

Artigo original

Uso da Técnica de PCR em Tempo Real no Diagnóstico Etiológico das Meningites Bacterianas Associadas ao *Staphylococcus aureus*

Real-time PCR for Etiological Diagnosis of Bacterial Meningitis Associated to *Staphylococcus aureus*

Priscilla Lima de Oliveira^{III}, Lucila Okuyama Fukasawa^I, Maristela Marques Salgado^I, Maria Gisele Gonçalves^I, Fábio Takenori Higa^I, Terezinha Pereira de Araújo^I, Bernadete Lourdes Liphhaus^{III} e Cláudio Tavares Sacchi^I

^ICentro de Imunologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

^{II}Programa de Aperfeiçoamento Profissional. Fundação do Desenvolvimento Administrativo. Secretaria de Gestão Pública. São Paulo, SP, Brasil

^{III}Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mostram que, no município de São Paulo, em 2010 o gênero *Staphylococcus* esteve associado a 15 casos de meningite bacteriana confirmados por cultura. O objetivo deste trabalho foi analisar a frequência das meningites associadas à espécie *Staphylococcus aureus* no município de São Paulo no ano de 2010 por meio da técnica de PCR em tempo real (PCR-TR). Foram analisadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro de 1.214 pacientes com suspeita de meningite bacteriana. Para a extração de DNA das amostras foi utilizado o kit comercial Nucleospin Blood[®] (Macherey-Nagel). A reação de PCR-TR utilizou o sistema TaqMan[®], empregando-se o gene *nuc*, específico do *S. aureus*, como alvo. A espécie *S. aureus* esteve associada à meningite bacteriana em 16 (1,3%) dos 1.214 casos analisados. Todos estes casos tinham pelo menos um exame complementar (bacterioscopia, cultura, contraímuno eletroforese e/ou teste de aglutinação pelo látex) realizado e PCR-TR em formato *multiplex* para *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* negativo. Nenhum destes casos foi confirmado no SINAN como associado ao gênero *Staphylococcus*. A técnica de PCR-TR pode representar ferramenta adicional à cultura para o diagnóstico etiológico das meningites associadas ao *S. aureus*, contribuindo para o aumento do número de casos de meningite bacteriana com etiologia determinada no município de São Paulo.

PALAVRAS-CHAVE: Meningite bacteriana. PCR em tempo real.
Staphylococcus aureus

ABSTRACT

Data from the Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) shows that, in São Paulo, in 2010 the genus *Staphylococcus* was associated with 15 cases of bacterial meningitis confirmed by culture. The aim of this study was to analyze the frequency of meningitis associated with *Staphylococcus aureus* in São Paulo in 2010 by using real-time PCR (PCR-TR) technique. We analyzed samples of cerebrospinal fluid (CSF) and serum from 1,214 patients with suspected bacterial meningitis. For the DNA extraction from the samples we used the commercial kit Nucleospin® Blood (Macherey-Nagel). The PCR-TR reaction used the TaqMan® system, using the *nuc* gene, specific for *S. aureus*, as target. The specie *S. aureus* was associated with bacterial meningitis in 16 (1.3%) of the 1,214 cases analyzed. All these cases had at least one additional laboratorial test (gram stain, culture, counterimmunoelectrophoresis and/or latex agglutination test) performed and multiplex PCR-TR for *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* negative. None of these cases has been confirmed as associated with genus *Staphylococcus* in SINAN. The PCR-TR technique may represent an additional tool to culture for the etiologic diagnosis of meningitis associated with *S. aureus*, contributing to the increase in the number of bacterial meningitis cases of known etiology in São Paulo.

KEY WORDS: Bacterial meningitis. Real time PCR. *Staphylococcus aureus*

INTRODUÇÃO

A meningite associada ao *Staphylococcus aureus* é considerada incomum, representando 0,3 a 9% dos casos de meningites bacterianas.^{1,2,3} Embora a frequência da doença seja baixa, a letalidade é elevada, apresentando taxas de até 60% em adultos.^{1,3-6}

Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), fornecidos pela Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória (DDTR) do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof.

Alexandre Vranjac” (CVE) da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria da Saúde (SES) do Estado de São Paulo,⁷ mostram que no município de São Paulo, no ano de 2010 foram confirmados por cultura 343 casos de meningite bacteriana, destes casos 15 foram associados ao gênero *Staphylococcus*. O agente etiológico mais frequente foi a *Neisseria meningitidis*, seguida pelo *Streptococcus pneumoniae*. Os dados do SINAN não fazem distinção entre as

espécies de *Staphylococcus* associadas à doença e, deste modo, não é possível determinar a real frequência de meningites associadas à espécie *S. aureus*.

