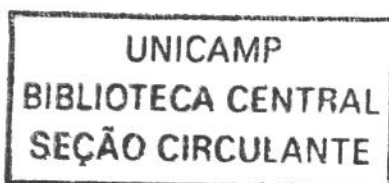


ROGÉRIO HAKIO KUBOYAMA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E FATORES ASSOCIADOS À
LETALIDADE DAS INFECÇÕES EM CORRENTE SANGÜÍNEA POR
Enterobacter cloacae EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NA UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL – CAISM/UNICAMP**

CAMPINAS

2002



ROGÉRIO HAKIO KUBOYAMA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E FATORES ASSOCIADOS À
LETALIDADE DAS INFECÇÕES EM CORRENTE SANGÜÍNEA POR
Enterobacter cloacae EM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NA UNIDADE
DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL – CAISM/UNICAMP**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas

Orientadora: *Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini*

CAMPINAS

2002

200305960

UNIDADE	80.
Nº CHAMADA	UNICAMP K951e
V	EX
TOMBO BC/	52325
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00179194-8

BIB ID 279834

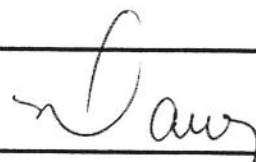
K951e Kuboyama, Rogério Hakio
Epidemiologia molecular e fatores associados à letalidade das
infecções em corrente sanguínea por *Enterobacter cloacae* em recém-
nascidos internados na unidade de terapia intensiva neonatal –
CAISM/UNICAMP / Rogério Hakio Kuboyama. Campinas, SP :
[s.n.], 2002.

Orientador : Maria Luiza Moretti Branchini
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infecção hospitalar. 2. Recém-nascidos. 3. Epidemiologia
molecular. 4. Eletroforese em gel. I. Rogério Hakio Kuboyama. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Profa.Dra. Maria Luiza Moretti Branchini*

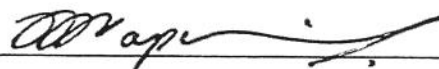


Membros:

Profa.Dra. Anna Sara Levin



Profa .Dra. Priscila Maria de Oliveira Papaiordanou



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31.07.2002

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Ichiro (in memoriam)
e Satsue e aos meus irmãos e irmãs*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

À Profa. Dra. Maria Luiza Moretti Branchini, pelo respeito, pela confiança e pela valiosa orientação.

À Profa. Dra. Helenice Bosco de Oliveira, pelos esclarecimentos e pelas palavras de amizade.

À Érivan Olinda Ribeiro, pela sensibilidade e por todo o apoio.

Ao Guaracy da Silva Ribeiro, pelo entusiasmo e pelo auxílio nos momentos necessários.

À Márcia Maria Pedroso, pela atenção recebida.

Aos colegas de Pós-graduação do Laboratório de Epidemiologia Molecular de Bactérias e Fungos, pela convivência diária e pela amizade.

À equipe do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, pela disposição e profissionalismo.

À equipe do Sistema de Arquivos Médicos do CAISM, pela solicitude e pelo empenho.

À equipe da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do CAISM, pelo profissionalismo e pela dedicação.

À equipe do setor de Neonatologia, sempre prestativa e atenciosa.

À equipe do Hospital Municipal Dr. Mario Gatti, colegas do trabalho diário.

Aos meus pais, irmãos e irmãs, pela preocupação, respeito e carinho.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se realizasse.

“...Saltar sobre o vazio, pular de pico em pico, não ter medo da queda. Foi assim que se construiu a Ciência: não pela prudência da marcha, mas pela ousadia dos sonhos...”

Rubem Alves

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1. INTRODUÇÃO	37
1.1. Aspectos epidemiológicos da colonização e infecção por <i>Enterobacter cloacae</i>	42
1.2. Métodos moleculares, para tipagem de microrganismos, com finalidades epidemiológicas.....	45
1.3. Métodos moleculares aplicados para o estudo de patógenos hospitalares....	46
A. Métodos com base no estudo do DNA genômico.....	46
B. Métodos fenotípicos com base no estudo das proteínas.....	46
1.4. Métodos genotípicos.....	48
Técnica para análise plasmidial.....	48
Técnica eletroforética para análise do DNA cromossômico.....	49
Análise do DNA cromossômico com enzima de clivagem freqüente e eletroforese convencional.....	49
Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição e PFGE.....	50
1.5. Justificativa do desenvolvimento do estudo proposto.....	51
2. OBJETIVOS	53

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	57
3.1. População de estudo.....	59
3.2. Descrição da Unidade de Neonatologia do CAISM.....	59
3.3. Metodologia aplicada.....	59
3.3.1. Análise microbiológica.....	59
3.3.2. Desenho do estudo.....	60
3.3.3. Critérios de exclusão.....	60
3.3.4. Variáveis e conceitos.....	61
3.3.5. Coleta de dados.....	64
3.3.6. Processamento e análise dos dados.....	64
3.3.7. Análise do DNA plasmidial.....	65
3.3.8. Análise do DNA cromossômico por PFGE.....	66
4. RESULTADOS.....	71
4.1. Análise do DNA plasmidial e do DNA cromossômico.....	73
4.2. Estudo dos fatores de risco associados à morte em recém-nascidos com infecção sistêmica por <i>E. cloacae</i>	89
5. DISCUSSÃO.....	99
6. CONCLUSÕES.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
9. ANEXOS.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIG	Adequado para a Idade Gestacional
ATAB	Brometo de alquil trimetil amônio
BHI	Infuso Cérebro Coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CDC	Centro de Controle de Doenças (<i>Centers for Disease Control</i>)
CHEF-DRII	<i>Contour clamped homogeneous electric field</i>
CPA	Controle de Prontuários Armazenados
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
e cols.	E colaboradores
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
et al.	Entre outros
g	Grama
GIG	Grande para a Idade Gestacional
kb	Quilobase
LEM	Laboratório de Epidemiologia Molecular de bactérias e fungos
N	Número de casos

NPT	Nutrição parenteral total
OR	Razão de probabilidade (<i>odds ratio</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Eletroforese em campo pulsátil (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
qsp	Quantidade suficiente para
REA	Análise com endonuclease de restrição (<i>Restriction Endonuclease Analysis</i>)
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphisms</i>
RNPT	Recém-Nascido Pré-Termo
RNT	Recém-Nascido a Termo
rpm	Rotações por minuto
SAME	Sistema de Arquivos Médicos
TRIS	Hidróxi metil amino metano
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTI-Neonatal	Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
&	E

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Número de recém-nascidos com infecção em corrente sanguínea por <i>E. cloacae</i> e viabilidade das cepas estocadas no LEM.....	74
TABELA 2 : Perfis do DNA genômico caracterizados pela análise plasmidial (por eletroforese convencional) e pela análise do DNA cromossômico (pela PFGE) dos isolados de <i>E. cloacae</i> obtidos de recém-nascidos.....	88
TABELA 3 : Número de pacientes da Neonatologia com infecção hospitalar.....	92
TABELA 4: Características dos neonatos, com infecção sistêmica por <i>E. cloacae</i> , internados no CAISM/UNICAMP, segundo sexo, idade gestacional e tamanho.....	94
TABELA 5 : Características dos recém-nascidos, segundo a exposição a procedimentos invasivos.....	95
TABELA 6 : Variáveis associadas à morte em 42 neonatos com infecção sistêmica por <i>E. cloacae</i> , pela análise univariada.....	95
TABELA 7 : Teste de sensibilidade a diversos antibióticos, por difusão de discos, das cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.....	96
TABELA 8: Número de pacientes da Neonatologia internados no CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.....	97
TABELA 9 : Número de óbitos ocorridos na Neonatologia do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.....	98

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Eletroforese em gel de agarose demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, no ano de 1995.....	77
FIGURA 2 : Perfis de DNA cromossômico de cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, no ano de 1995.....	78
FIGURA 3 : Eletroforese em gel de agarose demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, nos anos de 1996 e 1997.....	79
FIGURA 4 : Perfis de DNA cromossômico de cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, nos anos de 1996 e 1997.....	80
FIGURA 5 : Eletroforese em gel de agarose demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de hemoculturas de pacientes de várias especialidade médicas internados no Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1998.....	82
FIGURA 6 : Perfis de DNA cromossômico de cepas de <i>E. cloacae</i> isoladas de pacientes de várias especialidades médicas internados no Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1998.....	84

- FIGURA 7 :** Diferentes padrões de banda obtidos pela PFGE (I) e eletroforese convencional (II) para *E. cloacae* isolados de hemocultura dos recém-nascidos internados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997..... 86
- FIGURA 8 :** Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de *E. cloacae* obtidas de hemoculturas de recém-nascidos hospitalizados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997..... 87

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág</i>
GRÁFICO 1 : Número de pacientes da Neonatologia do CAISM/UNICAMP que apresentaram infecção sistêmica por <i>E. cloacae</i> , nos anos de 1995, 1996 e 1997.....	73
GRÁFICO 2 : Coeficiente de pacientes com infecção hospitalar no setor de Neonatologia do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.....	93



RESUMO

O gênero *Enterobacter* representa de 4% a 12% das sepses causadas pelos microrganismos gram-negativos e a alta mortalidade associada à sepse neonatal tem recebido atenção especial. *Enterobacter cloacae*, um microrganismo comensal do trato gastrointestinal, tem emergido, em anos recentes, como um importante patógeno nosocomial, causando infecção sistêmica em recém-nascidos. Os recém-nascidos, especialmente os prematuros e de baixo peso, constituem uma população de alto risco para o desenvolvimento de infecção sistêmica, logo após o nascimento ou durante o período de hospitalização, freqüentemente prolongado, uma vez que possuem o sistema imunológico imaturo, não se encontrando completamente preparados para a vida fora do útero materno ou apresentam defeitos congênitos associados à prematuridade.

Em anos recentes, a epidemiologia molecular dos surtos nosocomiais causados pelo *E. cloacae* tem sido bem relatada em países desenvolvidos, o que não ocorre em países em desenvolvimento, onde as infecções nosocomiais constituem um problema crescente e onde os recursos limitados dificultam a plena utilização das técnicas moleculares. Ademais, o poder discriminatório dos métodos fenotípicos não é adequado para a análise epidemiológica dos surtos causados pelo *Enterobacter*, dificultando ainda mais a realização de estudos epidemiológicos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a identidade genômica das cepas de *E. cloacae*, obtidas de hemoculturas de recém-nascidos internados no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM/UNICAMP), utilizando a análise do DNA plasmidial, pela eletroforese convencional em gel de agarose e a análise do DNA cromossômico, pela eletroforese em campo pulsátil (PFGE) e também avaliar as variáveis associadas à morte dos recém-nascidos que apresentaram infecção sistêmica pelo *E. cloacae*.

A letalidade entre os pacientes com infecção sistêmica por *E. cloacae* foi de 24,53% e a mortalidade proporcional por infecção sistêmica nosocomial por *E. cloacae* foi de 6,53%.

Dentre as variáveis estudadas, a flebotomia foi o único procedimento invasivo relacionado à morte ($P=0,016$), demonstrado pela análise univariada.



ABSTRACT

The genus *Enterobacter* is found to account for 4% to 12% of sepsis caused by gram-negative microorganisms and the high mortality rate associated with neonatal sepsis has received especial attention.

Enterobacter cloacae, a commensal microorganism of human intestinal tract has emerged, in recent years, as an important nosocomial pathogen causing systemic infection in newborns. Newborns, especially prematures and low birth weight infants constitute a great risk population for developing bloodstream infection, shortly after birth or during hospitalization period, frequently prolonged, once they have immature immunologic system, not fully prepared for life outside the maternal uterus or they present congenital defects associated with untimely birth.

In recent years, the molecular epidemiology of nosocomial outbreaks of *E. cloacae* has been well documented in developed countries; this is not the case in developing countries where nosocomial infections are a growing problem and where the limited resources difficult the extensive use of molecular techniques. Furthermore, the discriminatory power of phenotypic methods is not adequate for the epidemiological analysis of *Enterobacter* outbreaks, thus increasing the difficulties of performing epidemiological studies.

The purpose of the present work was to study the genomic identity of *E. cloacae* strains, obtained from blood culture of newborns hospitalized in the Women's Hospital (CAISM/UNICAMP), using the plasmidial DNA analysis, by conventional agarose gel electrophoresis and the chromosomal DNA analysis, by pulsed field gel electrophoresis and to evaluate the variables associated with death occurred among neonates who presented *E. cloacae* systemic infection.

The lethality among patients with *E. cloacae* systemic infection was 24,53% and the proportional mortality rate for systemic nosocomial infection was 6,53%.

Among studied variables, phlebotomy was the only invasive procedure related to death ($P=.016$) demonstrated by univariate analysis.

The molecular study showed three outbreaks each one occurring in different years and was caused by strains with distinctive genomic DNA profiles. Only one outbreak was identified by the infection control service. Plasmid analysis and PFGE presented a very similar discriminatory power for the strains isolated from the newborns and for the control strains.



1. INTRODUÇÃO

Hipócrates, no século quinto a.C., foi o primeiro médico a associar a ocorrência de doenças com os fatores ambientais. Entretanto, foi somente no século dezesseis que o italiano Francastorius (1478-1553) publicou a primeira teoria geral do contágio das doenças. Este autor formulou a hipótese de que minúsculos agentes infectantes chamados por ele de “seminaria” causavam doença e sugeriu três diferentes modos de transmissão: o primeiro deles pelo simples contato direto pessoa a pessoa; o segundo pelo contato com objetos intermediários, como roupas e objetos de uso pessoal e o terceiro, pelos germes existentes e disseminados pelo ar (HENRY, 1995).

Ignaz Semmelweis (1818-1865), um médico húngaro, é considerado o idealizador do controle da infecção hospitalar. Nos estudos clássicos sobre a febre puerperal, durante a primeira metade do século XIX, ele avaliou, prospectivamente, o problema e os fatores de risco associados (vigilância), formulou hipóteses e instituiu as medidas de controle. Semmelweis observou que a mortalidade materna era pelo menos quatro vezes maior nas enfermarias para o ensino dos estudantes de medicina do que em enfermaria para o ensino de enfermeiras, verdadeiras parteiras que jamais participavam das autópsias. Ele levantou a hipótese de que a causa da febre puerperal era transferida para as pacientes da maternidade pelas mãos dos estudantes de medicina após eles terem contato com cadáveres nas salas de autópsia. Baseando-se nessas observações ele instituiu medidas de controle, como a lavagem das mãos com solução de clorina e a limpeza das enfermarias com cloreto de cálcio, tendo reduzido consideravelmente o índice de infecção nas enfermarias dos estudantes de medicina. Como Semmelweis não conseguiu publicar os seus achados com rapidez e também porque ele não foi capaz de manter uma interação efetiva com seus colegas, o seu trabalho permaneceu despercebido por muitos anos (HENRY, 1995).

No século dezenove, os esforços para a prevenção e o controle da infecção hospitalar voltaram-se para as feridas cirúrgicas. Joseph Lister (1827-1912), um médico britânico e um dos maiores nomes na história da cirurgia, começou a usar ácido carbólico (fenol) para a limpeza local das feridas. Encorajado pela redução na frequência das infecções, ele tentou usar a vaporização com ácido carbólico na sala de cirurgia, para diminuir o número de bactérias do ar (HENRY, 1995).

Em meados do século dezenove, Florence Nightingale, a fundadora da enfermagem moderna, coletou e analisou os dados de morbidade e mortalidade nos hospitais da Inglaterra. A partir de seus dados, ela supôs que havia uma relação direta entre as condições sanitárias de um hospital e as complicações pós-operatórias infecciosas. Suas recomendações para a higiene de um hospital geral foram as primeiras tentativas para um programa de controle da infecção hospitalar (HENRY, 1995).

A era moderna do controle da infecção hospitalar começou na década de 50, quando ocorreram grandes epidemias da doença estafilocócica nos hospitais da Europa e dos Estados Unidos. As investigações iniciais sobre a epidemia foram conduzidas pelo Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC). A persistência das epidemias estafilocócicas nos hospitais durante a década de 60 direcionou uma abordagem mais organizada para o controle da infecção hospitalar (HENRY, 1995).

As infecções hospitalares são definidas como infecções adquiridas no decorrer ou em consequência da hospitalização, que não estavam presentes no momento da internação (HARRISON, 1998).

As taxas de infecção hospitalar variam de acordo com as áreas de internação e a gravidade dos pacientes internados. Em unidades de terapia intensiva as infecções bacterianas hospitalares apresentam uma prevalência de 10% a 16%. As unidades de terapia intensiva são compostas por um grupo heterogêneo de especialidades médicas voltadas para o cuidado de pacientes graves, com internações por vezes prolongadas, aumentando o risco para a aquisição de infecções hospitalares (JOHN & RIBNER, 1991).

Os surtos de infecção hospitalar ocorrem entre os pacientes de vários serviços hospitalares. Apesar dos fungos, vírus e outros agentes microbiológicos causarem infecções nosocomiais, os agentes bacterianos permanecem sendo a causa mais comumente reconhecida de surtos (TENOVER, 1997).

Em hospitais, uma variedade de procedimentos médicos, como por exemplo, a instalação de cateteres, freqüentemente serve como fonte de infecção, facilitando o estabelecimento de um quadro infeccioso. Além disso, a eficácia diminuída de alguns agentes antimicrobianos, em virtude da emergência de bactérias resistentes, torna complexos os esforços de controle de infecção.

Durante a década passada, os progressos da terapia intensiva marcadamente contribuíram para tornar possível a sobrevivência de neonatos criticamente doentes que seguramente não sobreviveriam em épocas mais remotas. Entretanto, o cuidado intensivo não permaneceu isento de riscos e a infecção nosocomial tem sido reconhecida como um dos maiores problemas nas unidades de terapia intensiva neonatais. Muitas destas unidades têm vivido tristes experiências envolvendo surtos causados por bacilos gram-negativos (GOLDMANN et al., 1981).

As infecções nosocomiais constituem uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em hospitais pediátricos americanos nos últimos 30 anos (GAYNES et al., 1996). A frequência das infecções hospitalares é inversamente correlacionada à idade: 11,5% em crianças de idade inferior a 23 meses, 3,6% em crianças de idade entre 2 e 4 anos e 2,6% em crianças com idade superior a 5 anos.

Os surtos geralmente envolvem grupos de pacientes considerados de risco, como os neonatos, os pacientes neutropênicos, as crianças com fibrose cística e os pacientes sob nutrição parenteral total (BINGEN, 1994).

A vigilância das infecções nosocomiais envolve a identificação do paciente colonizado ou infectado, a avaliação do risco de infecção entre pacientes, a comprovação da transmissão de uma determinada variedade bacteriana de um paciente para outro e, de uma forma mais ampla, a detecção de surtos hospitalares. Para tanto, faz-se necessária a identificação cuidadosa da bactéria, isolada dos pacientes e/ou do ambiente, determinando assim, se a mesma bactéria está ou não envolvida no surto, e sua relação com os fatores de risco ambientais ou de procedimento (BINGEN, 1994).

Estas infecções são geralmente causadas por patógenos bacterianos comuns que invadem o hospedeiro debilitado, internado dentro de um ambiente físico complexo. A alta prevalência de infecções hospitalares leva à necessidade do uso múltiplo de antimicrobianos e à hospitalização prolongada (JOHN & RIBNER, 1991).

Dados da literatura mostram que as infecções nosocomiais, que ocorrem em aproximadamente cinco por cento dos pacientes com tempo prolongado de internação, resultam em custos elevados. Outros custos diretos relacionados ao tratamento das

infecções incluem os testes diagnósticos, as medicações e o pagamento dispensado a médicos e outros profissionais da área da saúde. Além disso, são reais os custos decorrentes da perda de emprego ou da incapacidade resultante da doença (HENRY, 1995).

1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO POR *ENTEROBACTER CLOACAE*.

Os bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* constituem os isolados bacterianos mais freqüentemente encontrados em espécimens clínicos.

Estão amplamente dispersos na natureza, sendo encontrados no solo, na água, em plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de humanos e animais.

Antes do advento dos antibióticos, da quimioterapia e dos procedimentos imunossupressores, as doenças infecciosas causadas pelas enterobactérias eram relativamente bem definidas; vários membros do grupo *Klebsiella-Enterobacter* eram comumente isolados de ferimentos traumáticos contaminados ou de incisões cirúrgicas.

Os pacientes imunocomprometidos ou debilitados, estão altamente suscetíveis às infecções nosocomiais, seja após a colonização com bactérias ambientais ou após procedimentos invasivos, como a cateterização, broncoscopia, colposcopia, biópsia cirúrgica, onde as membranas das mucosas são traumatizadas ou quando ocorre perda da sua integridade.

As enterobactérias compreendem bacilos aeróbios e anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, com flagelo peritríquio ou sem motilidade, oxidase-negativos, gram-negativos, que produzem ácido pela fermentação da glicose e reduzem nitrato à nitrito (HENRY, 1995).

