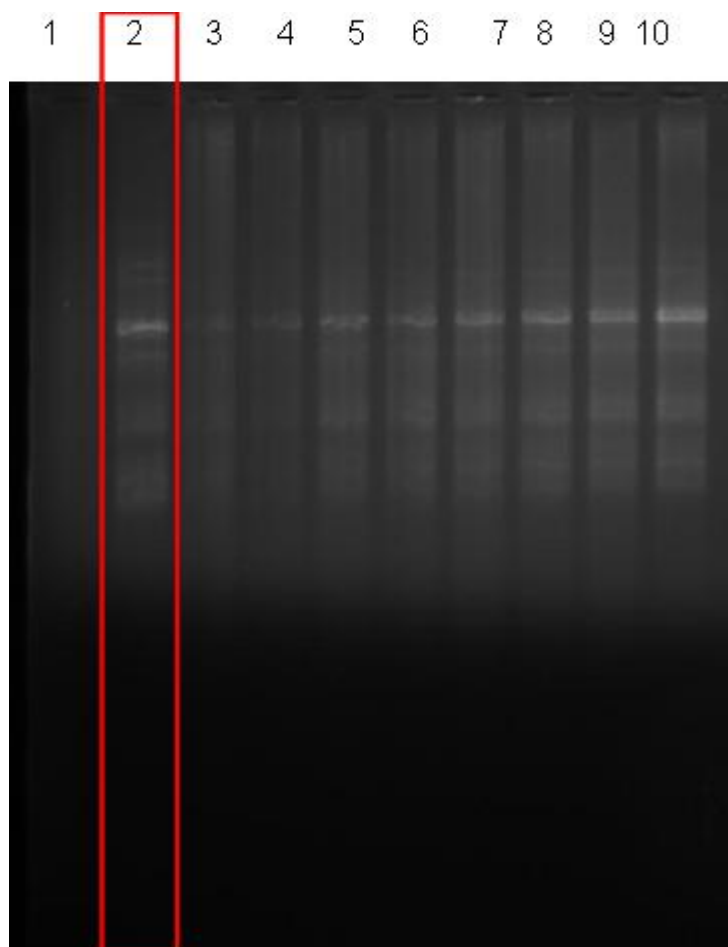
Eletoforese em gel de agarose: linhas 1 a 10 (*S. epidermidis*) e 11 a 20 (*S. aureus*) , com diferentes concentrações de cloreto de magnésio: linhas 1 e 11 (1,0 mM), 2 e 12 (1,5 mM), 3 e 13 (2,0 mM), 4 e 14 (2,5 mM), 5 e 15 (3,0mM), 6 e 16 (3,5mM), 7 e 17 (4,0 mM), 8 e 18 (4,5 mM), 9 e 19 (5,0 mM) e 10 e 20 (5,5 mM) .

As concentrações ideais de Cloreto de Magnésio encontradas foram para *S. epidermidis* 2,0mM (2,4µl) e para *S. aureus* 2,5 mM (3,0µl).

Otimização para concentração ideal de DNA de *S. epidermidis* e *S. aureus* para reação com o primer M13.