Entre as espécies de *Staphylococcus*, a de maior interesse é a espécie *S. aureus*, que está associada a diversas infecções em seres humanos, apresenta alto potencial patogênico, alta letalidade e tem-se observado aumento no número de casos associados ao *S. aureus* resistentes a meticilina.^{1,6,8,9} Neste contexto, a identificação do *S. aureus* como agente etiológico da meningite bacteriana torna-se importante, pois permite a orientação terapêutica correta do paciente, além de estabelecer o perfil epidemiológico da doença.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a frequência da meningite associada ao *S. aureus* por meio do uso da técnica de PCR em tempo real (PCR-TR) no município de São Paulo no período de janeiro a dezembro de 2010.

METODOLOGIA

O presente estudo descritivo utilizou dados secundários produzidos na rotina diagnóstica das meningites bacterianas realizada no Instituto Adolfo Lutz (IAL). Assim, não houve coleta de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) ou sangue ou outro tipo de material biológico específico para este estudo.

Extração de DNA – Para a extração de DNA de LCR ou soro foi empregado o kit comercial Nucleospin Blood® (Macherey-Nagel), conforme orientação do fabricante, com exceção do volume de LCR empregado na reação, que foi de 0,5 mL.

PCR em tempo real (PCR-TR) – Foram empregados dois tipos de reações de PCR-TR:

I) PCR-TR em formato individual para detecção de *S. aureus* (gene alvo, *nuc*);¹⁰

II) PCR-TR em formato individual para detecção do gene da RNase P humana.¹¹ Este ensaio foi empregado para checar a possível presença de inibidores na amostra de DNA extraída. A falha na amplificação deste gene pode ser considerada um indicativo da presença de inibidores e/ou de problemas no processo de extração do DNA. Todas as reações de PCR-TR foram preparadas com sistema TaqMan®, em volume final de 25L, utilizando 5L do DNA alvo. A detecção do gene da RNase P foi realizada em 10% das amostras analisadas.

Análise dos casos no banco de dados do SINAN – Em fevereiro de 2011 foram selecionados do banco SINAN os casos de meningite bacteriana confirmados pelo critério cultura nos anos de 2007 a 2010 de moradores do município de São Paulo (Tabela 1). Este estudo analisou também as fichas do SINAN dos casos de meningite bacteriana confirmadas por cultura para o gênero *Staphylococcus* (*aureus*, sp, *epidermidis*) no ano de 2010 de moradores do município de São Paulo. Adicionalmente, foram analisados os casos com resultado positivo para *S. aureus* no ensaio de PCR-TR. Para todos estes casos foram investigados: I) classificação final do caso, II) critério de confirmação e III) resultados laboratoriais (quimiocitológico, cultura, bacterioscopia, contraímuno eletroforese e aglutinação pelo látex). Neste estudo não foram analisadas as fichas do SINAN dos casos com resultados positivos para *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* pela técnica de PCR-TR, pois este ensaio já foi validado em trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo.¹² Para a análise descritiva utilizou-se o *software* Epi Info versão 6.04d.

Tabela 1. Distribuição dos casos de meningite bacteriana confirmados por cultura de acordo com a etiologia, Município de São Paulo, anos 2007 a 2010.

Etiologia	Ano							
	2007 (%)		2008 (%)		2009 (%)		2010 (%)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	162	43,78	200	52,08	169	50,90	191	55,69
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	79	21,35	92	23,96	89	26,81	83	24,20
<i>Staphylococcus (aureus, sp, epidermidis)</i>	28	7,57	17	4,43	15	4,52	15	4,37
<i>Streptococcus (sp, pyogenes, agalactiae)</i>	16	4,32	9	2,34	8	2,41	9	2,62
<i>Haemophilus influenzae</i>	8	2,16	8	2,08	5	1,51	10	2,92
<i>Acinetobacter (sp, baumannii)</i>	3	0,81	9	2,34	5	1,51	3	0,87
<i>Enterobacter (sp, cloacae)</i>	4	1,08	4	1,04	2	0,60	1	0,29
<i>Enterococcus</i>	5	1,35	0	0,00	1	0,30	0	0,00
<i>Escherichia coli</i>	8	2,16	5	1,30	3	0,90	5	1,46
<i>Klebsiella (sp, pneumoniae)</i>	10	2,70	10	2,60	5	1,51	6	1,75
<i>Listeria monocytogenes</i>	4	1,08	4	1,04	4	1,20	0	0,00
<i>Pseudomonas (aeruginosa, sp)</i>	6	1,62	3	0,78	2	0,60	3	0,87
<i>Salmonella sp.</i>	1	0,27	0	0,00	0	0,00	2	0,58
<i>Treponema pallidum</i>	1	0,27	0	0,00	1	0,30	1	0,29
Outras bactérias	35	9,46	23	5,99	23	6,93	14	4,08
Total	370	100,0	384	100,0	332	100,0	343	100,0