Os microrganismos gram-negativos são apontados como importantes causas de infecções nosocomiais primárias da corrente sanguínea em neonatos nas unidades de terapia intensiva; estas infecções freqüentemente resultam em altos índices de morbidade e

mortalidade (HAERTL, 1993; GAYNES, 1996; ARCHIBALD, 1998). Ademais, as infecções em corrente sanguínea em neonatos nas unidades de terapia intensiva estão relacionadas fortemente com o uso de cateteres umbilical e venoso-central. Outros fatores, incluindo práticas de infusão de soluções contaminadas, como soluções de dextrose ou soluções do tipo salina e principalmente nutrição parenteral total, têm sido associados às infecções nosocomiais da corrente sanguínea.

Dados da literatura ilustram surtos nosocomiais polimicrobianos, em corrente sanguínea, causados por *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* (ARCHIBALD et al., 1998).

Em razão de muitos representantes do gênero *Enterobacter* produzirem grande quantidade de gás, por muitos anos as espécies foram denominadas *Aerobacter aerogenes*. A designação do gênero foi alterada para *Enterobacter* por Edwards e Ewing em 1962.

Há 16 espécies incluídas no gênero *Enterobacter*, porém, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* são as espécies mais comumente encontradas nos espécimens clínicos. Encontram-se amplamente distribuídas em água, em material de esgoto, solo e em vegetais. Constituem parte da microbiota entérica comensal e estão associadas a uma variedade de infecções oportunistas envolvendo o trato urinário, trato respiratório e ferimentos cutâneos e, em certos casos, causam septicemia e meningite (KONEMAN, 1997). Ainda, as espécies pertencentes ao gênero *Enterobacter* podem causar endocardite, abscessos cerebrais, artrite infecciosa, osteomielite e queratite (CHOW, 1994). As espécies de *Enterobacter* receberam destaque no início dos anos 70, quando septicemias causadas por *Enterobacter* ocorreram em 25 hospitais americanos atingindo 378 pacientes que estavam recebendo soluções intravenosas contaminadas (CHOW, 1994).

Enterobacter cloacae, um bacilo gram-negativo aeróbio encontrado na microbiota normal do trato gastrointestinal humano tem emergido como um importante patógeno nosocomial (CHOW, 1994; ZHI-YUAN SHI, 1996). Dados da literatura revelam surtos de infecção em unidades de terapia intensiva para neonatos, unidades cardíacas de tratamento intensivo, centros cirúrgicos e unidades de queimados (HAERTL, 1993; CHOW, 1994; ZHI-YUAN SHI, 1996).

Os problemas terapêuticos relativos às cepas resistentes às múltiplas drogas são comuns, especialmente em unidades de terapia intensiva. Merece destaque a habilidade do *E. cloacae* em adquirir resistência às cefalosporinas de terceira geração como por exemplo, cefotaxima e ceftazidima, ocasionada por mutação, que por sua vez aumenta a produção de beta-lactamase, produto da expressão cromossômica. Isso pode ocorrer na microflora ou no sítio da infecção no paciente em tratamento, o qual pode tornar-se fonte para a transmissão da cepa bacteriana em questão (FINNSTRÖM, 1998).

A infecção por *E. cloacae* é rara em indivíduos saudáveis, mas vem aparecendo como uma causa significativa de infecções nosocomiais nos últimos anos. Nas unidades de terapia intensiva para neonatos, os recém-nascidos podem ser colonizados com *E. cloacae* particularmente durante as 2 primeiras semanas de vida e surtos incluindo casos de infecções fatais por *E. cloacae* foram relatados em tais unidades (FINNSTRÖM, 1998; YU, 2000).

Fatores predisponentes à bacteremia por *E. cloacae* nos pacientes em geral incluem o diabetes, as neoplasias, a neutropenia e a hospitalização, particularmente em pacientes expostos à terapia antimicrobiana e a procedimentos invasivos como a instalação de cateteres venosos-centrais. Há, ainda relatos de disseminação do microrganismo pelas mãos dos profissionais da saúde e também através das soluções endovenosas (TRESOLDI et al., 2000; YU, 2000).

E. cloacae é um microrganismo de vida livre e tem sido encontrado contaminando várias soluções e equipamentos utilizados em hospitais, bem como água destilada e soluções de limpeza (CHOW, 1994; FINNSTRÖM, 1998).

Estudos realizados pela Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance - SCOPE*), realizados durante um período de 14 meses em 1995/1996, em aproximadamente 50 centros médicos americanos, demonstraram que das 4725 infecções da corrente sanguínea, 230 tinham como agente etiológico o *Enterobacter* spp, representando o oitavo germe mais freqüente entre os patógenos isolados (PFALLER et al., 1997). HAERTL e cols. (1993) destacam que o gênero *Enterobacter* responde por 4% a 12% das sepses causadas por bactérias gram-negativas.

As infecções em corrente sanguínea após cirurgias cardíacas constituem uma complicação pós operatória bem conhecida, com dados da literatura demonstrando de 12,4 a 34,3 casos por 1000 procedimentos realizados. Em estudo realizado com nove pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e que desenvolveram bacteremia por bactérias gram-negativas, RUDNICK e cols. demonstraram a presença dos seguintes microrganismos : *Enterobacter cloacae* (6 casos); *Pseudomonas aeruginosa* (5 casos); *Klebsiella pneumoniae* (3 casos); *Serratia marcescens* (2 casos) e *Klebsiella oxytoca* (1 caso); cinco dos nove pacientes em estudo tiveram bacteremia polimicrobiana (RUDNICK et al., 1996).

A epidemiologia molecular de surtos nosocomiais causados por *E. cloacae* tem sido bem documentada em anos recentes. Isto, porém, não é o caso nos países em desenvolvimento, onde as infecções nosocomiais constituem um problema crescente e ainda pouco estudado, em especial na área de epidemiologia molecular. O poder discriminatório das técnicas de fenotipagem não é adequado para as análises epidemiológicas de surtos causados por *E. cloacae* aumentando as dificuldades de realização dos estudos epidemiológicos em países em desenvolvimento, onde os recursos limitados restringem o uso rotineiro de técnicas moleculares (Van NIEROP et al., 1998).

1.2. MÉTODOS MOLECULARES, PARA TIPAGEM DE MICRORGANISMOS, COM FINALIDADES EPIDEMIOLÓGICAS

Diversos métodos moleculares têm sido aplicados em estudos epidemiológicos para tipagem de microrganismos responsáveis por infecções hospitalares. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: métodos fenotípicos e métodos genotípicos. Os métodos fenotípicos são aqueles que caracterizam os produtos da expressão gênica de forma a diferenciar as cepas. Propriedades como o perfil bioquímico, tipo de bacteriófago, presença de antígenos na superfície celular e perfil de sensibilidade a antibióticos são todos exemplos de propriedades fenotípicas que podem ser avaliadas. Como envolve a expressão de um gene, todas estas propriedades podem apresentar variação, baseada em mudanças nas condições de crescimento, na fase de crescimento e em mutações espontâneas. Os métodos genotípicos são aqueles que se baseiam na análise de uma estrutura genética de um

microrganismo e são caracterizados pela fragmentação do cromossomo, por enzimas apropriadas, ou pelo estudo de DNA extracromossômico. Os métodos genotípicos apresentam menor variação natural. No entanto, podem ser afetados por inserções ou deleções do DNA, ganho ou perda de DNA extracromossômico ou mutações aleatórias que criam ou eliminam sítios de reconhecimento, alterando a ação das endonucleases de restrição (TENOVER, 1997).

1.3. MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS PARA O ESTUDO DE PATÓGENOS HOSPITALARES

A. Métodos com base no estudo do DNA genômico

- análise do perfil plasmidial;
- análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA genômico, após a digestão com enzimas de restrição, pela eletroforese convencional (*Restriction endonuclease analysis* - REA);
- *Southern hybridization* utilizando probes de DNA específicos;
- perfil do DNA genômico utilizando PFGE;
- *Arbitrarily primed polymerase chain reaction* – PCR;

B. Métodos fenotípicos com base no estudo das proteínas

- *immunoblot fingerprint*;
- análise de proteínas celulares por eletroforese em gel de poliacrilamida;
- *multilocus enzyme electrophoresis*;

Todos os sistemas podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e facilidade de interpretação (TENOVER, 1997).

A tipabilidade refere-se à habilidade da técnica em produzir um resultado de tipagem para cada isolado. Isolados não tipáveis são aqueles que não produzem resultado. Um método para ser considerado reprodutível deve gerar os mesmos resultados, quando uma mesma cepa for testada em repetidos ensaios laboratoriais. Estudos de tipagem de cepas coletadas durante períodos variáveis (semanas, meses ou anos), podem apresentar pequenas variações nos padrões de DNA genômico quando analisados pelas técnicas de análise plasmidial, PFGE e PCR (MASLOW, SLUSTKY & ARBEIT, 1993; VAN BELKUM & MEIS, 1994). O poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados não relacionados epidemiologicamente. Idealmente, o método de tipagem deve ser capaz de reconhecer os isolados não relacionados, fornecendo resultados que nos permitam classificá-los como pertencentes a um único perfil (MASLOW, MULLIGAN & ARBEIT, 1993). A facilidade de realização reflete o custo dos reagentes apropriados e do equipamento; da complexidade do método e o esforço requerido para o aprendizado e a realização prática da técnica. A facilidade de interpretação envolve a obtenção de um resultado que seja claro, objetivo, de fácil compreensão (TENOVER, 1997).

O **quadro I** refere-se às vantagens e desvantagens de diferentes métodos de tipagem molecular com base na análise do DNA.

Quadro I: Características das técnicas de tipagem molecular baseadas no DNA

Método de tipagem	Proporção de cepas tipadas	Reprodutibilidade	Poder discriminatório	Facilidade de interpretação	Facilidade de execução
Plasmídio	maioria	boa	regular	moderada	moderada
REA	todas	boa	bom	difícil	moderada
RFLP com probes	todas	excelente	moderada	moderada	difícil
PFGE	todas	excelente	excelente	moderada	moderada
PCR	todas	boa	boa	moderada	moderada

1.4. MÉTODOS GENOTÍPICOS

Técnica para a análise plasmidial

Os plasmídios são elementos genéticos extracromossômicos que podem transferir informação genética entre diferentes isolados bacterianos. A análise plasmidial foi o primeiro método genotípico a ser aplicado em estudos de epidemiologia molecular (ARBER & MACKEL, 1981; SCHABERG et al., 1981), tendo sido empregado, primeiramente para estudar a relação entre padrões não usuais de resistência bacteriana aos antimicrobianos (ARBER & MACKEL, 1981). As técnicas atuais de extração do DNA plasmidial permitem o isolamento rápido dos plasmídios e utilizam um sistema de eletroforese bastante simples para separação dos mesmos, tornando esse método apropriado para diversos laboratórios clínicos. O acréscimo da digestão do DNA plasmidial com enzimas conhecidas como endonucleases de restrição ou simplesmente enzimas de restrição aumenta o poder discriminatório e a reprodutibilidade da técnica (TOWNSEND et al., 1985). Algumas cepas bacterianas, em especial os *Staphylococcus aureus*, contêm apenas um grande plasmídio, freqüentemente de peso molecular entre 100 a 150 quilobases (kb). Nesses casos a adição da enzima de restrição permite aumentar o poder discriminatório da eletroforese (PFALLER et al., 1991). No entanto, as bactérias gram-negativas usualmente apresentam um número maior de plasmídios sendo desnecessária, muitas vezes, a realização da digestão com enzimas de restrição (PATTERSON et al., 1991; MARCOS et al., 1995; SEIFERT et al., 1994; GETCHELL-WHITE et al., 1989).

A análise do DNA plasmidial possui vantagens e desvantagens. Os plasmídios podem disseminar-se de uma bactéria para outra e portanto o encontro de cepas contendo o mesmo perfil plasmidial pode significar que o plasmídio tem o caráter epidêmico e não a cepa bacteriana (FARRAR, 1983). Ainda, a cepa epidêmica pode não conter plasmídios; cepas não relacionadas podem apresentar o mesmo plasmídio; os plasmídios estão sujeitos a rearranjos estruturais e por serem elementos extracromossômicos, a bactéria pode perder ou ganhar plasmídios não relacionados ao surto (WACHSMUTH, 1986; EISENSTEIN, 1990; LUPSKI, 1993).

Como vantagens temos a aplicabilidade em estudos de vários gêneros e espécies bacterianos, facilidade e rapidez de execução, boa reprodutibilidade e baixo custo.

Técnica eletroforética para análise do DNA cromossômico

Existem dois métodos de tipagem de microrganismos com base nos padrões de fragmentos produzidos pela clivagem do DNA cromossômico com enzimas de restrição.

O primeiro método, usualmente referido como convencional, refere-se à extração do DNA e à digestão com enzima de restrição que corta o DNA em inúmeros fragmentos. Nesse procedimento, os fragmentos de DNA são submetidos à corrida eletroforética comum em gel de agarose. Os fragmentos de 0,5 a 2,5 kb apresentam-se como várias bandas visíveis ou como uma única banda, enquanto fragmentos maiores não são capazes de migrar através do gel, ficando retidos na sua borda superior.

A segunda técnica baseia-se na utilização da PFGE, capaz de separar fragmentos de 1 kb até 1.000 kb (1 megabase), usando enzimas de restrição de baixa frequência de clivagem do DNA, gerando de 10 a 30 bandas no gel de agarose.

Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição de clivagem freqüente e eletroforese convencional

Cada enzima de restrição cliva o DNA cromossômico em uma sequência particular de nucleotídeos, sequência esta que pode estar repetida inúmeras vezes no cromossomo. O número e o tamanho dos fragmentos gerados refletem a frequência e a distribuição em que essa sequência é repetida. O padrão de bandas gerado por esse método, no qual a distinção entre as cepas é feita com base no número e tamanho dos fragmentos, é denominado “restriction fragment length polymorphisms” (RFLP). Os inúmeros fragmentos separados pela eletroforese convencional, resultantes da digestão, dificultam a análise comparativa das cepas. Entretanto, para algumas bactérias e leveduras, essa técnica tem-se mostrado útil, como nos estudos de surtos envolvendo *Clostridium difficile* (PETERSON & KELLY, 1993) e *Candida tropicalis* (DOEBELLING et al., 1991).

Os fragmentos gerados pela digestão do DNA cromossômico podem ser transferidos para uma membrana de nitrocelulose (*Southern blot*) e incubados com probes de DNA, marcados com isótopos radioativos ou substâncias quimioluminescentes. O probe liga-se apenas em regiões que possuam seqüência complementar de DNA, que podem ser visualizadas pela exposição da membrana a um filme fotográfico. Quanto mais relacionados entre si forem os microrganismos, as seqüências serão mais identificadas pelo probe, produzindo padrões de bandas idênticos ou semelhantes. No entanto, o poder discriminatório dessa técnica é afetado pelo tipo de probe empregado, ou seja, o probe que detecta uma região que se repete freqüentemente no cromossomo produzirá padrões com mais bandas no gel e, portanto, uma melhor discriminação em relação aos probes que detectam poucas seqüências no cromossomo (WEBER, PFALLER & HERWALDT, 1997). RFLP utilizando o probe IS110 tem sido aplicado especialmente nos estudos de transmissão cruzada e epidemias de *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes HIV-positivos (DALEY et al., 1992; TORREA et al., 1996).

Análise do DNA cromossômico com enzimas de restrição e PFGE

Os fragmentos de DNA maiores que 20 a 25 kb não são separados pela eletroforese convencional que utiliza um único campo elétrico unidirecional. A introdução em 1984 da PFGE permitiu a separação de grandes fragmentos de DNA (40 a 1.000 kb) em gel de agarose (SCHWARTZ & CANTOR, 1984). A capacidade de separação de grandes moléculas foi facilitada alterando a direção do campo elétrico. O número de fragmentos é limitado pelo uso de enzimas de restrição que reconhecem os sítios que ocorrem com baixa freqüência no genoma do microrganismo. O campo elétrico da eletroforese é aplicado em uma determinada direção, por um primeiro grupo de eletrodos, por um curto período de tempo (pulso). A seguir, a corrente é alternada para o segundo grupo de eletrodos e depois para um terceiro grupo. Dessa forma, devido à alternância de direções, o DNA consegue movimentar-se através do gel de agarose, resultando em um alto grau de resolução dos fragmentos no gel (CHU, VOLLRATH & DAVIS., 1986).

A PFGE apresenta importantes vantagens quando comparada às demais técnicas de tipagem molecular, como análise plasmidial, REA e *Southern blot* entre outras, pois o DNA cromossômico é digerido com enzimas de restrição de baixa freqüência de

clivagem, fornecendo de 10 a 30 bandas o que permite excelente separação. Outra vantagem é que o método não necessita de probes, além de ser altamente reprodutível e possuir excelente poder discriminatório, para distinguir cepas endêmicas de não endêmicas. A PFGE pode ser aplicada em uma série de microrganismos, em especial as bactérias (GOERING, 1993; SWAMINATHAN & MATAR, 1993; MASLOW, SLUTKY & ARBEIT, 1995) e as leveduras (PFALLER, 1992). Uma das poucas desvantagens do método está no alto custo do equipamento e na demorada e trabalhosa execução.

1.5. JUSTIFICATIVA DO DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO PROPOSTO

As infecções nosocomiais constituem uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em hospitais, geralmente envolvendo grupos de pacientes considerados de alto risco, tais como neonatos, pacientes neutropênicos, crianças com fibrose cística e pacientes sob nutrição parenteral total. Numerosos trabalhos mostram que as infecções nosocomiais resultam em custos elevados para a instituição além dos custos decorrentes da perda de emprego ou da incapacidade resultante da doença. Em anos recentes *E. cloacae* tem surgido como um importante patógeno nosocomial. Porém, na esfera nacional, poucos são os trabalhos envolvendo o agente, podendo citar somente os trabalhos de DARINI et al., 1999; TRESOLDI et al., 2000 e CALIL et al., 2001. Desta forma o presente trabalho apresenta o microrganismo *E. cloacae* como importante patógeno nosocomial em unidade de terapia intensiva para neonatos, monitorando os fatores de risco, alertando, informando e conscientizando os profissionais da área para as possíveis fontes de transmissão, reduzindo as possibilidades de futuros surtos. Traz, ainda contribuição sobre a epidemiologia molecular de surtos nosocomiais causados pelo *E. cloacae*, pela análise plasmidial e pela análise do DNA cromossômico pela eletroforese em campo pulsátil, uma metodologia considerada de referência. A análise plasmidial, foi utilizada por constituir uma metodologia relativamente simples, capaz de contribuir em estudos epidemiológicos, aplicável em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde os recursos limitados dificultam a plena utilização das técnicas moleculares tidas como referência.



2. OBJETIVOS

2.1. ESTUDAR A IDENTIDADE GENÔMICA DAS CEPAS DE *E. cloacae* ISOLADAS DE HEMOCULTURAS DE RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS DURANTE OS ANOS DE 1995, 1996 E 1997 NA UTI-NEONATAL DO CAISM/UNICAMP;

2.1.1. Avaliar o poder discriminatório das técnicas moleculares de tipagem utilizadas;

2.2. AVALIAR OS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À MORTE NOS RECÉM-NASCIDOS COM INFECÇÃO SISTÊMICA, CAUSADA PELO *E. cloacae*, INTERNADOS NO CAISM/UNICAMP, NOS ANOS DE 1995, 1996 E 1997;



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Refere-se aos recém-nascidos internados na UTI-Neonatal, durante os anos de 1995, 1996 e 1997, no CAISM/UNICAMP que apresentaram evidências clínicas de infecção sistêmica, cujo resultado de pelo menos uma amostra de hemocultura tenha sido positivo para *E. cloacae*. O anexo I descreve, em detalhes, as determinações do CDC para a caracterização de infecção nosocomial sistêmica (GARNER, 1988).

3.2. DESCRIÇÃO DA UNIDADE DE NEONATOLOGIA DO CAISM

A UTI-Neonatal do Departamento de Pediatria é parte do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Constitui uma unidade de referência para o atendimento de recém-nascidos prematuros, de baixo peso ou com alguma condição clínica em especial, nascidos na própria unidade ou em outros hospitais de Campinas e/ou da região, sendo acolhidos para que possam receber atendimento especializado.

Em 1995 a unidade de terapia intensiva atendia aproximadamente 600 neonatos por ano, sendo localizada numa área compreendendo cerca de 3 milhões de habitantes. Na época, a enfermaria contava com 30 leitos, sendo 8 leitos destinados à terapia intensiva e 22 leitos para o atendimento de recém-nascidos considerados semi-críticos e/ou em recuperação.

Em 1996, a unidade passou por reformas, obtendo melhor adequação física, porém, mantendo o número total de 30 leitos.

3.3. METODOLOGIA APLICADA

3.3.1. Análise microbiológica

Isolados bacterianos

A solicitação para a realização de hemoculturas dos recém-nascidos seguiu critérios clínicos, sendo a coleta das hemoculturas realizada pela equipe de enfermagem devidamente orientada e preparada tecnicamente.

Quatorze cepas de *E. cloacae* foram incluídas como cepas-controle. Estas cepas foram isoladas de hemoculturas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UNICAMP entre os anos de 1995 a 1998 e foram utilizadas para a avaliação do poder discriminatório das técnicas moleculares aplicadas.