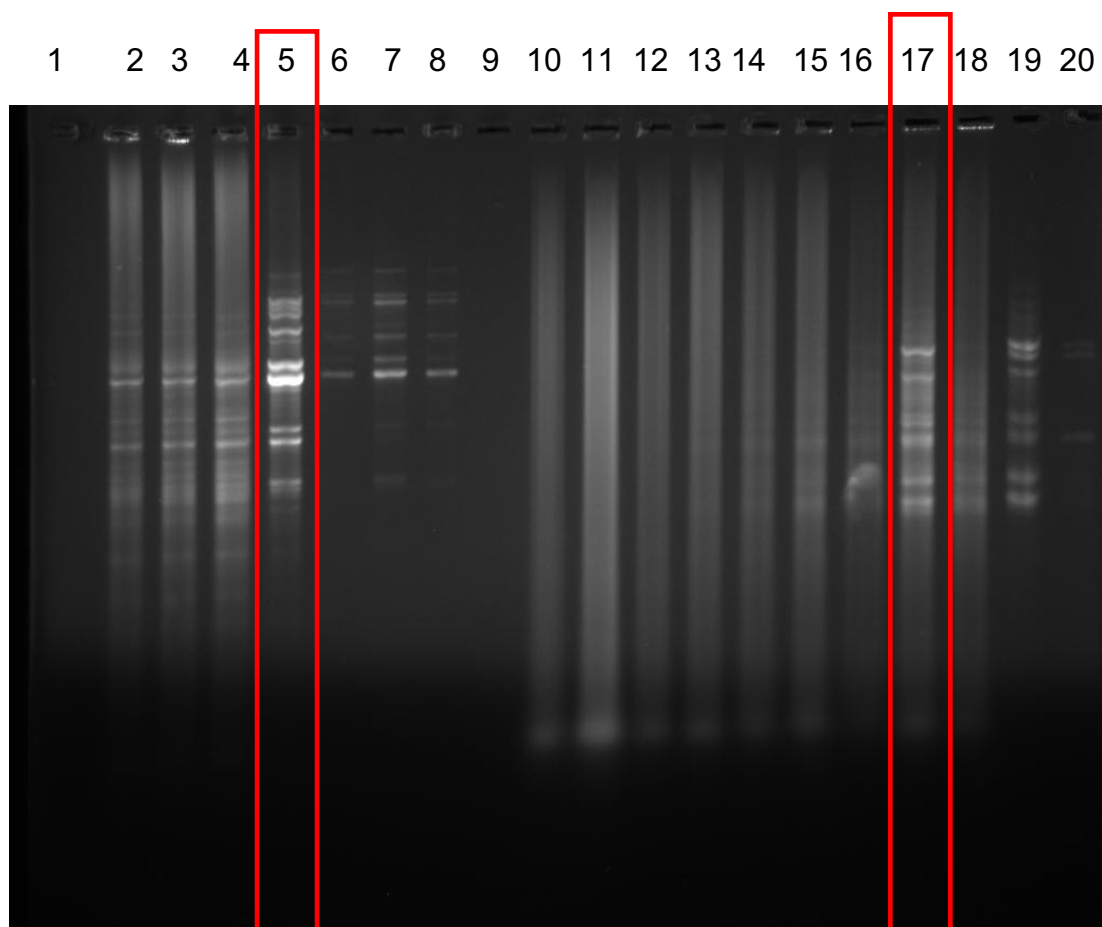
Eletroforese em gel de agarose (*S. epidermidis*), com diferentes concentrações de DNA: linha 1 (5 ng/μl), 2 (10 ng/μl), 3 (15 ng/μl), 4 (20 ng/μl), 5 (25 ng/ μl), 6 (30 ng/μl), 7 (35 ng/ μl), 8 (40 ng/μl), 9 (45 ng/μl), 10 (50 ng/ μl).



Eletoforese em gel de agarose (*S. aureus*) com diferentes concentrações de DNA:
linha 1 (5 ng/ μ l), 2 (10 ng/ μ l), 3 (15 ng/ μ l) 4 (20 ng/ μ l), 5 (25 ng/ μ l), 6 (30 ng/ μ l), 7 (35 ng/ μ l), 8 (40 ng/ μ l), 9 (45 ng/ μ l),10 (50 ng/ μ l).

A melhor concentração de DNA para *S. epidermidis* foi de 15 ng/ μ l e para *S. aureus* foi de 10 ng/ μ l .

Otimização para concentração do primer M13 para *S. epidermidis* e *S. aureus*



Eletoforese em gel de agarose: linhas 1 a 10 (*S. epidermidis*) e linhas 11 a 20 (*S. aureus*) com diferentes concentrações de primer M1: linhas 1 e 11 (10 ng/μl), 2 e 12 (20 ng/μl), 3 e 13 (30 ng/μl), 4 e 14 (40 ng/μl), 5 e 15 (50 ng/μl), 6 e 16 (60 ng/μl) 7 e 17 (70 ng/μl), 8 e 18 (80 ng/μl), 9 e 19 (90 ng/μl), 10 e 20 (100ng/μl) .

As melhores concentrações encontradas de primer M13 foram para *S. epidermidis* 50 ng/μl (5μl), e para *S. aureus* 70ng/μl (7μl).