Fonte: Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

RESULTADOS

Foram analisadas amostras clínicas de 1.214 casos suspeitos de meningite do município de São Paulo no ano de 2010. Estas amostras foram encaminhadas ao IAL para o diagnóstico laboratorial de rotina de meningites bacterianas por PCR-TR no período de 04 de janeiro a 30 de dezembro de 2010.

Dos 1.214 casos analisados, 16 (1,3%) foram positivos para a espécie *S. aureus*. Todos estes casos tinham PCR-TR em formato *multiplex* para *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae* negativo.

Para avaliar o ensaio de PCR-TR para detecção de *S. aureus* os resultados obtidos por esta metodologia foram confrontados com os dados do banco do SINAN. A análise do SINAN mostrou que 14 destes casos foram notificados, todos tinham origem comunitária e pelo menos

um exame complementar (quimiocitológico, bacterioscopia, cultura, contraímunoelctrofore e/ou teste de aglutinação pelo latex) realizado. Esta análise revelou ainda que nenhum dos 14 casos positivos para *S. aureus* identificados pela PCR-TR foi encerrado como meningite bacteriana pelo gênero *Staphylococcus* identificado por cultura. Dois casos foram encerrados com a classificação de meningite bacteriana não especificada, 3 casos foram encerrados como doença meningocócica por critério clínico devido a presença de petéquias, 1 caso de doença meningocócica foi encerrado pelo critério bacterioscopia (diplococos gram negativos), 5 casos foram descartados, pois o LCR apresentava baixa celularidade e os resultados laboratoriais foram negativos, 1 caso foi encerrado como meningite viral, 1 caso como meningite por hemófilos com látex positivo para este agente e 1 caso foi encerra-

do como meningite por outras bactérias, pois a cultura foi positiva para o gênero *Streptococcus*.

A análise do banco SINAN mostrou ainda que, em 2010, foram confirmados por cultura 15 casos de meningite associados ao gênero *Staphylococcus* no município de São Paulo (Tabela 1). Cinco destes casos eram de origem intra-hospitalar e apenas um caso apresentava informação de que a espécie de *Staphylococcus* era *aureus*.

Do total de casos analisados no estudo, 10% (124/1.214) foram selecionados para a determinação do gene da RNase P humana. Entre estes casos, 100% foram positivos para a presença deste gene, indicando que não houve problemas no processo de extração do DNA das amostras e nem a presença de inibidores na reação de PCR.

DISCUSSÃO

As meningites bacterianas constituem problema de saúde pública mundial, apresentando elevadas taxas de morbidade e letalidade.¹³ Entre as principais bactérias associadas às meningites podemos destacar: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Outras bactérias, como o *Streptococcus* do grupo B, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* também causam meningites, porém com maior frequência em neonatos.¹³ A meningite associada ao *Mycobacterium tuberculosis* é diagnosticada mais frequentemente em pacientes imunodeprimidos.¹⁴ Já a meningite associada ao *S. aureus* é relativamente incomum, mas apresenta alta taxa de letalidade.¹⁻⁴

A identificação do agente etiológico da meningite bacteriana permite: I) introdução de terapia adequada; II) controle da doença por meio

de quimioprofilaxia e/ou vacinação; III) avaliação e monitoramento do perfil epidemiológico da doença; IV) verificação da eficácia de vacinas presentes no Programa Nacional de Imunização. Para isso, é necessário dispor de técnicas laboratoriais com alta sensibilidade e especificidade que permitam a rápida identificação da bactéria, levando à confirmação laboratorial destes casos. Neste contexto, o IAL padronizou e validou ensaios de PCR-TR para o diagnóstico laboratorial das bactérias associadas às meningites de importância em Saúde Pública: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Este ensaio foi incorporado à rotina diagnóstica do IAL no ano de 2007^{12,15}, sendo que no ano de 2010 foi disponibilizado para amostras de pacientes provenientes de todas as unidades de saúde pública da Grande São Paulo.