Todos os isolados de *E. cloacae* foram identificados pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNICAMP. As cepas eram reisoladas e estocadas no LEM, para futuros estudos.

3.3.2. Desenho do estudo

Primeira fase: Análise do perfil genômico

Todas as amostras de *E. cloacae* do período de estudo (isoladas de hemoculturas de recém-nascido) disponíveis e viáveis foram reisoladas e submetidas à análise do DNA plasmidial, utilizando a eletroforese convencional e à análise do DNA cromossômico, utilizando a PFGE.

Segunda fase: Coleta de dados e análise estatística

Foi realizado um estudo epidemiológico para a avaliação dos fatores associados à morte, em pacientes hospitalizados na unidade, durante os anos de 1995, 1996 e 1997 e que apresentaram infecção sistêmica pelo *E. cloacae*. A execução deste estudo envolveu a consulta de todos os sistemas de registro disponíveis e a coleta de dados. Para os dados de letalidade, as informações dos pacientes foram obtidas considerando o período compreendido desde a internação até a alta ou óbito de cada paciente.

3.3.3. Critérios de exclusão

Para o estudo epidemiológico foram excluídos todos os recém-nascidos que não nasceram no CAISM/UNICAMP e/ou que não tiveram seus respectivos prontuários médicos localizados.

Para o estudo molecular, foram excluídas as cepas de *E. cloacae* não encontradas e/ou que não estavam viáveis.

3.3.4. Variáveis e conceitos

Foram estudados os procedimentos considerados de risco, presentes na população de estudo e suas possíveis associações com os óbitos dos recém-nascidos. Para a análise dos fatores de risco para a morte, foi realizado um estudo comparativo entre neonatos que morreram e aqueles sobreviventes à infecção sistêmica por *E. cloacae*.

- a) Alta: Considerou-se “alta hospitalar” a autorização médica para a saída do paciente hospitalizado, seja por motivos de cura-clínica ou transferência para outra instituição;
- b) Idade gestacional: A idade gestacional foi avaliada por amenorréia e ecografia precoce, complementada por avaliação clínica, segundo o método de Capurro e/ou New Ballard (LUBCHENCO et al., 1966; BATTAGLIA et al., 1967; WHO, 1977; CAPURRO et al., 1978; BALLARD et al., 1991).

Os recém-nascidos foram classificados em:

recém-nascido pré-termo (RNPT): menos que 37 semanas completas;

a termo (RNT): de 37 semanas completas a menos de 42 semanas completas;

- c) Peso ao nascimento: A avaliação do peso foi realizada em sala de parto, utilizando balança digital;
- d) Tamanho: Os pacientes foram classificados em pequeno para a idade gestacional (PIG), adequado para a idade gestacional (AIG) e grande para a idade gestacional (GIG), baseando-se na curva de crescimento de Lubchenco (BATTAGLIA et al., 1967);
- e) Para a avaliação dos fatores associados à morte, foram coletados os dados das seguintes variáveis:

- Ventilação mecânica;
- Cateter umbilical;
- Cateter venoso e/ou arterial;
- Flebotomia;

- Uso de antibióticos: Utilização de antibióticos, seja para finalidades terapêuticas ou profiláticas. Foram considerados somente os antibióticos de uso sistêmico, não considerando os antibióticos de uso tópico;
- Sonda traqueal;
- Sonda para alimentação enteral;
- Nutrição parenteral total: Utilização de nutrição endovenosa, contendo eletrólitos, oligoelementos, glicose, proteínas e lipídeos;
- Hemoterapia;

Para o tempo de exposição aos procedimentos invasivos, o acompanhamento foi realizado desde o momento da internação até a alta ou óbito de cada paciente;

- f) Data da saída: Considerou-se “saída” a alta do paciente (cura clínica) ou sua transferência;
- g) *E. cloacae* multirresistente: *E. cloacae* resistente a aminoglicosídeos e/ou cefalosporinas de terceira geração;
- h) Colonização: Presença de um microrganismo crescendo e multiplicando-se em um paciente, sem qualquer expressão clínica ou reação imunológica evidentes no momento em que o microrganismo foi isolado (JARVIS, 1996);
- i) Isolado: Termo geral para uma cultura pura de bactérias, obtida de subculturas de uma única colônia a partir de uma placa de isolamento primário. Presume-se que o microrganismo em questão seja derivado de um único agente microbiológico para o qual nenhuma informação sobre seu gênero e espécie esteja disponível (TENOVER, 1995);
- j) Isolados epidemiologicamente relacionados: São os isolados obtidos de espécimens coletados de pacientes, fômites ou de um ambiente ou de uma área bem definida, durante um curto período, como parte de investigações epidemiológicas cujos resultados sugerem que estes isolados possam ser derivados de uma fonte comum (TENOVER, 1995);

- l) Isolados geneticamente relacionados (clones): São os isolados que ao serem submetidos a uma variedade de testes genéticos mostram-se indistinguíveis entre si ou muito similares, sugerindo que sejam derivados de um ancestral comum. Considerando o potencial para alterações genéticas crípticas, detectáveis somente pelo sequenciamento ou por outras análises específicas, a evidência da clonalidade é melhor compreendida tendo-se em vista uma abordagem relativa (TENOVER, 1995);
- m) Surto: Refere-se à incidência aumentada de uma doença infecciosa, em um local específico, durante um certo período, que está acima dos índices básicos para aquele local e para aquele período (TENOVER, 1995);
- n) Cepa: Trata-se de um isolado ou grupos de isolados que podem ser distinguidos de outros isolados do mesmo gênero e da mesma espécie por características fenotípicas ou por características genotípicas ou por ambas. Uma cepa é uma subdivisão descritiva de uma espécie (TENOVER, 1995);
- o) Cepas de um surto: São os isolados da mesma espécie que são tanto epidemiologicamente relacionados (por exemplo, pelo tempo, lugar e fonte comum de infecção) como geneticamente relacionados (apresentam genótipos indistinguíveis, por exemplo);
- p) Cepas endêmicas: São os isolados obtidos freqüentemente de pacientes infectados, (hospitalizados numa determinada unidade de saúde ou de uma comunidade) e que se mostram indistinguíveis ou intimamente relacionados entre si, evidenciados por métodos de tipagem, não existindo ligação direta ou epidemiológica que possam ser utilizadas. Sugere-se que tais microrganismos sejam relacionados, sob o ponto de vista clonal, mas suas origens possam ser mais distantes temporalmente quando comparadas com as origens das cepas de um surto (TENOVER, 1995);
- q) Coeficiente geral de mortalidade (taxa bruta ou global de mortalidade): Obtido pela relação entre o número total de óbitos ocorridos em determinado período e o número total de pacientes hospitalizados no mesmo período (PEREIRA, 1995);

- r) Mortalidade proporcional: É uma porcentagem em que relacionamos os óbitos com uma determinada característica com os óbitos totais (FORATTINI, 1992);
- s) Letalidade: Obteve-se a letalidade calculando-se a relação entre o número de óbitos resultantes de determinada causa e o número de pessoas que foram realmente acometidas pela doença (ROUQUAYROL, 1994).
- t) Coeficiente de pacientes com infecção hospitalar: É a razão entre o número de pacientes com infecção hospitalar em um intervalo de tempo determinado, e o número de pacientes internados no período, multiplicando-se o resultado por potência de 10.

3.3.5. Coleta de dados

Os dados clínicos, evolução e possíveis fatores de risco presentes nos recém-nascidos com infecção sangüínea por *E. cloacae* foram coletados utilizando ficha apropriada (**Anexo II**), a partir da revisão de prontuários e/ou outros sistemas de registro disponíveis.

3.3.6. Processamento e análise dos dados

Para a análise dos fatores de risco foi utilizada a análise univariada com o “odds ratio (OR)” com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}OR) e $P < 0,05$.

Os dados epidemiológicos foram analisados utilizando-se o programa *Epi Info* (versão 5, CDC, Atlanta).

Os *P* valores, bem como os valores de OR foram obtidos utilizando-se os testes de associação Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

Os fatores de risco para os óbitos causados pelo *E. cloacae* foram obtidos através da análise univariada.

Para a análise dos perfis do DNA cromossômico obtidos pela PFGE e a confecção de dendrograma foi utilizada a análise computacional (*Bio-Capt MW*, versão 99; *M&S Instruments Trading Inc*), com base no coeficiente de similaridade de Dice, após a captação das imagens por um sistema fotográfico IS-1000 digital.

3.3.7. Análise do DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial foi utilizado o método modificado de *Cetyltrimethyl ammonium bromide*, de TOWNSEND e cols. (1995).

As cepas de *E. cloacae*, isoladas a partir de culturas em Ágar MacConkey, foram repicadas e cultivadas em placas de BHI e incubadas por 18 a 24 horas a 35 °C.

As células bacterianas foram suspensas em tubos contendo 3 ml da solução contendo NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0) e centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos a 20 °C. As células foram então ressuspensas em 900 µL da solução contendo: sucrose 20%; TRIS 50 mM (pH 8,0); EDTA 10 mM (pH 8,0) e a seguir, foram adicionados 100 µL de lisozima (10 mg/mL), incubando as células em banho-maria por 1 hora a 37 °C.

A lise das células foi promovida pela adição de 1 mL da solução contendo: NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0).

A seguir, foi adicionado 1 mL da solução (volume/volume) contendo ATAB 0,5% (*alkyltrimethylammonium bromide*) mais 0,25% Triton X-100. Os tubos foram cuidadosamente invertidos para a homogeneização e aquecidos a 60°C por 10 minutos para a completa lise das células bacterianas, e a suspensão foi centrifugada a 18000 rpm, por 1 hora a 20 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde adicionamos 5 ml de ATAB 0,5 %. O material foi refrigerado a -20°C, por 15 minutos e então centrifugado a 6000 rpm, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e a película residual presente na lateral do tubo foi ressuspensa em 250 µL da solução contendo NaCl 2,5 M; EDTA 10 mM (pH 8,0). Em seguida, adicionou-se 500 µL de *TE High Molarity* pH 8,0 (solução contendo TRIS 0,1 M, pH 8,0 e EDTA 0,1 M, pH 8,0).

Seguiu-se, então, a adição de 5 µL de RNase (10 mg/mL), sendo os tubos reincubados a 37 °C (banho-maria) por 30 minutos. A seguir, prosseguiu-se com a extração utilizando 1 mL da solução contendo clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1, respectivamente). Os tubos foram então centrifugados a 7000 rpm por 15 minutos a 4 °C.

A fase aquosa foi transferida para um tubo *eppendorf* onde adicionou-se álcool isopropílico gelado (-20 °C). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 rpm em microcentrífuga por 3 a 5 minutos, desprezando o sobrenadante, após o procedimento. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol gelado (-20 °C) e centrifugado novamente. Desprezou-se o sobrenadante, deixando que o álcool residual evaporasse à temperatura ambiente, por uma noite ou por 1 hora a 37 °C (estufa).

A película remanescente foi ressuspensa em 100 µL de *TE High Molarity* e armazenada a 4°C. Para a verificação rápida da presença de plasmídios, 20 µL da suspensão mais 5 µL de corante foram submetidos à eletroforese convencional em gel de agarose (agarose 0,7% em solução tampão de TBE 1X (Tris, Ácido bórico, EDTA), seguindo as seguintes condições: 60 volts de corrente elétrica, por 6 horas. Um marcador de peso molecular (*Supercoiled DNA Ladder*; GibcoBRL) foi aplicado no primeiro poço de cada gel para a estimativa do tamanho das bandas formadas. A seguir, os géis foram corados com brometo de etídio (*Sigma Chemical Co.*) e fotografados sob ação da luz ultravioleta. A base para a identificação das cepas foi realizada relacionando o número e o tamanho dos plasmídios presentes em cada cepa (SEIFERT et al., 1994).

3.3.8. Análise do DNA cromossômico por PFGE

O DNA genômico foi preparado segundo o método de GOERING e DUENSING (1990) modificado. Cinco a dez colônias de *E. cloacae*, isoladas a partir de culturas em placas de ágar sangue, foram semeadas em 10 mL de caldo de BHI e incubadas por 24 horas a 37 °C, sob agitação.

A suspensão foi centrifugada (5000 rpm) por 5 minutos a 20 °C e o sobrenadante foi desprezado. As células bacterianas foram padronizadas por peso e diluídas mantendo-se igualmente a proporção peso/volume. Para tanto, o precipitado foi ressuspensa em 1 mL de solução salina estéril e a suspensão foi transferida para tubos *eppendorfs* pré-pesados, sendo centrifugados (12000 rpm) por 5 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante foi completamente desprezado e os tubos foram novamente pesados. A

diferença entre os pesos dos tubos (vazio e com o sedimento) foi então calculada. Adicionou-se em cada tubo o volume, em microlitros, correspondente à diferença obtida, de tampão *TEN* (TRIS 100mM, pH 7,5; EDTA 100mM, pH 7,5; NaCl 150mM) e o precipitado foi ressuspensão pela agitação em vórtex.

Um volume de 20 μ L desta suspensão foi transferido para outro tubo *eppendorf*, no qual foram adicionados 300 μ L de tampão *TEN*.

Em cada tubo foi adicionado o volume de 340 μ L de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (*Low Melt Agarose*; BioRad) e o preparado era dispensado em moldes acrílicos (Bio-Rad Labs) e refrigerado a 4°C, por 30 minutos. Os moldes de agarose foram dispensados em microplacas e incubados durante uma noite a 37°C em 2 mL de tampão *EC* pH 7,5 (Tris 0,006M, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,1M, pH 7,5; BRIJ58 0,5%; Deoxycholate Na 0,2%; Sarkosyl 0,5%) mais Lisozima (2mL de tampão *EC* mais 200 μ L de Lisozima 20 mg/ mL).

A solução tampão foi aspirada e os blocos de agarose foram lavados com 2 mL de *TE high molarity* por 4 vezes, com intervalos de lavagem de 1 hora, sempre mantidos sob agitação mecânica, à temperatura de 22 °C. Após a última lavagem, os blocos foram incubados a 50 °C durante toda a noite com 2 mL de solução *ESP* (EDTA 0,5M, pH 9,3; Sarkosyl 1%; Proteinase K 0,1 mg/mL).

Os blocos foram então 4 vezes lavados com *TE high molarity*, mantendo-se um intervalo de 1 hora entre cada lavagem. Ao final das lavagens os blocos foram estocados a 4°C em 2 mL de *TE high molarity*.

Para a etapa da digestão do material genético pela enzima de restrição *SpeI* (Gibco BRL) os blocos foram 4 vezes lavados com solução *Dummy no salt* (Tris, 0,1 M, pH 8,0; MgCl₂ 5 mM) sob agitação mecânica à temperatura de 22°C.

Os blocos de agarose, contendo o material genético a ser analisado, foram transferidos para outro tubo *eppendorf*, ao qual adicionou-se o volume de 200 μ L da solução tampão da enzima *SpeI*. Durante meia hora os blocos permaneciam na geladeira e após este período, a solução tampão era aspirada e o volume de 200 μ L da solução contendo a enzima *SpeI* preparada de acordo com as recomendações do fabricante, era adicionado em cada tubo, mantendo-os incubados durante uma noite a 37°C.

Os blocos de agarose contendo o DNA submetido a ação da endonuclease de restrição *SpeI* foram inseridos em gel de agarose a 1% em solução tampão *TBE* 0,5 X (Tris; Ácido bórico; EDTA) e os fragmentos digeridos foram separados pela eletroforese em campo pulsátil, usando o sistema CHEF-DRII (*contour-clamped homogeneous electric field*; Bio Rad Labs. Richmond, Ca.). A eletroforese foi realizada em campo elétrico de 6 volts, por 18 horas e tempo de pulsos intercalados de 5 e 60 segundos, a 14 °C. Um marcador de peso molecular (*DNA Lambda concatemer*; Bio Rad Lab.) foi inserido no primeiro poço de cada gel para a estimativa do tamanho dos fragmentos formados. Após a corrida eletroforética o gel foi corado pelo brometo de etídio (Sigma Chemical Co.) e fotografados sob ação da luz ultra violeta.

Análise comparativa dos isolados bacterianos

Os perfis cromossômicos observados foram denominados por letras em ordem alfabética sequencial para facilitar a análise. A relação de similaridade entre dois isolados foi estimada com base nos critérios de interpretação para os padrões de fragmentos de bandas, produzidos pela digestão do DNA cromossômico, segundo TENOVER et al., (1995).

Categorias de relação genética e epidemiológica

Isolados iguais: Dois isolados foram considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentaram o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desses resultados era que os isolados fossem considerados derivados de uma mesma cepa;

Isolados intimamente relacionados: Um isolado foi considerado intimamente relacionado à cepa do surto quando seu padrão de bandas, obtido pela PFGE, diferiu do padrão da cepa do surto em duas a três bandas;

Isolados possivelmente relacionados: Um isolado foi considerado possivelmente relacionado à cepa do surto quando as modificações consistiram em até dois eventos genéticos independentes, ou seja, observou-se 4 a 6 bandas diferentes, diferenças estas explicáveis por simples inserções ou deleções de DNA ou por ganho ou de perda de sítios de restrição;

Isolados não relacionados: Um isolado foi considerado não relacionado à cepa do surto quando o perfil do DNA cromossômico, obtido pela PFGE, diferiu do perfil da cepa do surto em 3 ou mais eventos genéticos independentes, o que correspondeu geralmente a diferenças de 7 ou mais bandas.



4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DO DNA PLASMIDIAL E DO DNA CROMOSSÔMICO

Durante os anos de 1995, 1996 e 1997 foram diagnosticados 53 casos de infecção sistêmica em recém-nascidos, internados no CAISM/UNICAMP, causados pelo *E. cloacae* (Gráfico 1). Nem todos os isolados bacterianos foram encontrados e/ou estavam viáveis para a análise por métodos genotípicos (Tabela 1). Foram estudados 33 isolados de *E. cloacae*, sendo 19 o número de isolados obtidos de hemoculturas dos recém-nascidos e 14 o número de isolados bacterianos (cepas-controle) obtidos de hemoculturas de pacientes de diversas especialidades com infecção sistêmica, pelo *E. cloacae*, internados no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

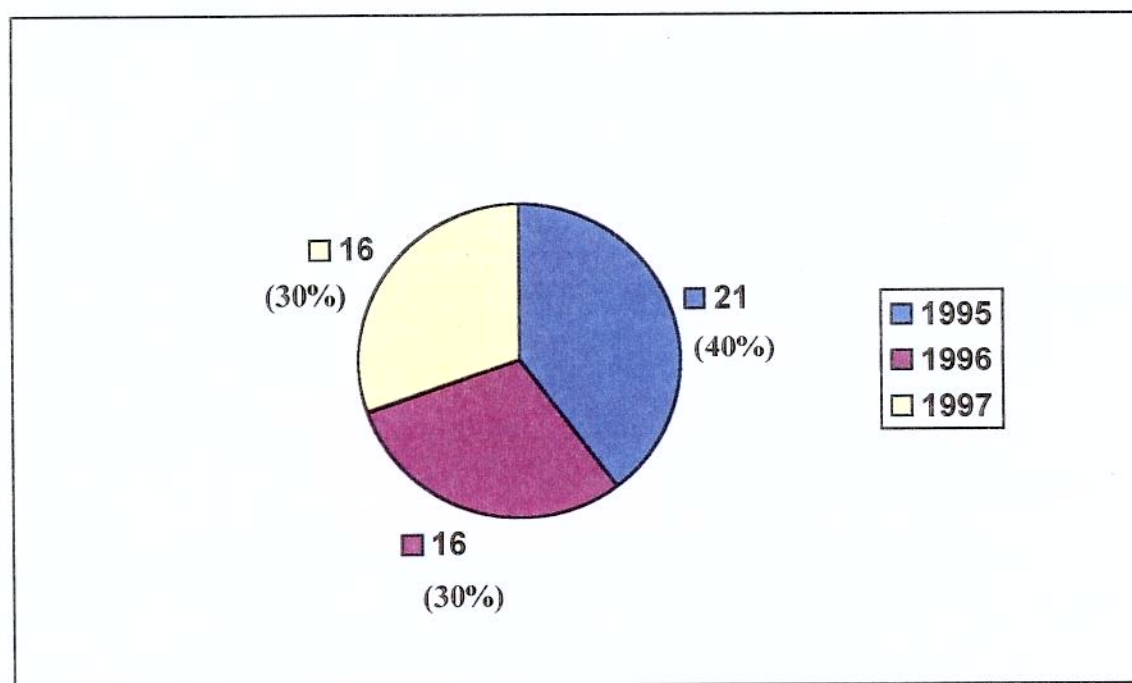


Gráfico 1: Número de pacientes da Neonatologia do CAISM/UNICAMP que apresentaram infecção sistêmica por *E. cloacae*, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Tabela 1: Número de recém-nascidos com infecção em corrente sangüínea por *E. cloacae* e viabilidade das cepas estocadas no LEM

	Ano			Total
	1995	1996	1997	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
No. de recém-nascidos com infecção em corrente sangüínea	21(40,00)	16(30,00)	16(30,00)	53(100,00)
No. de cepas encontradas no LEM	11(20,75)	10(18,87)	4(7,55)	25(47,17)
No. de cepas viáveis	9(16,98)	7 (13,21)	3(5,66)	19(35,85)

Isolados obtidos no ano de 1995

Análise do DNA plasmidial

Durante o ano de 1995, 21 pacientes apresentaram infecção sistêmica causada pelo *E. cloacae*. Das onze cepas estocadas, 9 estavam viáveis para o estudo.

