

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**EFEITO DO BANHO SOBRE A FLORA MICROBIANA  
DA PELE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

MARIA LUZIA CHOLLOPETZ DA CUNHA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
PEDIATRIA

**EFEITO DO BANHO SOBRE A FLORA MICROBIANA  
DA PELE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

MARIA LUZIA CHOLLOPETZ DA CUNHA

**Orientador: Prof. Dr. Renato Soibelman Procianoy**

*A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do Título de Doutor.*

Porto Alegre, Brasil

2004

## Ficha Catalográfica

C972e Cunha, Maria Luzia Chollopetz da  
Efeito do banho sobre a flora microbiana da pele de recém-nascidos pré-termo / Maria Luzia Chollopetz da Cunha ; orient. Renato Soibermann Procianoy. – Porto Alegre, 2004.  
117 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, 2004.

1. Prematuro. 2. Banhos : enfermagem. 3. Higiene da pele : métodos. 4. Contagem de colônia microbiana. 5. Assepsia. 6. Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. 7. Humano. 8. Recém-nascido. I. Procianoy, Renato Soibermann. II. Título.

LHSN – 448.7  
NLM – WS 410

Catálogo por Celina Leite Miranda (CRB-10/837).

Dedico esta tese ao meu marido, **Arlindo**, por  
todo seu amor, incentivo e companheirismo.

## **Agradecimento Especial**

Às minhas filhas **Laura e Clara**, que tiveram paciência e compreenderam minhas ausências, o meu amor.

## Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram na realização desta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos:

- ao **Dr. Renato Procianoy**, orientador, pelo incentivo, competência e orientação permanente;
- aos **enfermeiros e técnicos de enfermagem** da Unidade de Internação Neonatal do HCPA, especialmente à enfermeira **Clarisse Zambrano**, pelo empenho e eficiência na realização do tipo de banho requerido pela pesquisa nos recém-nascidos pré-termo;
- à enfermeira **Graziela Schelindwein** e às acadêmicas de enfermagem **Alessandra Silva** e **Adriane Coelho**, pelo auxílio na coleta de dados;
- à **equipe do Laboratório de Microbiologia do HCPA**, especialmente à **Dra. Suzana Barcelos**, a **Rita de Andrade** e a **Larissa Lutz**, pela realização das culturas;
- ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pela valiosa assessoria na análise estatística;
- à **Profa. Clarice Bohn Knies**, pela competente revisão do texto da tese;
- à **Profa. Hedy Hoffmann**, pela tradução do artigo em inglês;
- ao **Dr. Afonso Luis Barth**, chefe do Laboratório de Pesquisa do HCPA;
- à **Clair Azevedo**, pela eficiência na padronização técnica do texto.
- Às **colegas** de disciplina do DEMI, especialmente à **Profa. Virginia Moretto**, pelo apoio recebido.

# Sumário

**Lista de Abreviaturas e Siglas**

**Lista de Quadros**

**Lista de Tabelas**

**Resumo**

<b>Artigo de Revisão - BANHO E COLONIZAÇÃO DA PELE DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO INTERNADO EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL</b> .....	15
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	44
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	51
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	53
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	53
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	53
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	55
<b>4.1 Delineamento do estudo</b> .....	55
<b>4.2 População</b> .....	55
4.2.1 <i>População em estudo</i> .....	55
4.2.2 <i>População da pesquisa</i> .....	55
<b>4.3 Amostra e amostragem</b> .....	56
4.3.1 <i>Critérios de inclusão</i> .....	56
4.3.2 <i>Critérios de exclusão</i> .....	56
4.3.3 <i>Recrutamento</i> .....	57