Com o intuito de aumentar o espectro de bactérias pesquisadas associadas à meningite, nosso grupo padronizou o ensaio de PCR-TR para detecção de um quarto microorganismo, o *S. aureus*. Este agente foi escolhido, pois os dados do SINAN mostram que bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre as bactérias mais comumente isoladas por cultura dos casos de meningite notificados entre os anos de 2007 a 2010 tanto no município de São Paulo como no Estado de São Paulo (Tabelas 1 e 2). Escolhemos a espécie *aureus* por se tratar da espécie de maior interesse médico, podendo causar desde infecções simples até mais graves como meningite, pneumonia, endocardite e septicemia. Além disso, esta bactéria é um dos principais agentes etiológicos das infecções hospitalares, principalmente em berçários e unidades de terapia intensiva.⁸

Tabela 2. Distribuição dos casos de meningite bacteriana confirmados por cultura de acordo com a etiologia, Estado de São Paulo, anos 2007 a 2010.

Etiologia	Ano							
	2007 (%)		2008 (%)		2009 (%)		2010 (%)	
<i>Neisseria meningitidis</i>	417	37,43	473	40,67	424	41,65	490	44,83
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	287	25,76	301	25,88	252	24,75	288	26,35
<i>Staphylococcus (aureus, sp, epidermidis)</i>	93	8,35	83	7,14	84	8,25	76	6,95
<i>Streptococcus (sp, pyogenes, agalactiae)</i>	58	5,21	58	4,99	55	5,40	38	3,48
<i>Haemophilus influenzae</i>	27	2,42	21	1,81	18	1,77	26	2,38
<i>Acinetobacter (sp, baumannii)</i>	22	1,97	36	3,10	22	2,16	20	1,83
<i>Enterobacter (sp, cloacae)</i>	11	0,99	10	0,86	8	0,79	5	0,46
<i>Enterococcus</i>	15	1,35	9	0,77	5	0,49	8	0,73
<i>Escherichia coli</i>	22	1,97	17	1,46	13	1,28	18	1,65
<i>Klebsiella (sp, pneumoniae)</i>	26	2,33	36	3,10	15	1,47	20	1,83
<i>Listeria monocytogenes</i>	7	0,63	7	0,60	7	0,69	2	0,18
<i>Pseudomonas (aeruginosa, sp)</i>	21	1,89	14	1,20	23	2,26	9	0,82
<i>Salmonella sp.</i>	2	0,18	1	0,09	1	0,10	4	0,37
<i>Treponema pallidum</i>	2	0,18	1	0,09	2	0,20	2	0,18
Outras bactérias	104	9,34	96	8,25	89	8,74	87	7,96
Total	1.114	100,0	1.163	100,0	1.018	100,0	1.093	100,0

Fonte: Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Empregando-se a PCR-TR, 1,3% dos casos analisados foram positivos para *S. aureus*. Este resultado é semelhante ao de Rodrigues e colaboradores³ que detectou esta bactéria como responsável por 1,3% de 2.319 casos de meningite bacteriana adquiridos na comunidade entre os anos de 1983 a 1998. Outros estudos também mostram que a meningite por *S. aureus* não é comum comparado a outras bactérias associadas à meningite, sendo responsável por 0,3 a 9% dos casos.^{1,3}

Confrontando os resultados obtidos pelo PCR-TR e os dados do banco do SINAN observamos que o exame de cultura não foi capaz de identificar o gênero *Staphylococcus* nestes casos. Desta forma, é provável que o percentual de 1,3% de casos de meningite por *S. aureus* obtidos pela PCR-TR não reflita a real situação deste agente no município de São Paulo.

Adicionalmente, é possível que alguns dos casos de meningite associados ao gênero *Staphylococcus* descritos no SINAN tenham sido encerrados com cultura positiva para outras espécies de *Staphylococcus*. Estudo conduzido por Silbert e colaboradores¹⁶ mostrou que 61% das hemoculturas foram positivas para a espécie *Staphylococcus* coagulase negativa. Estudos em hospitais demonstraram que as espécies de *Staphylococcus* mais frequentemente isoladas em hemocultura são o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. warneri*, sendo a primeira espécie a mais encontrada.¹⁶⁻¹⁹

Todos os 14 casos de meningite positivos para *S. aureus* identificados pela PCR-TR notificados no SINAN eram de origem comunitária. Portanto, esta metodologia representa uma ferramenta adicional para o diagnóstico da meningite associada ao *Staphylococcus*, uma vez que até o

presente momento, o único ensaio laboratorial disponível para a detecção desta bactéria é a cultura.