Pela análise plasmidial, observamos 3 perfis, designados A, B e C (Figura 1).

O perfil A foi observado nos isolados obtidos dos pacientes 163, 164, 165, 168 e 171, representando 55,6% dos isolados viáveis.

Apresentaram o perfil B (33,3%) os isolados obtidos dos pacientes 167, 175 e 245.

Somente o isolado obtido do paciente 173 (11,1%) demonstrou possuir o perfil C.

Análise do DNA genômico

Os fragmentos de restrição formados permitiram a classificação dos isolados em 3 perfis: A, B e C (Figura 2). A distribuição dos perfis e seus respectivos pacientes foi idêntica à observada pela análise plasmidial, demonstrando correlação entre as técnicas empregadas.

Todas estas infecções ocorreram durante o mês de junho de 1995, com exceção do paciente 245 (agosto/1995).

Isolados obtidos no ano de 1996

Análise do DNA plasmidial

Durante o ano de 1996, 16 recém-nascidos apresentaram infecção sangüínea causada pelo *E. cloacae*. Das 10 cepas estocadas, 7 estavam viáveis para o estudo.

Pela análise plasmidial obtivemos a caracterização de 3 perfis (Figura 3), designados a, c, d.

Um único perfil foi observado para a amostra do paciente 2701 (perfil d). As amostras dos pacientes 2692, 2694 e 2698 foram classificadas no perfil c. As amostras obtidas dos pacientes 2685, 2691 e 2695 não apresentaram plasmídios. A amostra referente ao paciente 155 foi utilizada como isolado-controle. Este isolado foi obtido de hemocultura de um paciente da Cardiologia hospitalizado no Hospital de Clínicas no ano de 1996 e constituiu o perfil b.

Análise do DNA genômico

A técnica utilizada permitiu a caracterização de 5 perfis (Figura 4), designados a, b, c, d, e. A técnica da PFGE identificou como perfis únicos as amostras provenientes dos pacientes 2685 (perfil b), paciente 2695 (perfil d), paciente 2701 (perfil e) e paciente 2691 (perfil f). As amostras dos recém-nascidos 2692, 2694 e 2698 foram classificadas no perfil c. Todas estas infecções ocorreram no mês de dezembro de 1996, com exceção do paciente 155 (isolado controle, obtido em janeiro de 1996 – perfil a).

Isolados obtidos no ano de 1997

Dezesseis recém-nascidos apresentaram infecção sangüínea por *E. cloacae* no ano de 1997. Foram localizadas apenas 4 cepas referentes ao período e destas, apenas 3 estavam viáveis para o estudo.

As duas técnicas empregadas foram capazes de classificar os pacientes em apenas um perfil, denominado perfil e, para a análise plasmidial e perfil g, para a análise do DNA cromossômico (Figuras 3 e 4). Todos os 3 pacientes tiveram infecção no mês de março/1997.

Isolados-controle

Análise do DNA plasmidial

A técnica foi capaz de identificar 13 perfis (Figura 5), denominados I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, respectivamente.

Análise do DNA genômico

A técnica utilizada foi capaz de fornecer 13 perfis (Figura 6), designadas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, respectivamente.

Com exceção do paciente 3523 (1995) e dos pacientes 146 e 99 (ambos de 1996) os demais pertenciam ao ano de 1998.

Os dados referentes à data do isolamento, bem como os diferentes perfis de *E. cloacae* obtidos pela análise plasmidial e pela análise do DNA cromossômico encontram-se descritos na Tabela 2.

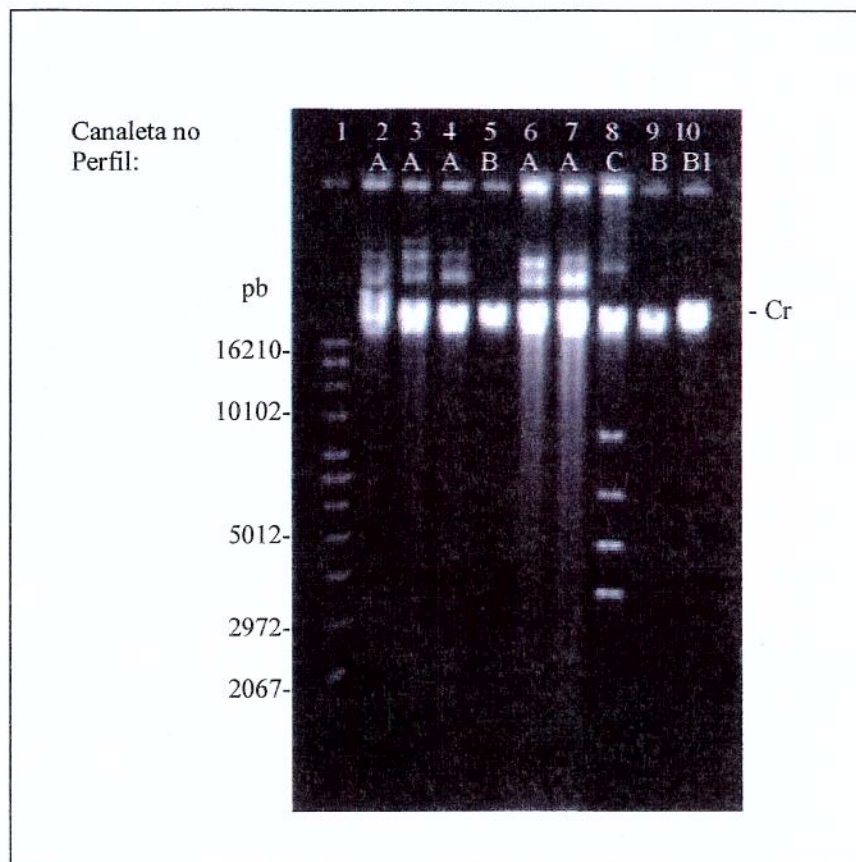


FIGURA 1: Eletroforese em gel de agarose (0,7% em TBE 1X) demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, no ano de 1995. Condições de corrida: 60v; durante 6 horas. Cr, DNA cromossômico.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (*Supercoiled DNA Ladder*; GibcoBRL);

Canaletas 2, 3, 4, 6 e 7: *E. cloacae* isolado de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 163, 164, 165, 168 e 171, respectivamente); perfil A;

Canaletas 5, 9 e 10: *E. cloacae* isolado de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 167, 175 e 245, respectivamente); perfil B;

Canaleta 8: *E. cloacae* isolado de hemocultura de recém-nascido (paciente 173); perfil C.

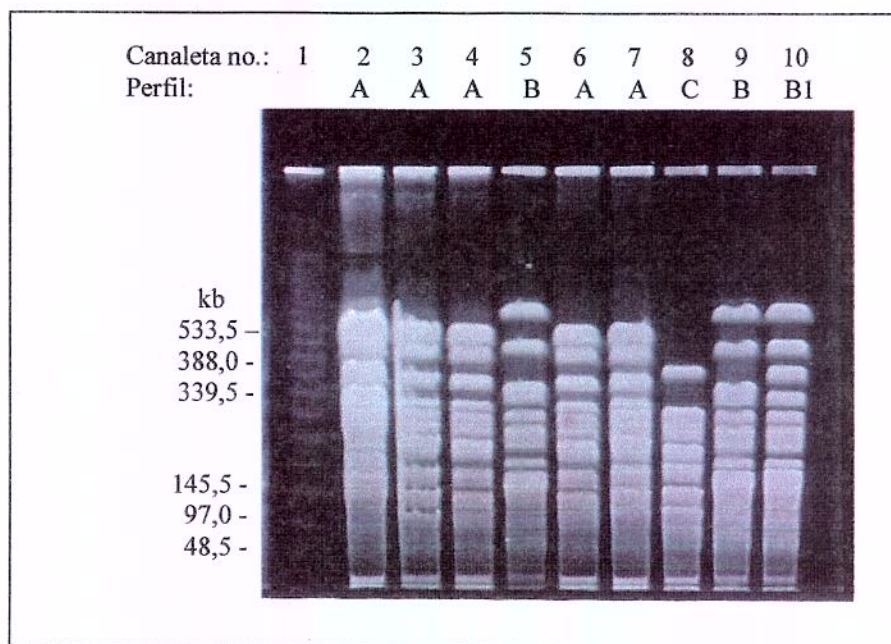


FIGURA 2: Perfis de DNA cromossômico de cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, no ano de 1995. Após a digestão do DNA cromossômico com enzima de restrição *SpeI*, seguiu-se à eletroforese (gel de agarose 1% em TBE 0,5X) em campo pulsátil. Condições de corrida: 6 volts/cm; tempo inicial: 5 segundos; tempo final: 60 segundos; 14 °C durante 18 horas.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (*λ Ladder*; BioRad);

Canaletas 2, 3, 4, 6 e 7: *E. cloacae* isolado de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 163, 164, 165, 168 e 171, respectivamente); perfil A.;

Canaletas 5, 9 e 10: *E. cloacae* isolado de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 167, 175 e 245, respectivamente); perfil B;

Canaleta 8: *E. cloacae* isolado de hemocultura de recém-nascido (paciente 173); perfil C.

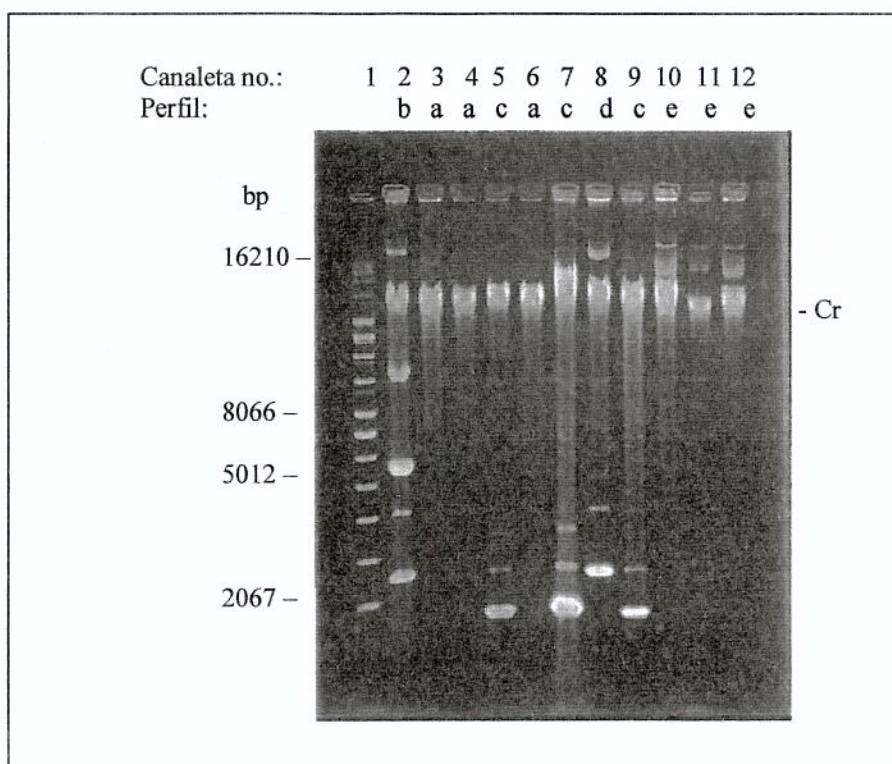


FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose (0,7% em TBE 1X) demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, nos anos de 1996 e 1997. Condições de corrida: 60 v, durante 6 horas. Cr, DNA cromossômico.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (*Supercoiled DNA Ladder*; GibcoBRL);

Canaleta 2: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Cardiologia (paciente 155-cepa controle); perfil b;

Canaletas 3, 4, 6: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 2685, 2691 e 2695, respectivamente); ausência de plasmídios;

Canaleta 8: *E. cloace* isolado em 1996 de hemocultura de recém-nascido (paciente 2701); perfil d;

Canaletas 5, 7, 9: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 2694, 2692 e 2698, respectivamente); perfil c;

Canaletas 10, 11, 12: *E. cloacae* isolado em 1997 de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 67, 68 e 72, respectivamente); perfil e.

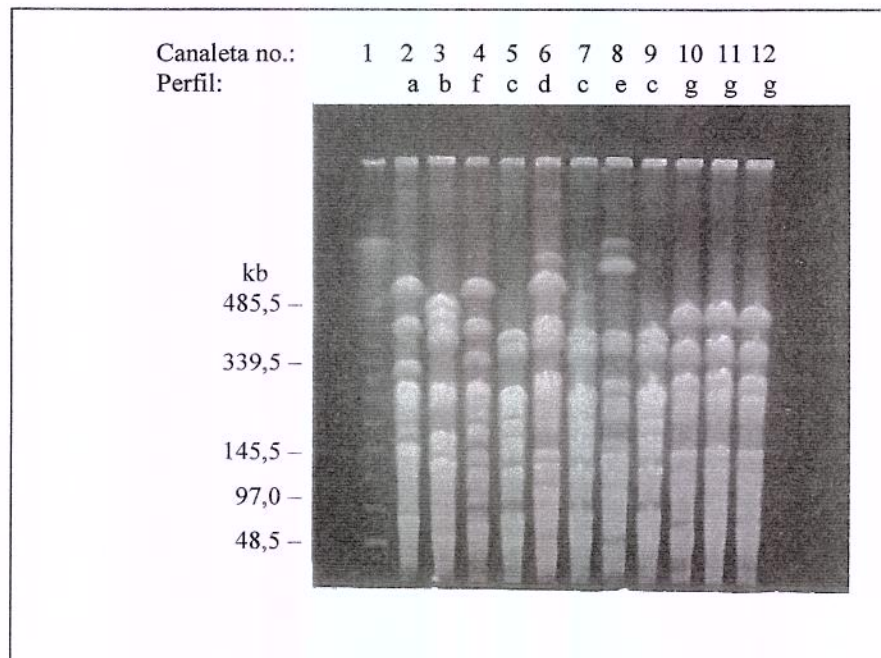


FIGURA 4: Perfis de DNA cromossômico de cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI/Neonatal – CAISM, nos anos de 1996 e 1997. Após a digestão do DNA cromossômico com enzima de restrição SpeI, seguiu-se à eletroforese (gel de agarose 1% em TBE 0,5X) em campo pulsátil. Condições de corrida: 6 volts/cm; tempo inicial: 5 segundos; tempo final: 60 segundos; 14 °C durante 18 horas.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (λ Ladder; BioRad);

Canaleta 2: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Cardiologia (pacientes 155-cepa controle); perfil a;

Canaleta 3: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de recém-nascido (paciente 2685); perfil b;

Canaleta 4: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de recém-nascido (paciente 2691); perfil f;

Canaletas 5, 7, 9: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 2694, 2692 e 2698, respectivamente); perfil c;

Canaleta 6: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de recém-nascido (paciente 2695); perfil d;

Canaleta 8: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de recém-nascido (paciente 2701); perfil e;

Canaletas 10, 11, 12: *E. cloacae* isolado em 1997 de hemoculturas de recém-nascidos (pacientes 67, 68 e 72); perfil g.

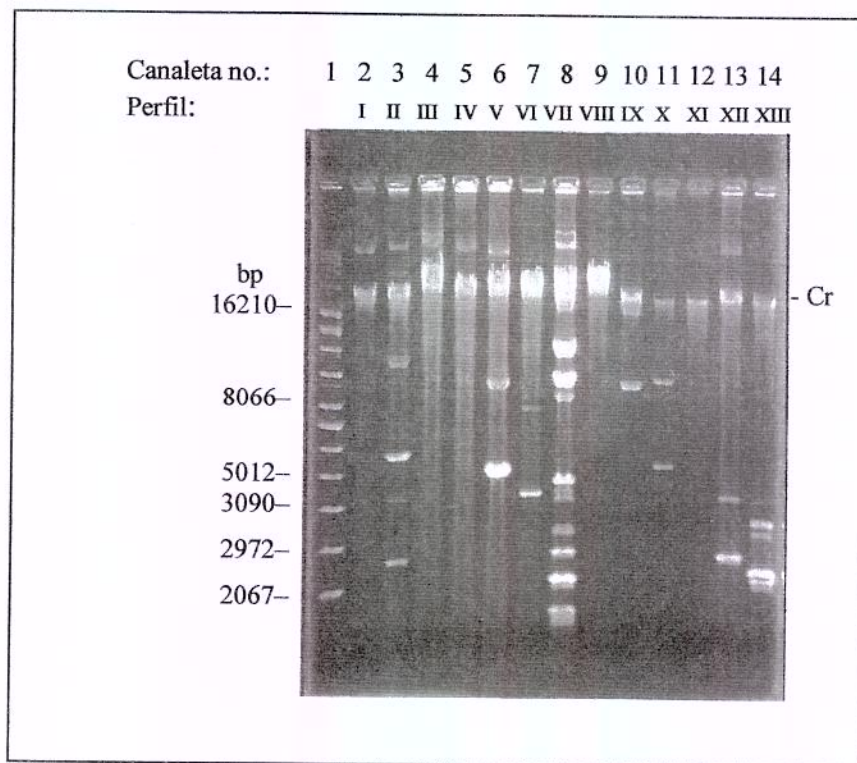


FIGURA 5: Eletroforese em gel de agarose (0,7% em TBE 1X) demonstrando os perfis de DNA plasmidial das cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de pacientes de várias especialidades médicas internados no Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1998. Condições de corrida: 60 v, durante 6 horas. Cr, DNA cromossômico.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (Supercoiled DNA Ladder; GibcoBRL);

Canaleta 2: *E. cloacae* isolado em 1995 de hemocultura de paciente da Dermatologia (paciente 3325), perfil I;

Canaleta 3: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 146), perfil II;

Canaleta 4: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Pediatria (paciente 99), perfil III;

- Canaleta 5: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 1410), perfil IV;
- Canaleta 6: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 1897), perfil V;
- Canaleta 7: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Nefrologia (paciente 1917), perfil VI;
- Canaleta 8: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Neonatologia (paciente 73), perfil VII;
- Canaleta 9: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Traumatologia (paciente 2006), perfil VIII;
- Canaleta 10: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Gastrocirurgia (paciente 3782), perfil IX;
- Canaleta 11: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Emergência Clínica (paciente 3904), perfil X;
- Canaleta 12: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente das Moléstias Infecciosas (paciente 4909), perfil XI;
- Canaleta 13: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Pediatria (paciente 5199), perfil XII;
- Canaleta 14: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Enfermaria Geral de Adultos (paciente 5633), perfil XIII.

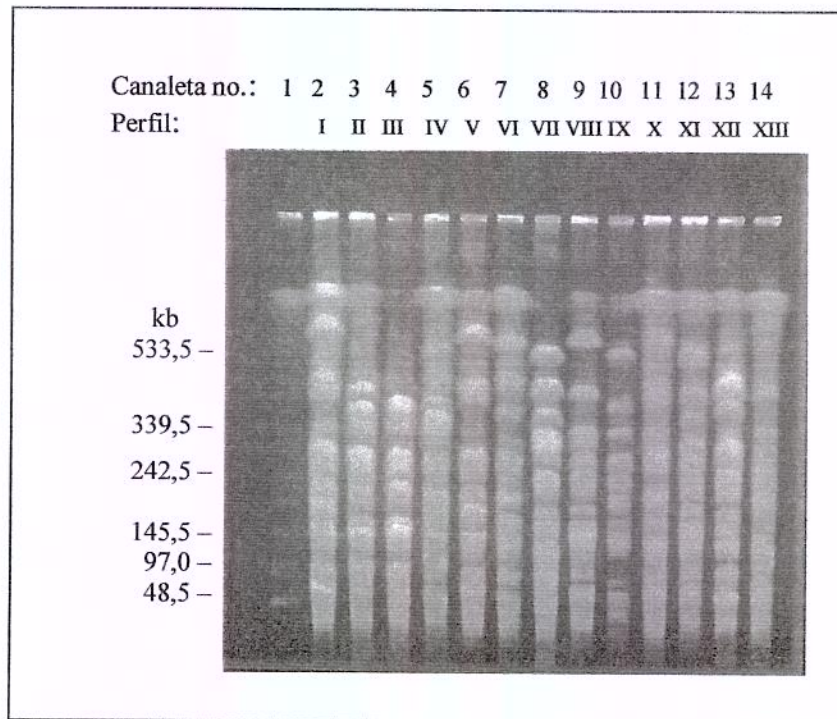


FIGURA 6: Perfis de DNA cromossômico de cepas de *E. cloacae* isoladas de pacientes de várias especialidades médicas internados no Hospital das Clínicas/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1998. Após a digestão do DNA cromossômico com enzima de restrição *SpeI*, seguiu-se à eletroforese (gel de agarose 1% em TBE 0,5X) em campo pulsátil. Condições de corrida: 6 volts/cm; tempo inicial: 5 segundos; tempo final: 60 segundos; 14 °C durante 18 horas.