<b>4.4 Variáveis do estudo</b> .....	58
<b>4.5 Intervenção</b> .....	58
<b>4.6 Logística</b> .....	59
4.6.1 <i>Procedimentos de coleta de dados</i> .....	62
<b>4.7 Método microbiológico empregado nas culturas</b> .....	64
<b>4.8 Banco de dados</b> .....	65
<b>4.9 Aspectos estatísticos</b> .....	65
4.9.1 <i>Cálculo do tamanho da amostra</i> .....	65
4.9.2 <i>Análise estatística</i> .....	66
<b>4.10 Considerações éticas</b> .....	67
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>Artigo em Português: EFEITO DO BANHO SOBRE A FLORA MICROBIANA DA PELE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO</b> .....	74
<b>Artigo em inglês: THE EFFECT OF BATHING ON THE MICROBIAL SKIN FLORA OF PRETERM NEWBORNS</b> .....	93
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	111
<b>ANEXOS</b>	



## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

---

---

---

<b>AWHONN</b>	<i>Association of Women's Health Obstetric and Neonatal Nurses</i>
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>NICU</b>	<i>Neonatal Intensive Care Unit</i>
<b>STORCH</b>	Sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes
<b>STORCH</b>	<i>Syphilis, toxoplasma, rubella, cytomegalovirus, herpes virus 1 and 2</i>
<b>UFC/ml</b>	Unidades formadoras de colônias por mililitros
<b>UIN</b>	Unidade de internação neonatal
<b>UTIN</b>	Unidade(s) de terapia intensiva neonatal

---

## **Lista de Quadros**

<b>Quadro 1</b>	Protocolo do banho de aspersão com água .....	62
<b>Quadro 2</b>	Protocolo do banho de aspersão com sabonete neutro líquido e água.....	63

---

---

## Lista de Tabelas

---

---

### Tabelas do Artigo em Português

<b>Tabela 1</b>	Características dos recém-nascidos pré-termo estudados.....	82
<b>Tabela 2</b>	Comparação dos microorganismos presentes na pele dos grupos de pré-termos banhados somente com água e com sabonete neutro e água.....	83
<b>Tabela 3</b>	Comparação dos grupos de pré-termos banhados somente com água e com sabonete neutro e água nas contagens de unidades formadoras de colônias no momento basal e na diferença basal-final.....	84

### Tabelas do Artigo em Inglês

<b>Table 1</b>	Characteristics of the preterm newborns studied.....	101
<b>Table 2</b>	Comparison of the microorganisms present in the skin of preterm infant groups bathed only with mild pH neutral soap and water.....	102
<b>Table 3</b>	Comparison of the preterm groups bathed only with water and with mild pH neutral soap and water in the colony forming unit counts at the basal moment and in the basal-final difference .....	103

## **RESUMO**

---

## **RESUMO**

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do banho somente com água e do banho com sabonete neutro e água sobre a flora microbiana cutânea, comparando a quantidade de colônias e o tipo de microorganismos presentes na pele dos recém-nascidos pré-termo antes e após o banho.

**Método:** Ensaio clínico randomizado cego, com 73 pré-termos de idade gestacional entre 28 e 35 semanas e peso de nascimento entre 800 g e 1.800 g, alocados por randomização para um grupo que recebeu sete banhos somente com água ou para outro grupo que recebeu sete banhos com sabonete neutro e água. Foram coletados *swabs* da região axilar antes e após o banho para comparação da flora cutânea de ambos os grupos.

**Resultados:** O *Staphylococcus coagulase* negativo foi o microorganismo com maior prevalência nos dois grupos. Na comparação, entre os grupos, da contagem de colônias de microorganismos, não houve diferença significativa. A comparação do número de UFC realizada pela ANOVA de medidas repetidas, mostrou uma diferença significativa ao longo do tempo dos germes gram-positivos ( $P < 0,001$ ) e dos germes gram-negativos ( $P = 0,032$ ) nos dois grupos, indicando que a colonização da pele diminuiu em ambos os grupos de maneira semelhante, sem haver diferença significativa entre os dois grupos de pré-termos.