A implantação de novas metodologias moleculares como a PCR-TR representa valiosa ferramenta para o diagnóstico laboratorial das doenças de notificação compulsória onde há urgência na liberação dos resultados e na definição dos casos, contribuindo assim, para o aumento do número de casos de meningite bacteriana com etiologia determinada no município de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Claudia Patara Saraceni do Núcleo de Informação do Instituto Adolfo Lutz pela colaboração na aquisição e compilação de dados secundários do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) e à Dra. Telma Regina M. P. Carvalhanas da Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” pelas sugestões a este manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Aguilar J, Urdy-Cornejo V, Donabedian S, Perry M, Tibbetts R, Zervos M. *Staphylococcus aureus* meningitis. Case series and literature review. *Medicine*. 2010;89(2):117-25.
2. Pintado V, Meseguer MA, Fortún J, Cobo J, Navas E, Quereda C, *et al*. Clinical study of 44 cases of *Staphylococcus aureus* meningitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:864-8.
3. Rodrigues MM, Patrocínio SJ, Rodrigues MG. *Staphylococcus aureus* meningitis in children. A review of 30 community-acquired cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 2000;58(3-B):843-51.
4. Jensen AG, Espersen F, Skinhoj P, Rosdahl VT, Frimodt-Moller N. *Staphylococcus aureus* meningitis: a review of 104 nationwide, consecutive cases. *Arch Intern Med*. 1993;153:1902-8.
5. Pedersen M, Benfield TL, Skinhoj P, Jensen AL. Haematogenous *Staphylococcus aureus* meningitis. A 10-year nationwide study of 96 consecutive cases. *BMC Infect Dis*. 2006;6:49.
6. Moreira M, Medeiros EAS, Pignatari AACC, Wey SB, Cardo DM. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização. *Rev Assoc Med Bras*. 1998;44(4):263-8.
7. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE). Meningites/Doença meningocócica. Dados estatísticos [base de dados na internet]. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/meni_dados.html.
8. Santos AL, Santos DO, Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR, *et al*. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(6):413-23.
9. Guilarde AO, Turchi MD, Martelli CMT, Primo MGB. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: incidence, risk factors and

- predictors for death in a Brazilian teaching hospital. *J Hosp Infect.* 2006;63:330-6.
10. Elizaquível P, Aznar R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. *Food Microbiol.* 2008;25:705-13.
 11. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, Newton BR, Winchell JM, Meyer RF, *et al.* Real-Time Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Assay for SARS-associated Coronavirus. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:311-6.
 12. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, *et al.* Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One.* 2011;6(6):e 20675.
 13. Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:32-42.
 14. Garg RK. Tuberculous meningitis. *Acta Neurol Scand.* 2010;122:75-90.
 15. Instituto Adolfo Lutz. Introdução da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial das meningites bacterianas no Instituto Adolfo Lutz. BEPA. 2007;4(40):24-7.
 16. Silbert S, Rosa DD, Matte U, Goldim JR, Barcellos SH, Procianoy RS. *Staphylococcus* sp. coagulase-negativa em hemoculturas de pacientes com menos de sessenta dias de idade: infecção versus contaminação. *J Pediatr (Rio J).* 1997;73(3):161-5.
 17. Hörner R, Catellan MP, Bertincheli CM, Righi RA, Oliveira LO, Meneghetti B, *et al.* Perfil microbiológico das meningites em um hospital público universitário. *Saúde.* 2008;34a(1-2):22-6.
 18. Kleeman KT, Bannerman TL, Kloos WE. Species distribution of coagulase negative *Staphylococcal* isolates at a community hospital and implications for selection of *Staphylococcal* identification procedures. *J Clin Microbiol.* 1993;31(5):1.318-21.
 19. St. Geme III JW, Bell LM, Baumgart S, D'Angio CT, Harris MC. Distinguishing sepsis from blood culture contamination in young infants with blood cultures growing coagulase-negative staphylococci. *Pediatrics.* 1990;86(2):157-62.

Recebido em: 21/3/2011
Aprovado em: 14/2/2012

Correspondência/Correspondence to
Lucila Okuyama Fukasawa
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Tel.: 55 11 3068-2899
E-mail: lucilaof@gmail.com