Canaleta 1: marcador de peso molecular (λ *Ladder*; BioRad);

Canaleta 2: *E. cloacae* isolado em 1995 de hemocultura de paciente da Dermatologia (paciente 3325), perfil I;

Canaleta 3: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 146), perfil II;

Canaleta 4: *E. cloacae* isolado em 1996 de hemocultura de paciente da Pediatria (paciente 99), perfil III;

- Canaleta 5: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 1410), perfil IV;
- Canaleta 6: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Hematologia (paciente 1897), perfil V;
- Canaleta 7: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Nefrologia (paciente 1917), perfil VI;
- Canaleta 8: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Neonatologia (paciente 73), perfil VII;
- Canaleta 9: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Traumatologia (paciente 2006), perfil VIII;
- Canaleta 10: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Gastrocirurgia (paciente 3782), perfil IX;
- Canaleta 11: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Emergência Clínica (paciente 3904), perfil X;
- Canaleta 12: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente das Moléstias Infecciosas (paciente 4909), perfil XI;
- Canaleta 13: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Pediatria (paciente 5199), perfil XII;
- Canaleta 14: *E. cloacae* isolado em 1998 de hemocultura de paciente da Enfermaria Geral de Adultos (paciente 5633), perfil XIII.

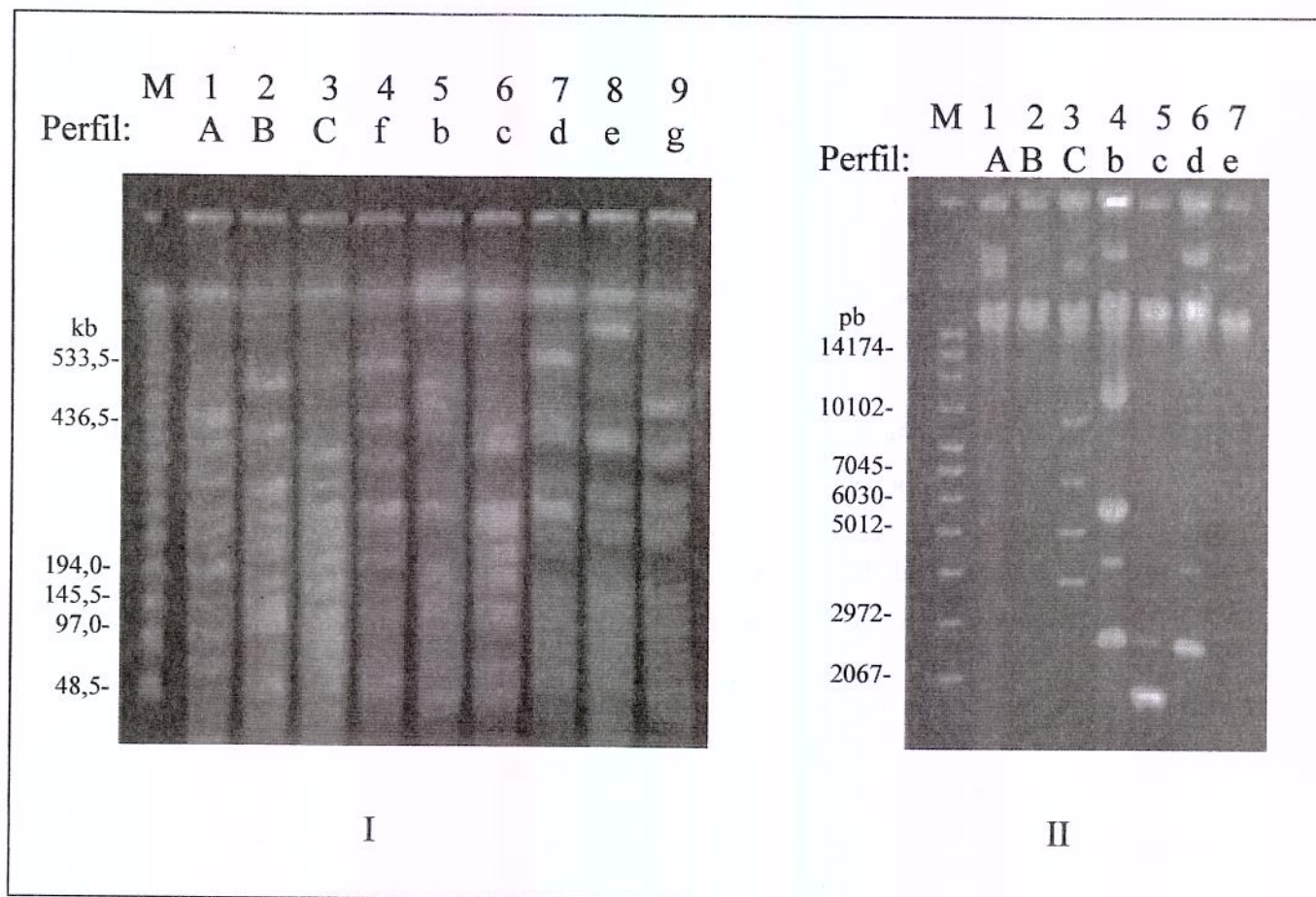


FIGURA 7: Diferentes padrões de banda obtidos pela PFGE (I) e eletroforese convencional (II) para *E. cloacae* isolados de hemoculturas dos recém-nascidos internados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997; *M*, padrão de peso molecular.

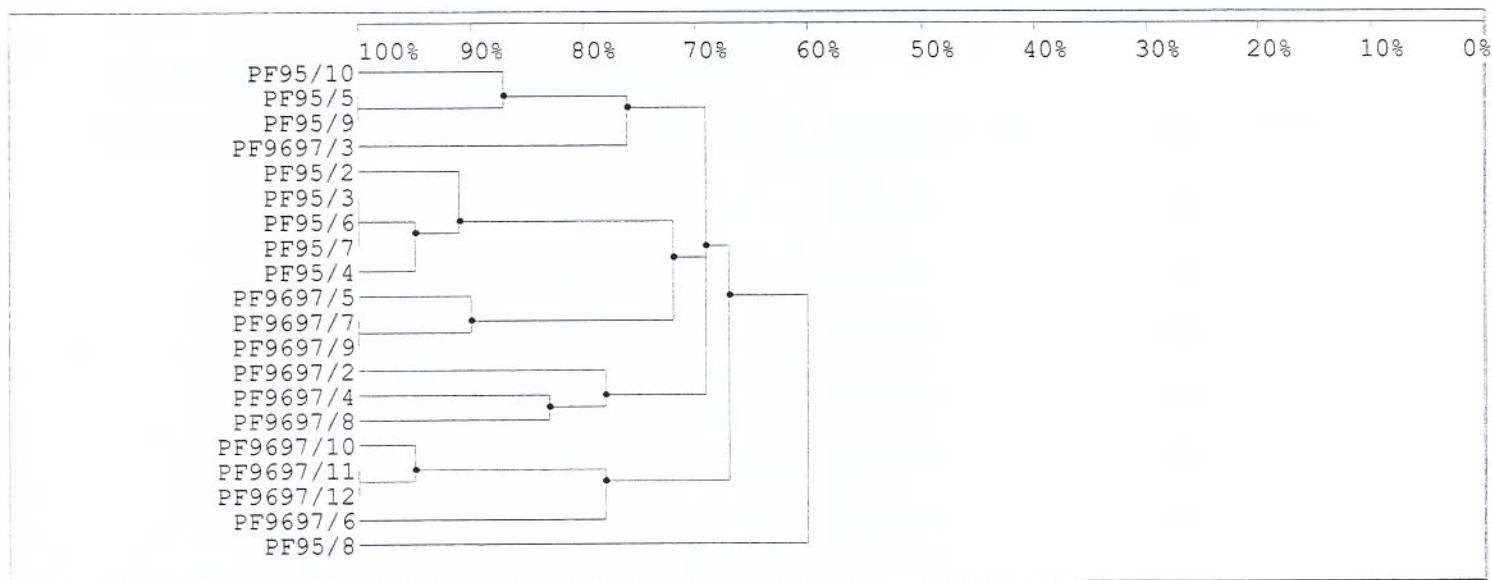


FIGURA 8: Dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice ilustrando a relação das cepas de *E. cloacae* obtidas de hemoculturas de recém-nascidos hospitalizados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Tabela 2: Perfis do DNA genômico caracterizados pela análise plasmidial (por eletroforese convencional) e pela análise do DNA cromossômico (pela PFGE) dos isolados de *E. cloacae* obtidos de recém-nascidos envolvidos no presente estudo.

Número do isolado	Data do isolamento	Perfil	
		Análise plasmidial	PFGE
163	13/06/1995	A	A
164	13/06/1995	A	A
165	13/06/1995	A	A
168	13/06/1995	A	A
167	13/06/1995	B	B
175	14/06/1995	B	B
171	14/06/1995	A	A
173	14/06/1995	C	C
245	12/08/1995	B	B
*155	*10/01/1996	*b	*a
2685	12/12/1996	-	b
2691	13/12/1996	-	f
2692	13/12/1996	c	c
2694	13/12/1996	c	c
2695	13/12/1996	-	d
2698	14/12/1996	c	c
2701	14/12/1996	d	e
67	22/03/1997	e	g
68	23/03/1997	e	g
72	23/03/1997	e	g

Legenda: *, cepa controle; -, ausência de plasmídio.

4.2. ESTUDO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À MORTE EM RECÉM-NASCIDOS COM INFECÇÃO SISTÊMICA POR *E. CLOACAE*

Até 1999 as informações referentes aos óbitos ocorridos no CAISM/UNICAMP eram armazenadas no sistema eletrônico CPA e os prontuários utilizados eram então mantidos em conjunto com os demais do período, sem seqüência de arquivamento, em um espaço físico distante das instalações do SAME. Porém, o sistema eletrônico apresentou problemas técnicos e todas as informações até então armazenadas foram perdidas. A busca dos prontuários de pacientes pertencentes a este conjunto foi inviabilizada devido à grande soma de material mantido sem nenhuma ordem para consulta. Durante o período da coleta de dados, a equipe do SAME tinha em vista a utilização de outro sistema (Sistema de Arquivo Comum) para reiniciar o registro de todo o acervo perdido pelo antigo sistema utilizado. Assim, a coleta dos dados foi obtida através da consulta em relatórios de vigilância epidemiológica em infecção hospitalar realizados pela comissão de controle de infecção hospitalar da unidade, no sistema de registro e estatística perinatal da Neonatologia e no banco de dados do LEM. As informações dos pacientes, bem como a descrição dos casos-clínicos em prontuários e fichas localizados, não estavam totalmente descritos em grande parcela do material utilizado.

Durante o período, no setor de Neonatologia, foram hospitalizados 2413 recém-nascidos e destes, 53 (2,19 por 100 neonatos) desenvolveram infecção sangüínea por *E. cloacae*. Os dados que ilustram o número de pacientes da Neonatologia com infecção hospitalar, durante os anos de 1995, 1996 e 1997, encontram-se descritos na Tabela 3. O Gráfico 2 ilustra o coeficiente de pacientes com infecção hospitalar mensal, observado no setor de Neonatologia, durante os anos de 1995, 1996 e 1997.

Dos 53 pacientes, 18 (33,96%) foram a óbito e 30 (56,60%) tiveram alta hospitalar. Os dados de 5 pacientes não estavam devidamente descritos e por isso, não houve possibilidade de utilização. As características dos neonatos com infecção sistêmica por *E. cloacae*, internados no CAISM/UNICAMP, segundo sexo, idade gestacional e tamanho, encontram-se na Tabela 4.

Para o estudo dos fatores de risco associados à morte, foram utilizadas as informações de 42 pacientes, para os quais havia dados substanciais disponíveis. A análise univariada, em nosso estudo, apontou a flebotomia como um fator de risco significativo para a morte entre os neonatos com infecção sistêmica causada pelo *E. cloacae* ($P=0,016$). Não foram estatisticamente significantes as variáveis sexo, idade gestacional e tamanho dos neonatos. Os dados referentes aos fatores de risco associados à infecção hospitalar, aos quais os recém-nascidos foram expostos, encontram-se descritos na Tabela 5 e os resultados da análise univariada, para os procedimentos invasivos, estão dispostos na Tabela 6.

Dos 18 óbitos ocorridos, 13 (72,22%) foram causados pela infecção hospitalar; 3 mortes (16,67%) foram atribuídas a causas relacionadas a complicações respiratórias, hemorragia cerebral e hidrocefalia congênita (causas não relacionadas à infecção hospitalar). A causa do óbito em 2 pacientes não foi localizada. Considerando ainda os paciente que foram a óbito devido à infecção sistêmica pelo *E. cloacae* e o número total de pacientes com infecção sistêmica pelo *E. cloacae*, a letalidade foi de 24,53%. A mortalidade proporcional por infecção nosocomial sistêmica pelo *E. cloacae* foi de 6,53%. O coeficiente geral de mortalidade durante o período de estudo foi de 8,25%.

Idade Gestacional

Dentre os 13 óbitos causados pela infecção hospitalar, 11 eram de pacientes tidos como RNPT e 1 era de paciente RNT (dado não disponível para 1 paciente). Todos os 3 pacientes, cuja causa do óbito não havia sido causada pela infecção hospitalar, eram neonatos tidos como RNPT.

Para os 30 pacientes que obtiveram alta hospitalar, 24 eram recém-nascidos classificados como RNPT e 6 eram neonatos considerados RNT.

Tamanho

Considerando o tamanho dos neonatos, dentre os 13 óbitos causados pela infecção hospitalar, 9 eram de pacientes classificados como PIG e 3 eram de pacientes tidos como AIG (dado não disponível para 1 paciente).

Para os 3 óbitos não causados pela infecção hospitalar, 2 eram de pacientes considerados PIG e 1 era de paciente considerado AIG.

Para os 30 pacientes que obtiveram alta hospitalar, 16 eram pacientes tidos como PIG; 13 eram pacientes classificados como AIG e apenas 1 paciente pertencia ao grupo dos GIG.

As medianas do peso ao nascimento e do número de dias de internação dos pacientes foram de 1165 g +/- 738 DP (620-4320 g; N=52) e 35 dias +/- 38,61 DP (4-202 dias; N=49), respectivamente.

A mediana do número de dias de internação, desde a admissão do paciente até o isolamento de *E. cloacae*, foi de 8 dias +/- 14,59 DP (2-69 dias; N=52);

A mediana do número de dias de internação, desde o isolamento de *E. cloacae* até a saída do paciente foi de 23 dias +/- 34,08 DP (1-165 dias; N=48).

Para o número de antimicrobianos utilizados e para o número de dias sob terapia antimicrobiana, as medianas foram, respectivamente, 3 antibióticos +/- 1,90 DP (2-9 antibióticos; N=41) e 16 dias +/- 23,10 DP (1-114 dias; N=41).

Os perfis de resistência a diversos antibióticos, avaliados pelo teste de difusão de discos, encontram-se na Tabela 7. Dos 53 pacientes com infecção sistêmica pelo *E. cloacae*, foi possível encontrar os resultados do teste de sensibilidade a antibióticos de 27 pacientes (50,94%). Destes pacientes, foram isoladas 17 (62,96%) cepas multirresistentes, sendo 16 (94,12%) resistentes à gentamicina, 11 (64,71%) resistentes à netilmicina e à tobramicina, 9 (52,94%) resistentes à amicacina, 4 (23,53%) resistentes à ceftazidima e 3 (17,65%) resistentes à ceftriaxona e à cefotaxima.

Relatórios emitidos no período informam que durante o surto ocorrido no mês de junho de 1995 foram colhidas culturas de todas as medicações em uso na unidade, de amostras de diversas partes da sala de preparo das nutrições parenterais prolongadas e de suas respectivas contra-provas, observando desenvolvimento de *E. cloacae* apenas nestas últimas. Os resultados das investigações apontaram, como a causa do surto, a nutrição parenteral prolongada, contaminada durante o seu preparo (TRESOLDI et al., 2000).

Os dados que ilustram o número total de pacientes internados e que foram a óbito, no setor de Neonatologia, durante os anos de 1995, 1996 e 1997 encontram-se disponíveis nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 3: Número de pacientes da Neonatologia com infecção hospitalar

Mês	Ano			Total
	1995	1996	1997	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Janeiro	12(8,63)	12(9,76)	14(10,52)	38(9,62)
Fevereiro	9(6,47)	10(8,13)	8(6,01)	27(6,83)
Março	*	12(9,76)	13(9,77)	25(6,33)
Abril	16(11,51)	10(8,13)	15(11,28)	41(10,38)
Maio	10(7,19)	10(8,13)	14(10,53)	34(8,61)
Junho	19(13,67)	14(11,38)	9(6,77)	42(10,63)
Julho	7(5,04)	8(6,50)	10(7,52)	25(6,33)
Agosto	15(10,79)	8(6,50)	9(6,77)	32(8,10)
Setembro	12(8,63)	14(11,38)	11(8,27)	37(9,37)
Outubro	17(12,23)	6(4,88)	11(8,27)	34(8,61)
Novembro	14(10,07)	12(9,76)	11(8,27)	37(9,37)
Dezembro	8(5,77)	7(5,69)	8(6,02)	23(5,82)
Total	139(100,00)	123(100,00)	133(100,00)	395(100,00)

Legenda: *, dado não informado.

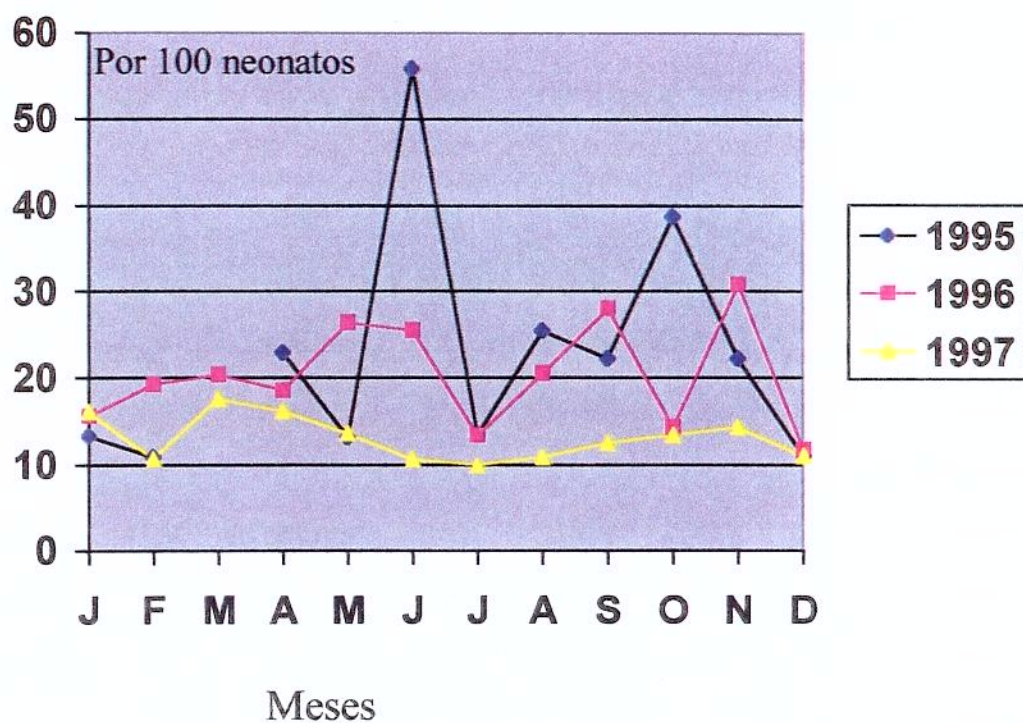


Gráfico 2: Coeficiente de pacientes com infecção hospitalar no setor de Neonatologia do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Tabela 4: Características dos neonatos com infecção sistêmica por *E. cloacae*, internados no CAISM/UNICAMP, segundo sexo, idade gestacional e tamanho.

	Óbito		Alta		Total		Valor de <i>P</i>
Sexo	N	%	N	%	N	%	0,82
M	11	(61,11)	18	(60,00)	29	(60,42)	
F	7	(38,89)	12	(40,00)	19	(39,58)	
Total	18	(100,00)	30	(100,00)	*48	(100,00)	
Idade gestacional							0,24
RNPT	14	(93,33)	24	(80,00)	38	(84,44)	
RNT	1	(6,67)	6	(20,00)	7	(15,56)	
Total	15	(100,00)	30	(100,00)	**45	(100,00)	
Tamanho							0,33
PIG	11	(73,33)	16	(53,33)	27	(60,00)	
AIG e GIG	4	(26,67)	14	(46,67)	18	(40,00)	
Total	15	(100,00)	30	(100,00)	**45	(100,00)	

Legenda: M, masculino; F, feminino; RNPT, recém-nascido pré-termo; RNT, recém-nascido a termo; PIG, pequeno para idade gestacional; AIG, adequado para a idade gestacional; GIG, grande para a idade gestacional; *, dado não disponível para 5 pacientes; **, dado não disponível para 8 pacientes.

Tabela 5: Características dos recém-nascidos, segundo a exposição a procedimentos invasivos.

Procedimento	No. total de pacientes	No. de pacientes expostos	
		Alta (%)	Óbito (%)
Cateter venoso ou arterial	42	13(30,95)	10(23,81)
Flebotomia	42	5(11,90)	9(21,43)
Hemoterapia	42	10(23,81)	3(7,14)
Nutrição parenteral prolongada	42	25(59,52)	13(30,95)
Respirador	42	16(38,09)	13(30,95)
Sonda para alimentação enteral	42	24(57,14)	10(23,81)
Sonda traqueal	42	12(28,57)	7(16,66)

Tabela 6: Variáveis associadas à morte em 42 neonatos com infecção sistêmica por *E. cloacae*, pela análise univariada

Procedimento invasivo	*Óbitos	*Altas	Odds ratio (IC: 95%)	Valor de <i>P</i>
	N(%)	N(%)		
Cateter venoso ou arterial	10(66,67)	13(48,15)	2,15(0,49<OR<9,88)	0,40
Flebotomia	9(60,00)	5(18,52)	6,60(1,32<OR<35,90)	0,016
Hemoterapia	3(20,00)	10(37,04)	0,43(0,07<OR<2,25)	0,21
Intubação nasogástrica	10(66,67)	24(88,89)	0,25(0,04<OR<1,55)	0,09
Nutrição parenteral	13(86,67)	25(92,59)	0,52(0,04<OR<6,02)	0,45
Sonda traqueal	7(46,67)	12(44,44)	1,09(0,26<OR<4,67)	0,85
Ventilação mecânica	13(86,67)	16(59,26)	4,47(0,71<OR<35,46)	0,06
Uso de antibióticos	13(86,67)	26(96,30)	4,00(0,25<OR<123,73)	0,59

Legenda: *, os dados de óbito e alta referem-se, respectivamente, a 15 pacientes e a 27 pacientes.

Tabela 7: Teste de sensibilidade aos antibióticos, por difusão de discos, das cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas de recém-nascidos internados na UTI-Neonatal do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Antibiótico testado	Ano					
	1995		1996		1997	
	T	R(%)	T	R(%)	T	R(%)
Amicacina	9	7(77,78)	9	0(0)	8	2(25,00)
Ampicilina	7	7(100,00)	9	8(88,89)	7	7(100,00)
Carbenicilina	6	6(100,00)	9	7(77,78)	-	-
Ceftazidima	7	2(28,57)	9	1(11,11)	8	1(12,5)
Ciprofloxacina	9	0 (0)	9	0(0)	8	0(0)
Cloranfenicol	7	3(42,86)	8	0(0)	-	-
Ceftriaxona	9	2(22,22)	9	1(11,11)	7	0(0)
Cefotaxima	10	2(20,00)	9	1(11,11)	-	-
Gentamicina	10	10(100,00)	9	1(11,11)	8	5(62,5)
Imipenem	9	0(0)	9	0(0)	8	0(0)
Netilmicina	9	9(100,00)	9	0(0)	8	2(25,00)
Ofloxacina	9	0(0)	8	0(0)	7	0(0)
Sulfazotrim	7	2(28,57)	9	0(0)	8	0(0)
Ticarcilina	9	2(22,22)	8	1(12,5)	-	-
Aztreonam	-	-	7	1(14,28)	-	-
Tetraciclina	-	-	9	1(11,11)	-	-
Tobramicina	10	10 (100,00)	9	1(11,11)	-	-
Ceftazidima	-	-	-	-	5	5(100,00)
Perfloxacina	-	-	-	-	6	0(0)

Legenda: T, número de cepas testadas; R, número de cepas resistentes, %, porcentagem de cepas resistentes.

Tabela 8: Número de pacientes da Neonatologia internados no CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Mês	Ano			Total
	1995	1996	1997	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Janeiro	90(11,74)	77(12,32)	87(8,52)	254(10,53)
Fevereiro	83(10,82)	52(8,32)	75(7,35)	210(8,70)
Março	69(9,00)	59(9,44)	74(7,25)	202(8,37)
Abril	70(9,12)	54(8,64)	93(9,11)	217(8,99)
Maiο	76(9,91)	38(6,08)	103(10,08)	217(8,99)
Junho	34(4,43)	55(8,80)	85(8,33)	174(7,21)
Julho	52(6,78)	60(9,60)	101(9,89)	213(8,83)
Agosto	59(7,69)	39(6,24)	83(8,13)	181(7,50)
Setembro	54(7,04)	50(8,00)	88(8,62)	192(7,96)
Outubro	44(5,74)	42(6,72)	82(8,03)	168(6,96)
Novembro	63(8,21)	39(6,24)	77(7,54)	179(7,42)
Dezembro	73(9,52)	60(9,60)	73(7,15)	206(8,54)
Total	767(100,00)	625(100,00)	1021(100,00)	2413(100,00)

Tabela 9: Número de óbitos ocorridos na Neonatologia do CAISM/UNICAMP, nos anos de 1995, 1996 e 1997.

Mês	Ano			Total
	1995	1996	1997	
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Janeiro	9(14,06)	5(7,57)	6(8,70)	20(10,05)
Fevereiro	4(6,25)	8(12,12)	7(10,14)	19(9,54)
Março	2(3,13)	8(12,12)	3(4,34)	13(6,53)
Abril	5(7,81)	10(15,15)	4(5,80)	19(9,55)
Maiο	5(7,81)	3(4,55)	5(7,24)	13(6,53)
Junho	8(12,5)	9(13,63)	6(8,70)	23(11,56)
Julho	4(6,25)	5(7,58)	6(8,70)	15(7,54)
Agosto	3(4,69)	3(4,55)	4(5,80)	10(5,03)
Setembro	2(3,13)	2(3,03)	11(15,94)	15(7,54)
Outubro	6(9,37)	3(4,55)	7(10,14)	16(8,04)
Novembro	8(12,5)	6(9,09)	6(8,70)	20(10,05)
Dezembro	8(12,5)	4(6,06)	4(5,80)	16(8,04)
Total	64(100,00)	66(100,00)	69(100,00)	199(100,00)



5. DISCUSSÃO

Durante a década passada, os progressos da terapia intensiva contribuíram marcadamente para tornar possível a sobrevivência de neonatos criticamente doentes que, seguramente, não sobreviveriam em épocas mais remotas. Entretanto, o cuidado intensivo não permaneceu isento de riscos e a infecção nosocomial tem sido reconhecida como um dos maiores problemas nestas unidades. Muitas unidades neonatais de terapia intensiva têm vivido experiências traumáticas com surtos de infecção nosocomial causados por bacilos gram-negativos. Uma variedade de fatores contribui para esta alarmante taxa de infecção, incluindo a superlotação, a dinâmica da unidade, os diagnósticos invasivos, os procedimentos terapêuticos, a imaturidade imunológica e o baixo peso dos recém-nascidos. Deve-se destacar, no entanto, que as infecções nosocomiais são muitas vezes inevitáveis, concomitantes às medidas agressivas necessárias para a manutenção da vida dos pacientes criticamente doentes, freqüentemente prematuros (GOLDMANN et al., 1981).

Antes de 1960 as maiores epidemias nosocomiais eram causadas por *Staphylococcus aureus* e pelos estreptococos do grupo A. Nas décadas de 1960 e 1970 os patógenos epidêmicos mais importantes, constatados nos Estados Unidos, foram os bacilos gram-negativos. Na década de 1980 a maior causa de bacteremia neonatal foi atribuída aos cocos gram-positivos, especificamente o *Staphylococcus aureus* e os *Staphylococcus coagulase-negativa*, que causam bacteremia em pacientes mais expostos aos procedimentos invasivos. A disseminação de microrganismos pelas mãos dos profissionais da saúde constitui a rota mais comum de transmissão de agentes infecciosos, documentada em epidemias causadas por bactérias ou por vírus. As soluções contaminadas são também fontes potenciais para a infecção nosocomial. Dados da literatura destacam surtos em diversas enfermarias causados por soluções salinas, por soluções de hexaclorofeno, por desinfetantes e por soluções endovenosas contaminadas (DONOWITZ, 1989; TRESOLDI et al., 2000).

Os neonatos admitidos nas unidades de terapia intensiva são colonizados por microrganismos presentes no hospital e apresentam chance maior de adquirir microrganismos resistentes aos antimicrobianos e ainda, de adquirir como microbiota predominante, outras bactérias gram-negativas que não a *Escherichia coli*. Independente do peso ao nascimento, do tipo de parto, do tipo de alimentação e da unidade hospitalar no

momento da admissão, o neonato é colonizado e estabelece sua microbiota normal dentro de semanas após seu nascimento. Uma vez estabelecida a microbiota normal, ela constantemente se desenvolve em resposta às influências de uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos (JARVIS, 1996).

As espécies do gênero *Enterobacter* têm emergido, em anos recentes, como importantes agentes gram-negativos causadores de bacteremia nosocomial, atingindo da terceira a quinta posição em frequência (CHOW et al., 1991). Pelos dados obtidos no presente trabalho, observou-se que o coeficiente de pacientes com infecção hospitalar foi mais pronunciado no ano de 1996 (19,68%), tendo-se reduzido no ano de 1997 (13,03%). Porém, no ano de 1995 chamaram a atenção os elevados coeficientes de pacientes com infecção hospitalar nos meses de junho (55,88%) e outubro (38,64%), como ilustrado no Gráfico 2. As infecções em corrente sanguínea causadas, pelo *E. cloacae*, trazem grande impacto em um ambiente hospitalar, especialmente quando acometem pacientes pertencentes a grupos de risco como os neonatos.

Muitos neonatos ao serem admitidos em unidade de terapia intensiva recebem terapia profilática com antibióticos de amplo espectro. Esta abordagem empírica, algumas vezes necessária, carrega os riscos de alterar a microbiota protetora normal, permitindo, com isso, que cepas de bactérias antibiótico-resistentes colonizem e infectem esses pacientes (DONOWITZ, 1989).

A análise epidemiológica de patógenos nosocomiais é um assunto de grande interesse clínico. Em anos recentes, as técnicas moleculares receberam atenção como uma forma de analisar as relações epidemiológicas, promovendo o uso do termo epidemiologia molecular (GOERING, 1993).

O objetivo de um estudo de tipagem de isolados microbiológicos clínicos é fornecer evidências laboratoriais de que estes isolados epidemiologicamente relacionados, coletados durante um determinado período, sejam também geneticamente relacionados e assim, representam a mesma cepa (TENOVER, 1995).

Os métodos fenotípicos utilizados para a tipagem do *E. cloacae*, incluindo a biotipagem, a análise do antibiograma, a sensibilidade ou a produção de bacteriocinas, a sorotipagem e a fagotipagem não são sensíveis o suficiente para a distinção de cepas não relacionadas epidemiologicamente ou são afetados por fatores fisiológicos e por isso, foram substituídos pelos métodos genotípicos como a análise plasmidial ou a análise do DNA cromossômico (HAERTL et al., 1993; Van NIEROP et al., 1998).

Em um estudo multicêntrico, envolvendo bacteremias causadas por *Enterobacter*, a análise plasmidial foi aplicada em mais de 100 isolados. Os plasmídios foram observados em 70% dos casos e destes, 28% continham somente um único plasmídio (CHOW et al., 1994).

No presente estudo a análise plasmidial revelou 6 perfis plasmidiais para os 19 isolados de *E. cloacae*, tendo cada ano um perfil distinto, demonstrando que os surtos ocorridos foram causados por cepas diferentes. Três isolados não continham plasmídios, o que ilustra uma das limitações do método. O emprego da análise plasmidial merece certas considerações pois os plasmídios podem disseminar-se de uma bactéria para outra e o encontro de cepas contendo o mesmo perfil plasmidial pode significar que o plasmídio tem o caráter epidêmico e não a cepa bacteriana (FARRAR, 1983). Ademais, a cepa epidêmica pode não conter plasmídios ou cepas não relacionadas podem apresentar o mesmo plasmídio. Devemos considerar também o fato de que plasmídios estão sujeitos a rearranjos estruturais e por serem elementos extra-cromossômicos, a bactéria pode perder ou ganhar plasmídios não relacionados ao surto (WACHSMUTH, 1986). No presente trabalho, a análise plasmidial apresentou boa reprodutibilidade, demonstrando bom poder discriminatório, de tipabilidade, satisfatória facilidade de realização e interpretação. Apesar das considerações realizadas, a análise plasmidial é ainda um método de tipagem molecular aplicável, particularmente para o *E. cloacae* e especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde os recursos são limitados.

A PFGE, desenvolvida em 1984 por Schwartz e Cantor, é uma variação da eletroforese convencional em gel de agarose. Este método constitui uma poderosa ferramenta para a tipagem de numerosos microrganismos. A orientação do campo elétrico é alterada (ou pulsada) periodicamente. As moléculas de DNA respondem reorientando-se

continuamente mudando a direção de migração através do gel de agarose (GOERING, 1993). Em geral, a PFGE é uma das técnicas de tipagem de maior poder discriminatório e uma das mais reprodutíveis e tem sido o método de escolha para muitas espécies (TENOVER, 1997), em especial o *E. cloacae* (MASLOW e cols., 1996).

A análise do DNA cromossômico, pela PFGE, dos 19 isolados de *E. cloacae* obtidos de 1995 a 1997 revelou 9 perfis de DNA cromossômico. Cada ano apresentou perfis distintos, confirmando os dados obtidos pela análise plasmidial e demonstrando também que os surtos ocorridos em cada ano foram causados por cepas diferentes de *E. cloacae*. A análise comparativa das cepas de *E. cloacae* está representada no dendrograma construído com base no coeficiente de similaridade de Dice (Figura 8).

O grau de discriminação fornecido pela tipagem do DNA de bactérias depende da divergência genética evolucionária surgida de mutações não letais, aquisição ou deleção de fragmentos de DNA durante os anos (HARTSTEIN, 1995). A habilidade dos métodos de tipagem molecular em distinguir isolados epidemiologicamente não relacionados é reflexo da variação genética observada no DNA cromossômico das espécies bacterianas. Geralmente esta variabilidade é alta e a diferenciação das cepas não relacionadas pode ser observada utilizando-se técnicas apropriadas. No entanto, freqüentemente os fatores que permitem que uma bactéria cause infecção não estão uniformemente distribuídos em uma espécie. Assim, os microrganismos mais comumente associados às infecções nosocomiais constituem um subgrupo menor das muitas cepas que constituem a espécie. Como consequência, este subgrupo pode exibir pouca diversidade genética e ser difícil distinguir as cepas, mesmo com as mais recentes técnicas moleculares (TENOVER, 1997).

A análise do DNA cromossômico, pela PFGE, demonstrou melhor tipabilidade quando comparada à análise plasmidial, pois todas as amostras foram passíveis de tipagem. O método demonstrou também melhor poder discriminatório, moderada facilidade de interpretação e moderada facilidade de realização.

No presente trabalho, 14 cepas tidas como cepas-controle foram utilizadas para a avaliação do poder discriminatório dos métodos moleculares aplicados. Ambas as técnicas foram capazes de demonstrar a existência de uma policlonalidade das cepas. Esta

capacidade em produzir 14 diferentes perfis para as cepas de *E. cloacae* isoladas de diferentes pacientes hospitalizados no Hospital de Clínicas da UNICAMP e selecionados ao acaso, faz com que realmente acreditemos no poder discriminatório das técnicas moleculares utilizadas, o que, por sua vez, torna nossas afirmações sobre as categorias de relação genética e epidemiológica seguras e confiáveis para as cepas do período de estudo.

As fontes de infecção para o recém-nascido no seu imediato período neonatal são múltiplas (JARVIS, 1996). Os microrganismos considerados colonizadores normais, podem ser potencialmente prejudiciais a estes pacientes com o sistema imunológico imaturo e assim, os esforços para o controle das infecções são necessários nestas enfermarias. Em duas situações (1996 e 1997) os pequenos surtos por *E. cloacae*, ocorridos na Neonatologia do CAISM/UNICAMP não foram detectados pela equipe de controle de infecção hospitalar. Somente o surto ocorrido em 1995 foi notificado, talvez pelo impacto da taxa de ataque e da elevada letalidade (TRESOLDI et al., 2000).

Em hospitais, uma variedade de procedimentos terapêuticos, como por exemplo, a instalação de cateteres, freqüentemente serve como fonte de infecção (MAKI, 1976; ARCHIBALDI, 1998). Outros fatores, incluindo as práticas insatisfatórias de infusão e a contaminação de soluções de eletrólitos, como dextrose ou nutrição parenteral total têm sido associados com infecção nosocomial em corrente sangüínea (ARCHIBALD, 1998; TRESOLDI et al., 2000). Além disso, a eficácia diminuída de alguns agentes antimicrobianos, em virtude da emergência de bactérias resistentes, torna complexos os esforços para o controle de infecção (HOSPITAL INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE, 1995).

Os recém-nascidos, especialmente os prematuros, são considerados pacientes de alto risco para o desenvolvimento de infecção nosocomial em corrente sangüínea, seja logo após o nascimento ou durante o período de hospitalização (CORDERO, 1999). O recém-nascido pré-termo pode, ainda, apresentar associação com defeitos congênitos, o que aumenta o risco para a infecção nosocomial (DREWS, 1995).

Os dados obtidos no presente estudo apontaram que a maioria dos neonatos acometidos pela infecção sangüínea por *E. cloacae* nos anos de 1995, 1996 e 1997 eram pré-termos e pequenos para a idade gestacional e que o maior número de óbitos entre estes

pacientes ocorreu devido à infecção hospitalar (72,22%). Em nosso estudo, ainda, a mediana do peso dos neonatos ao nascimento foi de 1165g. Porém, pela análise univariada, o peso ao nascimento não foi estatisticamente significativo para a morte por infecção hospitalar em corrente sangüínea por *E. cloacae*.

Observando a gravidade das infecções sistêmicas por *E. cloacae* entre os neonatos tidos como pré-termo e pequeno para a idade gestacional, não podemos deixar de mencionar que apesar destas variáveis merecerem especial atenção, existem outros fatores, como as doenças de base (não avaliadas no presente estudo) que possivelmente contribuem para a alarmante situação das infecções sistêmicas por *E. cloacae*.

Dados da literatura destacam o uso da ventilação mecânica, a presença de cateter central e a intubação endotraqueal como importantes fatores que aumentam o risco para a sepse nosocomial (MORO, 1996; MULLETT, 1998). A intubação endotraqueal eleva o risco para as infecções nosocomiais em até sete vezes, sendo observada uma alta frequência de sintomas respiratórios. O risco associado à intubação endotraqueal pode ser atribuído principalmente à colonização por microrganismos hidrofílicos e ao trauma físico causado pela passagem do tubo endotraqueal. Ainda, dependendo do tipo de cânula do dispositivo utilizado (cânula traqueal, nasofaríngea, nasal) pode-se aumentar o risco da sepse de 4 a 16 vezes. Os cateteres intravasculares são reconhecidos como potentes fontes de infecção por serem facilmente colonizados por bactérias da pele ou por bactérias do trato gastrointestinal. Os cateteres umbilicais são, em particular, de alto risco para a infecção, considerando a exuberante microbiota do coto umbilical (MORO, 1996).

O uso de cateteres intravasculares para a nutrição parenteral total (NPT) representa um aumento do risco de sepse em aproximadamente 1,5 vezes (MORO, 1996). A administração de NPT, por sua vez, tornou-se um procedimento padrão na manutenção de pacientes criticamente doentes, tais como os neonatos de baixo peso ao nascimento, pacientes com anomalias congênitas gastrointestinais e também pacientes com diarreia intratável.

Durante o estudo epidemiológico, chamou-nos a atenção a elevada taxa de letalidade das infecções em corrente sangüínea por *E. cloacae* (24,53%), considerando que o coeficiente geral de mortalidade foi de 8,25% e a mortalidade proporcional foi de 6,53%.

Desse modo, foram estudados os possíveis fatores associados à morte neste grupo de pacientes. Na literatura consultada, mereceu destaque o trabalho de GOLDMANN e cols. (1983), que, ao estudarem a associação entre infecção nosocomial com a morte durante o período de hospitalização, encontraram que o baixo peso ao nascimento e o *ductus arteriosus* patente foram as variáveis mais fortemente associadas com a infecção nosocomial e que após a estratificação destas variáveis, houve uma associação persistente entre a infecção nosocomial e risco aumentado para a morte. No entanto, não foram encontrados dados de literatura relacionando os fatores de risco para a morte causada por infecção em corrente sanguínea para recém-nascidos e crianças. CHOW e cols. (1994), relataram, de forma genérica, a associação das bacteremias causadas por *Enterobacter* com uma elevada mortalidade (20% a 69%). Segundo estes autores, estas bacteremias tipicamente acometem pacientes hospitalizados há longo tempo, com alguma doença de base e que receberam agentes antimicrobianos antes de apresentarem a bacteremia. Observando os dados de letalidade para a população de recém-nascidos do presente estudo (24,53%), verifica-se que os dados são concondantes com a literatura consultada (ainda que, neste último caso, os dados se refiram a uma população de adultos).

De acordo com os dados obtidos podemos verificar que os neonatos foram expostos a diversos fatores considerados de risco para a infecção hospitalar, em especial a nutrição parenteral prolongada, o respirador, o soro basal e as sondas para alimentação enteral. Porém, a análise univariada, em nosso estudo, apontou somente a flebotomia como um fator de risco significativo para a morte entre os neonatos com infecção sistêmica causada pelo *E. cloacae*. Devemos considerar que a flebotomia constitui um procedimento invasivo freqüentemente utilizado em pacientes apresentando quadro clínico grave, e desta forma, a significância da flebotomia deve ser interpretada, considerando-se também a severidade da condição clínica do paciente. Não foram estatisticamente significantes as variáveis sexo, idade gestacional e tamanho dos neonatos. Dados de FOK e cols., envolvendo um estudo caso-controle para a avaliação dos fatores de risco para septicemia causada por *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes*, demonstraram que, pela análise multivariada, as variáveis independentes uso de nutrição parenteral e cateterização vesical foram os únicos fatores de risco para sepse (FOK et al., 1998). Em nosso estudo, 38 dos 42 neonatos receberam nutrição parenteral e esta variável não foi associada à morte

durante o período de estudo de 3 anos, porém, um surto com alta letalidade ocorreu na UTI-Neonatal no ano de 1995, causado pela nutrição parenteral contaminada com *E. cloacae*. Desta forma, torna-se importante o conhecimento dos fatores de risco presentes durante a manipulação de recém-nascidos, bem como o constante trabalho de vigilância.

A infecção neonatal é uma doença insidiosa. Os primeiros sinais da doença freqüentemente são inespecíficos, mas a progressão pode ser rápida. Por estas razões, o tratamento com antibióticos em neonatos com suspeita de infecção deve iniciar-se antes mesmo que os resultados microbiológicos estejam disponíveis (POILANE, 1993). Uma característica notável das bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* é a propensão em se tornarem resistentes durante a terapia com agentes beta lactâmicos. Quando espécies do gênero *Enterobacter* são isoladas do sangue, deve-se evitar a terapia com cefalosporinas de terceira geração, independente da susceptibilidade obtida *in vitro* (CHOW, 1991). Tanto as cefalosporina de segunda e terceira gerações são indutoras de atividade cefalosporinase nos gêneros *Pseudomonas*, *Serratia* e *Enterobacter* sendo esta atividade mediada pelo DNA cromossômico (MODI, 1987). Sugere-se a combinação de um outro agente beta-lactâmico e um aminoglicosídeo, considerando que, apesar da politerapia não prevenir a emergência da resistência, quando uma cepa de *Enterobacter* torna-se resistente durante a politerapia, esta bactéria torna-se resistente à apenas um dos agentes administrados, permanecendo sensível ao outro (CHOW, 1991). As cepas de *E. cloacae* são naturalmente resistentes à ampicilina e às cefalosporinas de primeira geração e o uso freqüente de antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro leva à seleção de cepas de *E. cloacae* multirresistentes (POILANE, 1993). A produção de beta-lactamases pode ser mediada tanto por plasmídios como pelo DNA cromossômico (MODI, 1987).

A alta prevalência de infecções hospitalares leva à necessidade do uso múltiplo de antimicrobianos (ZIMMER et al., 1986; STEADFAST et al., 1984). A emergência de bactérias resistentes entre microrganismos bacterianos comumente encontrados ou a seleção de espécies amplamente resistentes tem sido associada à falência do tratamento individual o que pode levar à ocorrência de surtos nestas unidades (CORDERO, 1999).

Pelos dados obtidos, nota-se a grande porcentagem de cepas resistentes aos aminoglicosídeos sendo que o perfil de resistência das cepas de *E. cloacae* isoladas no ano de 1995 foi mais pronunciado que nos anos de 1996 e 1997. A redução do número de cepas

resistentes refletiu o sucesso da instituição de medidas de controle de colonização e infecção por cepas multirresistentes (CALIL, 2001). As cepas mostraram-se resistentes à ampicilina e carbenicilina, como apontado por POILANE e cols. (1993).

Desta forma, a identificação dos procedimentos que constituem os maiores riscos para a sepse, em unidades de terapia intensiva, surge como ponto essencial para o estabelecimento bem sucedido de programas de controle de infecção hospitalar e de diretrizes que busquem a utilização racional de procedimentos invasivos e de antibióticos (MORO, 1996).



6. CONCLUSÕES

A análise plasmidial pela eletroforese convencional em gel de agarose e a análise do DNA cromossômico pela PFGE apresentaram poder discriminatório muito similar para as cepas de *E. cloacae* isoladas de hemoculturas dos recém-nascidos e para as cepas-controle;

A análise plasmidial demonstrou ser um método aplicável em estudo molecular envolvendo surtos causados por *E. cloacae*;

Houve disseminação nosocomial de cepas de *E. cloacae* entre os recém-nascidos hospitalizados no CAISM/UNICAMP;

As infecções sistêmicas causadas pelo *E. cloacae* na UTI-Neonatal ocorreram sob a forma de pequenos surtos muitas vezes não identificados e foram associados com uma alta letalidade;

Pela análise univariada, considerando diversos procedimentos invasivos, a flebotomia constituiu o fator de risco para morte entre os neonatos com infecção sistêmica por *E. cloacae*;



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOLET, D.; AHMET, Z.; HOUANG, E.; HURLEY, R.; KAUFMANN, M. E. – *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit: account of an outbreak and its relationship to use of third generation cephalosporins. **J. Hosp. Infect.**, **28**: 273-286, 1994.

ARBER, R. C.; MACKEL, D. C. – Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. **Am. J. Med.**, **70**: 901-905, 1981.

ARCHIBALD, L. K.; RAMOS, M.; ARDUINO, M. J.; AGUERO, S. M.; DESEDA, C.; BANERJEE, S.; JARVIS, W. R. – *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial bloodstream infections traced to extrinsic contamination of a dextrose multidose vial. **J. Pediatr.**, **133**: 640-644, 1998.

ARCHIBALD, L.; PHILLIPS, L.; MONNET, D.; MCGOWAN, J. E. Jr.; TENOVER, F.; GAYNES, R. – Antimicrobial resistance in isolates from patients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. **Clin. Infect. Dis.**, **24**: 211-215, 1997.

ARBEIT, R. D. – Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1995: 190-208.

BALLARD, J. L.; KHOURY, J. C.; WEDIG, K.; WANG, L.; EILERS-WALSMAN, B. L.; LIPP, R. – New Ballard score, expanded to include extremely premature infants. **J. Pediatr.**, **119**(3): 417-423, 1991.

BATTAGLIA, F.; LUBCHENCO, L. O. – A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. **J. Pediatr.**, **71**(2): 159-163, 1967.

BINGEN, E. – Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **15**: 488-493, 1994.

- BINGEN, E.; DENAMUR, E., LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; BRAHIMI, N.; EL LAKAMY, M.; ELION, J. – Rapid genotyping shows the absence of cross-contamination in *Enterobacter cloacae* nosocomial infections. **J. Hosp. Infect.**, **21**: 95-101, 1992.
- BURCHARD, K. W.; BARRAL, D. T.; REED, M.; SLOTMAN, G. J. – *Enterobacter* bacteremia in surgical patients. **Surgery**, **100**: 857-862, 1986.
- CALIL, R.; MARBA, S. T. M.; Von NOWAKONSKI, A.; TRESOLDI, A. T. – Reduction in colonization and nosocomial infection by multiresistant bacteria in a neonatal unit after institution of educational measures and restriction in the use of cephalosporins. **Am. J. Infect. Control**, **29**: 133-138, 2001.
- CAPURRO, H.; KONICHEZKY, S.; FONSECA, D.; CLADEYRO-BARCIA, R. – A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. **J. Pediatr.**, **93**(1): 120-122, 1978.
- CARLE, G. F.; FRANK, M.; OLSON, M. V. – Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, **232**: 65-68, 1986.
- CHODOFF, A.; PETTIS, A. M.; SCHOONMAKER, D.; SHELLY, M. A. – Polimicrobial gram-negative bacteremia associated with saline solution flush used with a needleless intravenous system. **Am. J. Infect. Control**, **23**: 357-363, 1995.
- CHOW, J. W.; FINE, M. J.; SHLAES, D. M.; QUINN, J. P.; HOOPER, D. C.; JOHNSON, M. P.; RAMPHAL, R.; WAGENER, M. M.; MIYASHIRO, D. K.; YU, V. L. – *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance therapy. **Ann. Intern. Med.**, **115**(8): 585-590, 1991.
- CHOW, J. W.; YU, V. L.; SHLAES, D. M. – Epidemiologic perspectives on *Enterobacter* for the infection control professional. **Am. J. Infect. Control.**, **22**: 195-201, 1994.
- CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. – Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric field. **Science**, **234**: 1582-1585, 1986.

CORDERO, L.; SANANES, M.; AYERS, L. W. – Bloodstream infections in a neonatal intensive-care unit: 12 years' experience with an antibiotic control program. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **20**: 242-246, 1999.

CRAVEN, D. E.; STEGER, K. A.; HIRSCHHORN, L. R. – Nosocomial colonization and infection in persons infected with human immunodeficiency virus. **Infect. Control hosp. Epidemiol.**, **17**: 304-318, 1996.

DALEY, C. L.; SMALL, P. M.; SCHECTER, G. F. – An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. Analysis using restriction-fragment length polymorphisms. **N. Engl. J. Med.**, **326**: 231-235, 1992.

DARINI, A. L. C.; MAGALHÃES, V. D.; LEVY, C. L.; BARTH, A. L.; COSCINA, A. L. – Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32(9)**: 1077-1081, 1999.

DE GHELDRE, Y.; MAES, N.; ROST, F.; De RYCK, R.; CLEVENBERGH, P.; VINCENT, J. L.; STRUELENS, M. J. – Molecular epidemiology of an outbreak of multi-drug resistant *Enterobacter aerogenes* infection and in vivo emergence of imipenem resistance. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 152-160, 1997.

DICE, L. R. – Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, **26(3)**: 297-302.

DOEBBELING, B. N.; HOLLIS, R.; ISENBERG, H. O.; WENZEL, R. P.; PFALLER, M. A. – Restriction fragmentation analysis of *Candida tropicalis* outbreak of sternal wound infections. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 1268-1270, 1991.

DONOWITZ, L. G. – Nosocomial infection in neonatal intensive care units. **Am J. Infect. Control**, **17**: 250-257, 1989.

DREWS, M.B.; LUDWIG, A. C.; LEITITIS, J. U.; DASCHNER, F. D. – Low birth weight and nosocomial infection of neonates in a neonatal intensive care unit. **J. Hosp. Infect.**, **30(1)**: 65-72, 1995.

EISENSTEIN, B. I. - New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. **J. Infect. Dis.**, **161**: 595-602, 1990 a.

EISENSTEIN, B. I. – The polymerase chain reaction: a new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **N. Engl. J. Med.**, **322**: 178-183, 1990 b.

EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. - An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 428-442, 1993.

FANG, F. C.; McCLELLAND, M.; GUINEY, D. G. et al. – Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. **JAMA**, **270**: 1323-1328, 1993.

FARBER, B. F.; BRENNEN C.; PUNTERERI, A. J. – A prospective study of nosocomial infections in a chronic care facility. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **32**: 499-502, 1984.

FARRAR, W. E. – Molecular analysis of plasmids in epidemiologic investigation. **J. Infect. Dis.**, **148**: 1-6, 1983.

FINNSTRÖM, O; ISAKSSON, B.; HæGGMAN, S.; BURMAN, L. G. – Control of an outbreak of a highly beta-lactam-resistant *Enterobacter cloacae* strain in a neonatal special care unit. **Acta Paediatr.**, **87**: 1070-1074, 1998.

FLYNN, D. M.; WEINSTEIN, R. A.; NATHAN, C.; GASTON, M. A.; KABINS, S. A. – Patients' endogenous flora as the source of "nosocomial" *Enterobacter* in cardiac surgery. **J. Infect. Dis.**, **156(2)**: 363-368, 1987.

FOK, T. F.; LEE, C. H.; WONG, E. M. C.; LYON, D. J.; WONG, W.; NG, P. C.; CHEUNG, K. L.; CHENG, A. F. B. – Risk factors for *Enterobacter* septicemia in a neonatal unit: case-control study. **Clin. Infect. Dis.**, **27**: 1204-1209, 1998.

FORATTINI, O. P. – **Ecologia, epidemiologia e sociedade**. São Paulo, Artes Médicas: Editora da Universidade de São Paulo, 1992. p. 369-398.

FORD-JONES, E. L.; MINDORFF, C. M.; LANGLEY, J. M. – Epidemiologic study of 4684 hospital-acquired infections in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **8**: 668-675, 1989.

FRANSON, T. R.; DUTHIE, E. H.; COOPER, J. E. – Prevalence survey of infection and their predisposing factors at a hospital-based nursing home care unit. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **34**: 95-100, 1986.

GARAIJAR, J.; KAUFMANN, M. E.; PITT, T. L. – Comparison of ribotyping with conventional methods for the type identification of *Enterobacter cloacae*. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 1303-1307, 1991.

GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G.; HORAN, T. C.; HUGHES, J. M. – CDC definitions for nosocomial infections. **Am. J. Infect. Control**, **16**: 128-140, 1988.

GASTON, M. A. – *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. **J. Hosp. Infect.**, **11**: 197-208, 1988.

GAYNES, R. P.; MARTONE, W. J.; CULVER, D. H.; EMORI, T. G.; HORAN, T. C.; BANERJEE, S.N. – Comparison of rates of nosocomial infections in neonatal intensive care units in the United States. **Am. J. Med.**, **31**: 192 S-196 S, 1991.

GAYNES, R. P.; EDWARDS, J. R.; JARVIS, W. R.; CULVER, D. H.; TOLSON, J. S.; MARTONE, W. J. and the National Nosocomial Infections Surveillance System. – Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the United States. **Pediatrics**, **98**(3): 357-361, 1996.

GETCHELL-WHITE, S. I.; DONOWITZ, L.G.; DIETER, H. M.; GRÖSCHEL, D. H. M. – The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **10**: 402-407, 1989.

- GLADSTONE, I. M.; EHRENKRANZ, R. A.; EDBERG, S. C.; BALTIMORE, R. S. – A ten-year review of neonatal sepsis and comparison with the previous fifty-year experience. **Pediatr. Infect. Dis. J.**: 9(11): 819-825, 1990.
- GOERING, R. V.; DUENSING, T. D. – Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, 28(3): 426-429, 1990.
- GOERING, R. V. – Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 14: 595-600, 1993.
- GOLDMANN, D. A.; DURBIN, W. A.; FREEMAN, J. – Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit. **J. Infect. Dis.**, 144(5): 449-459, 1981.
- GOLDMANN, D. A.; DURBIN, W. A.; FREEMAN, J. – Nosocomial infection and death in a neonatal intensive care unit. **J. Infect. Dis.**, 147(4): 635-641, 1983.
- GRATTARD, F.; POZZETTO, B.; BERTHELOT, P.; RAYET, I.; ROS, A.; LAURAS, B.; GAUDIN, O. G. – Arbitrarily primed PCR, ribotyping and plasmid pattern analysis applied to investigation of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, 32: 596-602, 1994.
- HAERTL, R.; BANDLOW, G. – Epidemiological fingerprint of *Enterobacter cloacae* by small-fragment restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments. **J. Clin. Microbiol.**, 31(1): 128-133, 1993.
- HALEY, R. W.; MORGAN, W. M.; CULVER, D. H.; WHITE, J. W.; EMORI, T. G.; MOSSER, J.; HUGHES, J. M. – Hospital infection control: recent progress and opportunities under prospective payment. **Am. J. Infect. Control**, 13: 97, 1985a.
- HARTSTEIN, A. I.; CHETCHOTISAKD, P.; PHELPS, C. L.; LeMONTE, A.N. – Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 22: 309-314, 1995.

HARRISON, T. R. et al. – **Medicina Interna**. 14 ed., Rio de Janeiro, MacGrawHill, 1998. p. 799.

HENRY, J. B. – **Diagnósticos Clínicos & Tratamento por métodos laboratoriais**. 18 ed., São Paulo, Editora Manole LTDA, 1995, p. 1513-1524.

Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **16**: 105-113, 1995.

IRVINE, P. W.; van-BUREN, N.; CROSSLEY, K. – Causes for hospitalization of nursing home residents. The role of infection. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **32**: 103-107, 1984.

JARVIS, W. R. – Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. **Pediat. Infect. Dis. J.**, **6**: 344-351, 1987.

JARVIS, W. R. – Usefulness of molecular epidemiology for outbreak investigations. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **15**: 500-503, 1994.

JARVIS, W. R. – The epidemiology of colonization. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **17**: 47-52, 1996.

JOHN, J. F. Jr.; RIBNER, B. S. – Antibiotic resistance in long-term care facilities. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **12**: 245-250, 1991.

KADO, C. I.; LIU, S. T. – Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol.**, **145**(3): 1365-1373.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. – **Diagnostic Microbiology**. 5 ed., Philadelphia, Lippincott, 1997. p. 171-241.

KUMARI, D. N. P.; KEER, V.; HAWKEY, P. M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. – Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 881-885, 1997.

- LACEY, S. L.; WANT, S. V. – An outbreak of *Enterobacter cloacae* in associated with contamination of a blood gas machine. **J. Infect.**, **30**: 223-226, 1995, 1995.
- LUBCHENCO, L. O.; HANSMAN, C.; BOYD, E. – Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 week. **Pediatrics**, **37(3)**: 403-408, 1966.
- LUPSKI, J. R. – Molecular epidemiology and its clinical application. **JAMA**, **270**: 1363-1364, 1993.
- MAKI, D. G. – Epidemic nosocomial bacteremia. In: WENZEL RP, ed. *Handbook of Hospital-Acquired Infections*. West Palm Beach, FL: CRC Press, 371—512, 1981.
- MAKI, D. G.; RHAME, F. S.; MACKEL, D. C.; BENNETT, J. V. – Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: epidemiologic and clinical features. **Am. J. Med.**, **60**: 471-485, 1976.
- MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. – Correlation of six methods for typing nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii*. **J. Med. Microbiol.**, **42**: 328-335, 1985.
- MARKOWITZ, S. M.; SMITH, S. M.; WILLIAMS, D. S. – Retrospective analysis of plasmid patterns in a study of burn unit outbreaks of infection due to *Enterobacter cloacae*. **J. Infect. Dis.**, **148**: 18-23, 1983.
- MASLOW, J. N.; BRECHER, S.; GUNN, J.; DURBIN, A.; ARBEIT, R. D. – Variation and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains among individual patients over extended periods of time. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **14**: 282-290, 1995.
- MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. – Epidemiologic typing systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **17**: 595-604, 1996.

- MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E., ARBEIT, R. D. – Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, **17**: 153-164, 1993.
- MODI, N.; DAMJANOVIC, V.; COOKE, R. W. I. – Outbreak of cephalosporin resistant *Enterobacter cloacae* infection in a neonatal intensive care unit. **Arch. Dis. Child.**, **62**: 148-151, 1987.
- MORO, M. L.; De TONI, A.; STOLFI, I.; CARRIERI, M. P.; BRAGA, M.; ZUNIN, C. – Risk factors for nosocomial sepsis in newborn intensive and intermediate care units. **Eur. J. Pediatr.**, **155**: 315-322, 1996.
- MORRIS, T.; BRECHER, S. M.; FITZSIMMONS, D.; DURBIN, A.; ARBEIT R. D.; MASLOW, J. N. – A pseudoepidemic due to laboratory contamination deciphered by molecular analysis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **16**: 82-87, 1995.
- MULLET, M. D.; COOK, E. F.; GALLAGHER, R. – Nosocomial sepsis in the neonatal intensive care unit. **J. Perinatol.**, **18**(2): 112-115, 1998.
- NELSON, W. E.; KLIEGMAN, M. R.; ARVIN, A. M. – **Tratado de pediatria**. Vol. 1, 15 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997. p. 504-511.
- PATTERSON, J. E.; VECCHIO, J.; PANTELICK, E. L. et al. – Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. **Am. J. Med.**, **91**: 479-483, 1991.
- PEREIRA, M. G. – **Epidemiologia, teoria e prática**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. 583p.
- PETER, J. B. – The polymerase chain reaction: amplifying our options. **Rev. Infect. Dis.**, **13**: 166-171, 1991.
- PETERSON, L. R.; KELLY, P. J. – The role of the clinical microbiology laboratory in the management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, **7**: 277-293, 1993.

- PFALLER, M. A. – Typing methods for epidemiology investigation. In *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. Eds. A. Balows, W.J. Hausler, K.L. Hermann Jr., H.D. Isenberg, H.J. Shadomy. Washington DC: American Society for Microbiology, pp 171-182, 1991.
- PFALLER, M. A. – Epidemiological typing methods for mycosis. **Clin. Infect. Dis.**, **14**: S4-S10, 1992.
- PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; MARSHALL, S. A.; COFFMAN, S. L.; HOLLIS, R. J.; EDMOND, M. B.; WENZEL, R. P. – Inducible Amp C beta-lactamase producing gram-negative bacilli from blood stream infections: frequency, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, **28**: 211-219, 1997.
- POILANE, I.; CRUAUD, P.; LACHASSINNE, E.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P. A. D.; COLLIN, M.; GAUDELUS, J.; TORLOTIN, J. C.; COLLIGNON, A. – *Enterobacter cloacae* cross-colonization in neonates demonstrated by ribotyping. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **12(11)**: 820-826, 1993.
- PONCE-DE-LEON, S. – The needs of developing countries and the resources required. **J. Hosp. Infect.**, **18**: 376-381, 1991.
- REZENDE, J. – **Obstetrícia**. 7 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p. 108-115, p. 353-357 e p. 1243-1251.
- ROUQUAYROL, M. Z. – **Epidemiologia e Saúde**. Rio de Janeiro, Medsi Editora Médica e Científica LTDA, 1994. p. 488-511.
- RUDNICK, J. R.; BECK-SAGUE, C. M.; ANDERSON, R. L.; SCHABLE, B.; MILLER, J. M.; JARVIS, W. R. – Gram-negative bacteremia in open-heart-surgery patients traced to probable tap-water contamination of pressure-monitoring equipment. **Infect. Control Epidemiol.**, **17**: 281-285, 1996.
- SCHABERG, D. R.; TOMPKINS, L. S.; FALKOWS, S. – Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram negative bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, **13**: 1105-1110, 1981.

- SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. – Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, **37**: 67-75, 1984.
- SEIFERT, H.; BOULLION, B.; SHULZE, A.; PULVERER, G. – Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **15**: 520-528, 1994.
- SEIFERT, H.; SCHULZE, A.; BAGINSKI, R.; PULVERER, R. – Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii*. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 1816-1819, 1994.
- SEIFERT, H.; GERNER-SMIDT, P. – Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **33**: 1402-1407, 1995.
- SEMMELWEIS, I. P. – The etiology, the concept and the prophylaxis of childbed fever. Leipzig, C. A. Hartleben, 1861; translation by Murphy, F. P., **Med. Classics**, **5**: 334, 1981.
- SETIA, U.; SERVENTI, I.; LORENZ, P. – Nosocomial infections among patients in a long-term care facility: spectrum, prevalence and risk factors. **Am. J. Infect. Control**, **13**: 57-62, 1985.
- SHI, ZHI-YUAN; YUK-FONG LIU, P.; LAU, Y. J.; LIN, Y. H.; HU, B. S. – Epidemiological typing os isolates from an outbreak of infection with multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* by repetitive extragenic palindromic unit b1-primed PCR and Pulsed-field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, **34**: 2784-2790, 1996.
- SIEGEL, S. – **Estatística não paramétrica**. Ed. McGraw-Hill do Brasil, 1975, p. 84-93.
- SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. – Purification, specific fragmentation and separation of large DNA molecules. **Methods enzymol.**, **155**: 449-467, 1987.
- STEADFAST, S. J.; MICHELSEN, P. B.; BALCH, A. L. – A prevalence survey of infections in a combined acute and long-term care hospital. **Infect. Control**, **5**: 184, 1984.

SULLIVAN, D. H.; WENZEL, R.P. - Infections in the nursing home patients. Littleton, Ma: PSC Publishing, 1988.

SWAMINATHAN, B.; MATR, G. M. – Molecular typing methods: definition, applications and advantages. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. eds, Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1993. p. 26-50.

TEMPLETON, N. S. – The polymerase chain reaction: history, methods and applications. In: The diagnostic molecular pathology. New York; Raven Press, 1992. P. 58-72.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; ARCHER, G. et al. – Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, **32**: 407-415, 1994.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. – Interpret chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, **33**(9): 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. – How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **18**: 426-439, 1997.

TORREA, G.; OFFREDO, C., SIMONET, M. et al. – Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.** **34**: 1043-1049, 1996.

TOWNSEND, D. E.; ASHDOWN, N.; BOLTON, S.; GRUBB, W. B. – The use of cetyltrimethylammonium bromide for the rapid isolation from *Staphylococcus aureus* of relaxable and non-relaxable plasmid DNA suitable for *in vitro* manipulation. **Letl. Appl. Microbiol.**, **1**: 87-94, 1985.

- TRESOLDI, A. T.; PADOVEZE, M. C.; TRABASSO, P.; VEIGA, J. F. S.; Von NOWAKONSKI, A.; BRANCHINI, M. L. M. *Enterobacter cloacae* sepsis outbreak in a newborn unit caused by contaminated total parenteral nutrition solution. **Am. J. Infect. Control**, **28**: 258-261, 2000.
- TULLUS, K.; BERGLUND, B.; FRYKLUND, B.; KUHN, I.; BURMAN, L. G. – Epidemiology of fecal strains of the family *Enterobacteriaceae* in 22 neonatal wards and influence of antibiotic policy. **J. Clin. Microbiol.**, **26**: 1166-1170, 1988.
- U. S. Public Health Service Communicable Disease Center and the National Academy of Sciences National Research Council: Proceedings of the Conference on Relation of the Environment to Hospital-acquired Staphylococcal Disease, December 1-2, 1958, Atlanta, GA, CDC, 1958.
- VAN BELKUM, A.; MEIS, J. – Polymerase chain reaction-mediated genotyping in microbial epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, **18**: 1018-1019, 1984.
- VAN NIEROP, W. H.; DUSE, A. G.; STEWART, R. G.; BILGERI, Y. R.; KOORNHOF, H. L. – Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 3085-3087, 1998.
- VERSALIC, J.; WOODS, C. R. Jr.; GEORGHIOU, P. R.; HAMILL, R. J.; LUPSKI, J. R. – DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **117**: 1088-1098, 1993.
- VERWEIJ, P. E.; van BELKUM, A.; MELCHERS, W. J. G.; VOSS, A.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A.; MEIS, J. F. G. M. – Interrepeat fingerprinting of third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae* isolated during an outbreak in a neonatal intensive care unit. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, **16**: 25-29, 1995.
- VILA, J.; MARCOS, A.; LLOVET, T.; COLL, P.; JIMENES DE ANTA, T. – A comparative study of ribotyping and arbitrarily primed polymerase chain reaction for investigation of hospital outbreak of *Acinetobacter baumannii* infection. **J. Med. Microbiol.**, **41**: 244-249, 1994.

- VILARI, P.; LACUZIO, L.; TORRE, I.; SCARCELLA, A. – Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. **J. Infect.**, **37(3)**: 274-281: 1998.
- WACHSMUTH, K. – Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. **Rev. Infect. Dis.**, **8**: 682-692, 1986.
- WALDER, M.; HAEGGMAN, S.; TULLUS, J.; BURMAN, L. G. – A hospital outbreak of high-level beta-lactam-resistant *Enterobacter* spp.: association more with ampicillin and cephalosporin therapy than with nosocomial transmission. **Scand. J. Infect. Dis.**, **28**: 293-296, 1996.
- WEBER, S.; PFALLER, M. A.; HERWALDT, L. A. – Role of molecular epidemiology in infection control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, **11**: 257-278, 1997.
- WEIGEL, L. M.; STEWARD, C. D.; TENOVER, F. C. – GyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **42**: 2661-2667, 1998.
- WHO: Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, **56**: 247-253, 1977.
- YEUNG, C. Y.; LEE, H. C.; HUANG, F. Y.; WANG, C. S. – Sepsis during total parenteral nutrition: exploration of risk factors and determination of the effectiveness of peripherally inserted central venous catheter. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **17(2)**: 135-142, 1998.
- YU, W. L.; CHENG, H. S.; LIN, H. C.; PENG, C.T.; TSAI, C. H. – Outbreak investigation of nosocomial *Enterobacter cloacae* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. **Scand. J. Infect. Dis.**, **32**: 293-298, 2000.
- ZIMMER, J. G.; BENTLEY, D. W.; VALENTI, W. M. – Systemic antibiotic use in nursing homes. A quality assesment. **J. Am. Geriatr. Soc.**, **34**: 703-710, 1986.



8. *ANEXOS*

Definição de infecção nosocomial

O Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) desenvolveu uma série de definições para a verificação de infecções nosocomiais. As definições são baseadas em vários princípios importantes:

1. A informação usada para determinar a presença e a classificação de uma infecção envolve a combinação de várias informações: dados clínicos, resultados laboratoriais e outras provas diagnósticas. A evidência clínica provém da observação direta do paciente ou da revisão das informações contidas nas fichas do paciente ou de outros registros. A evidência laboratorial compreende os resultados de culturas realizadas, teste para detecção de antígenos e/ou anticorpos e métodos de visualização microscópica. Dados de apoio são derivados de outros estudos diagnósticos, como resultados de raios-X, exame de ultra-som, tomografia computadorizada, ressonância magnética, procedimentos endoscópicos, biópsias e aspirações. Encontram-se incluídos critérios específicos para as infecções nas quais as manifestações clínicas são diferentes para neonatos ou crianças;

2. O diagnóstico de infecção proveniente da observação direta durante a cirurgia, exame endoscópico ou outro estudo diagnóstico ou baseado no julgamento clínico, segundo o médico ou o cirurgião, é um critério aceitável para afirmar a presença de infecção, salvo situações que evidenciem o contrário (como por exemplo, informações erradas de pacientes ou diagnósticos presuntivos que não receberam confirmação por estudos subseqüentes);

3. Para que uma infecção seja considerada nosocomial, não deve haver evidências de que a infecção estava presente ou sob incubação no momento da admissão do paciente ao hospital. Uma infecção que ocorrer nas seguintes condições especiais será considerada nosocomial: (a) infecção adquirida no hospital e evidenciada após a alta hospitalar; (b) infecção em neonatos, resultante da passagem através do cordão umbilical e (c) infecção resultante da transmissão de patógenos veiculados por hemoderivados, administrados após o nascimento. As infecções cujo modo de transmissão não pode ser esclarecido, deverão ser consideradas hospitalares, por exemplo, listeriose e infecção pelo *Streptococcus* do grupo B.

4. A infecção que ocorrer como resultado das seguintes situações especiais **não** será considerada nosocomial: (a) infecção associada à complicação ou extensão de infecção já presente no momento da admissão, salvo uma mudança do patógeno ou quando os sintomas fortemente indicarem a aquisição de uma nova infecção e (b) em criança, infecção sabidamente ou comprovadamente adquirida por via transplacentária (como por exemplo; herpes simplex, toxoplasmose, rubéola, sarampo, varicela, citomegalovírus, sífilis, tuberculose congênita, doença de Chagas, malária, hepatite B, hepatite C, infecção pelo HIV e pelo parvovírus B19) e evidenciada rapidamente após o nascimento;

5. Exceto para algumas situações, não há uma duração específica de tempo ou hospitalização para determinar se uma infecção é nosocomial ou adquirida na comunidade. Assim, cada infecção deve ser avaliada pela evidência que a une à hospitalização.

Infecção sistêmica primária

Primariamente a infecção sistêmica inclui a comprovação laboratorial da infecção na corrente sangüínea e sepse clínica. A definição de sepse clínica é importante principalmente para crianças e neonatos.

A infecção sistêmica, confirmada laboratorialmente, deve atender a um dos seguintes critérios:

1. Patógeno reconhecido, isolado da hemocultura, não relacionado à infecção em outro sítio. Quando um organismo, isolado da hemocultura, for compatível com uma infecção nosocomial relacionada com um outro sítio, a infecção sistêmica é classificada como **infecção sistêmica secundária**. Exceções a esta situação são as infecções sistêmicas associadas com procedimentos intravasculares; todas elas sendo classificadas como primárias mesmo quando os sinais locais da infecção estiverem presentes no sítio de acesso;

2. Um dos seguintes quadros: febre ($>38^{\circ}\text{C}$), calafrios ou hipotensão e quaisquer das seguintes situações:

- a. Contaminante comum da pele, isolado de duas hemoculturas em ocasiões distintas e um organismo não relacionado à infecção em um outro sítio. Entende-se como um contaminante comum da pele os organismos que

pertencem à flora normal da pele (como por exemplo, difteróides, *Bacillus* sp., *Propionibacterium* sp., *Staphylococcus* coagulase-negativa ou micrococos);

- b. Contaminante comum da pele, isolado de hemocultura de paciente com procedimento de acesso intravascular e terapia antimicrobiana adequada, instituída pelo médico;
- c. Teste positivo para antígeno sangüíneo (detecção de antígenos bacteriano, fúngico ou viral, como por exemplo, *Candida* sp., herpes simplex, varicela zoster, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus* do grupo B) observado pelos testes rápidos de diagnóstico (contra-imuno-eletroforese, coagulação ou aglutinação em látex) e organismo não relacionado à infecção em outro sítio;

3. Paciente com idade menor ou igual a 12 meses tendo um dos seguintes quadros: febre (T axilar >37,5°C), hipotermia (T axilar <36,0°C), apnéia ou bradicardia e quaisquer das seguintes situações:

- a. Contaminante comum da pele isolado de duas hemoculturas em ocasiões separadas e um organismo não relacionado à infecção em outro sítio;
- b. Contaminante comum da pele isolado de hemocultura de paciente com procedimento de acesso intravascular e terapia antimicrobiana adequada, instituída pelo médico;
- c. Teste positivo para antígeno sangüíneo e patógeno não relacionado à infecção em outro sítio.

A Sepsé Clínica deve atender a quaisquer dos seguintes critérios:

1. Um dos seguintes sinais clínicos ou sintomas sem nenhuma outra causa reconhecida: febre (maior que 38°C), hipotensão (pressão sistólica menor ou igual a 90 mmHg), ou oligúria (> 20 mL/h) e todas as seguintes situações:

- a. Hemocultura não realizada ou nenhum organismo ou antígeno detectado no sangue;
- b. Nenhuma infecção aparente em um outro sítio;
- c. Terapia antimicrobiana apropriada instituída pelo médico, para a sepsé;

2. Paciente com idade menor ou igual a 12 meses tendo um dos seguintes sinais clínicos ou sintomas sem nenhuma causa reconhecida: febre (maior que 38°C), hipotermia (menor que 37°C), apnéia ou bradicardia e todas as seguintes situações:

- a. Hemocultura não realizada ou nenhum organismo ou antígeno detectado no sangue;
- b. Nenhuma infecção aparente em um outro sítio;
- c. Terapia antimicrobiana apropriada instituída pelo médico, para sepse.

Ficha para a coleta de dados

HC: _____

Sexo: () masculino; () feminino.

Identificação do microrganismo: ____ / ____ / ____

Cepa: _____

() Cepa viável para a análise; () Não houve desenvolvimento, () * Cepa não encontrada após semeadura;

RN de _____

Nome do recém nascido: _____

Data de admissão: ____ / ____ / ____	Data da saída: ____ / ____ / ____	Total de dias: ____
	() alta – cura clínica; () óbito devido à IH; () óbito não devido a IH () Transferência	

Idade gestacional: _____ semanas ____ dias; () Capurro; () Outro método

() RNPT;

() RNT

Parto: () Normal; () Cesárea.

Peso ao nascer (grama): _____ g	() PIG; () AIG; () GIG.
---------------------------------	----------------------------------

Apgar 1 minuto: _____; 5 minutos _____.

Antibióticos utilizados

Número total de antibióticos utilizados: _____.

Número total de dias sob terapia antibacteriana: _____ dias.

Abocath	() SIM; () NÃO	Diagnóstico primário
Dreno	() SIM; () NÃO	
Diálise Peritoneal	() SIM; () NÃO	
Radioterapia:	() SIM; () NÃO	
Traqueostomia:	() SIM; () NÃO	
Fototerapia	() SIM; () NÃO	
Hemoterapia	() SIM _____ vezes; () NÃO	
Exsanguíneo	() SIM _____ vezes; () NÃO	
Respirador:	() SIM _____ dias; () NÃO	
NPP	() SIM _____ dias; () NÃO	
Sonda para alimentação enteral	() SIM _____ dias; () NÃO	
Soro basal	() SIM _____ dias; () NÃO	
Cateter venoso:	() SIM _____ dias; () NÃO	
Cateter umbilical:	() SIM _____ dias; () NÃO	
Flebotomia:	() SIM _____ dias; () NÃO	
Intracath	() SIM _____ dias; () NÃO	
Venoclise	() SIM _____ dias; () NÃO	
Berço aquecido:	() SIM _____ dias; () NÃO	
Berço comum:	() SIM _____ dias; () NÃO	
Incubadora	() SIM _____ dias; () NÃO	
Cirurgia		
() Não;		
() Sim:		

Soluções utilizadas (dispostas em ordem alfabética)

Agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melt Agarose*)

<i>Low melt agarose</i>	0,5 g
dH ₂ O.....	25,0 mL

Aquecer em microondas e dispensar um volume de 5,0 mL em tubos cônicos de 10,0 mL

Armazenar a 4°C.

ATAB 0,5 %

ATAB.....	2,5 g
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

ATAB (0,5 %); Triton X-100 (1,0 %)

ATAB.....	2,5 g
Triton X-100.....	5,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

ATAB (0,5 %); Triton X-100 (0,25%)

ATAB.....	2,5 g
Triton X-100.....	1,25 mL
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

Cloreto de Magnésio (MgCl₂)

MgCl ₂	20,33 g
dH ₂ O (qsp).....	100,0 mL

Filtrar a solução e esterilizar

EDTA (0,5 M; pH 7,5-8,0)

EDTA.....	186,1 g
dH ₂ O.....	800,0 mL
Ajustar o pH com pérolas de NaOH	
Completar a solução, usando dH ₂ O, para	1000,0 mL

EDTA (0,625 M; pH 9,3)

EDTA.....	116,3 g
dH ₂ O.....	300,0 mL
Ajustar o pH com pérolas de NaOH	
Completar a solução, usando dH ₂ O, para	500,0 mL

ESP (Volume suficiente para 10 cepas)

		Concentração final
EDTA (0,625 M; pH 9,3).....	16,0 mL	0,5 M
Sarkosyl (5,0 %).....	4,0 mL	1,0 %
Proteinase K (20,0 mg/mL).....	100,0 µL	0,1 mg/mL
Volume total.....	20,0 mL	

Lisozima (20 mg/mL)

Lisozima.....	20,0 mg
Água destilada estéril.....	1,0 mL
Aliquotar 500,0 µL em tubos <i>Eppendorf</i>	

NaCl (5,0 M)

NaCl.....	292,2 g
dH ₂ O.....	800,0 mL
Completar o volume para.....	1000,0 mL

NaCl (2,5M); EDTA (10 mM; pH 7,9-8,0)

NaCl (5,0 M).....	250,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	10,0 mL
dH ₂ O.....	240,0 mL
Volume total.....	500,0 mL

Sacarose 20%; TRIS (50,0 mM); EDTA (10,0 mM)

		Concentração final
Sacarose.....	100,0 g	20%
Tris (1,0 M; pH 8,0).....	25,0 mL	50,0 M
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	10,0 mL	10,0 mM
dH ₂ O (qsp).....		500,0 mL

Autoclavar

Armazenar a 4°C

Tampão *Dummy No Salt*

		Concentração final
Solução estoque		
TRIS (1,0 M; pH 8,0).....	5,0 mL	0,1 M
Cloreto de Magnésio (1,0 M).....	250,0 µL	0,005 M
dH ₂ O (qsp).....		50,0 mL

Tampão EC (pH 7,5)

		Concentração final
Solução estoque		
TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	1500,0 µL	0,006 M
NaCl (5,0 M).....	50,0 mL	1,0 M
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	50,0 mL	0,1 M
BRIJ 58.....	1,25 g	0,5 %
Deoxycholate Na.....	500,0 mg	0,2 %
Sarkosyl.....	1,25 g	0,5 %

Ajustar o pH com pérolas de NaOH;

Completar o volume, com dH₂O, para..... 250,0 mL

Filtrar a solução;

Esta solução não deve ser autoclavada.

Tampão TEN

Solução estoque		Concentração final
TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	5,0 mL	100,0 mM
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	10,0 mL	100,0 mM
NaCl (5,0 M).....	1,52 mL	150,0 mM
dH ₂ O (qsp).....		50,0 mL
Autoclavar		

TBE 0,5 X

TBE 5X.....	100,0 mL
dH ₂ O.....	900,0 mL
Volume total.....	1000,0 mL

TBE 1X

TBE 5X.....	200,0 mL
dH ₂ O.....	800,0 mL
Volume total.....	1000,0 mL

TBE 5X

Trizma base.....	54,0 g
Ácido Bórico.....	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	20,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	1000,0 mL

TE (TRIS 0,1 M; pH 7,5); EDTA (0,1 M; pH 7,5)

TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	5,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	10,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	50,0 mL

TE High Molarity [(TRIS 0,1 M; pH 7,5); EDTA (0,1 M; pH 7,5)]

TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	50,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	100,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

TRIS (1,0 M; pH 7,5 – 8,0)

TRIS.....	60,6 g
dH ₂ O (qsp).....	500,0 mL

TRIS (0,02 M); EDTA (0,01 M)

TRIS (1,0 M; pH 7,5).....	1,0 mL
EDTA (0,5 M; pH 7,5).....	1,0 mL
dH ₂ O (qsp).....	50,0 mL