**Conclusões:** O banho do pré-termo com sabonete neutro e água e o banho somente com água produzem efeitos semelhantes sobre a colonização da pele do recém-nascido pré-termo hospitalizado em UTIN, sendo ambos eficazes na redução do número de colônias de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

**Palavras chave:** flora microbiana da pele, banho, recém-nascido pré-termo.

**Artigo de Revisão**

---

**BANHO E COLONIZAÇÃO DA PELE DO  
RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO INTERNADO EM  
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**

## **ARTIGO DE REVISÃO**

---

# **BANHO E COLONIZAÇÃO DA PELE DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO INTERNADO EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**

## **BATHING AND COLONIZATION OF THE SKIN OF PRETERM NEWBORN IN THE NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT**

Maria Luzia Chollopetz da Cunha (1)

Renato S. Procianoy (2)

- (1) Profa. Assistente do Departamento de Enfermagem Materno-Infantil - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestre em Enfermagem
- (2) Prof. Titular de Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Chefe do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Pesquisador 1 A CNPq

Endereço para correspondência:  
Maria Luzia Chollopetz da Cunha  
Rua São Manoel, 963 - Campus da Saúde  
CEP: 90.620-110 - Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (0XX51) 3316 5428  
e-mail: [luzia@adufrgs.ufrgs.br](mailto:luzia@adufrgs.ufrgs.br)

## RESUMO

**Objetivo:** Determinar o papel do banho na colonização da pele do recém-nascido pré-termo internado em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), analisando a utilização dos agentes de limpeza e as características da pele do prematuro.

**Método:** Revisão da literatura através da base de dados Medline, com seleção e organização dos artigos mais relevantes em relação ao objetivo.

**Resultados:** O banho altera o equilíbrio do pH da pele. Pesquisas experimentais constataram que o pH da pele do recém-nascido é neutro ao nascer, tornando-se ácido durante a primeira semana de vida, atingindo valores semelhantes ao do adulto, em torno de 5,5. O pH ácido propicia resistência à ruptura da epiderme. Pesquisas clínicas demonstram que o banho com sabonete desencadeia aumento do pH, interferindo na proteção fisiológica da pele (manto ácido) e provocando mudança na composição da microflora cutânea. Recém-nascidos internados em UTIN tendem a adquirir flora nosocomial cutânea. Os procedimentos realizados durante a hospitalização do pré-termo podem causar lesão à pele e contaminação por microorganismos patogênicos. A epidemiologia da colonização da pele necessita ser compreendida para que sejam criadas medidas preventivas de controle de infecção hospitalar.

**Conclusões:** O banho e os produtos de limpeza interferem na proteção fisiológica cutânea e na função da barreira epidérmica, com conseqüências diretas sobre a colonização da pele do pré-termo internado em UTIN.

**Palavras-chave:** banho, colonização da pele, recém-nascido pré-termo.



## **ABSTRACT**

**Objective:** To determine the role of bathing in the colonization of the skin of preterm newborns in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU), analyzing the use of cleansing agents and the characteristics of the premature newborns' skin.

**Method:** Review of literature looking at the Medline data base, selecting and organizing the articles that are most relevant to the objective.

**Results:** The bath changes the pH balance of the skin. Experimental research found that the pH of the neonate's skin is neutral at birth and acidifies during the first week of life, reaching values similar to those of the adult, around 5.5. The acid pH provides resistance to epidermal breakdown. Clinical research show that bathing with soap triggers an elevation of the pH, interfering in the physiological protection of the skin (acid mantle) and provoking change in the composition of the cutaneous microflora. Neonates in a NICU tend to acquire nosocomial skin flora. The procedures performed while the preterm newborn is in hospital may injure the skin and cause contamination by pathogenic microorganisms. The epidemiology of skin colonization needs to be understood in order to create preventive measures to control hospital infection.

**Conclusions:** The bath and cleansing agents interfere in the physiologic protection of the skin and in the function of the epidermal barrier, with direct consequences on the colonization of the skin of the preterm newborn in a NICU.

**Key words:** bath, skin colonization, preterm newborn.

## **BANHO E COLONIZAÇÃO DA PELE DO RECÉM-NASCIDO PRÉ-TERMO INTERNADO EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NEONATAL**

O banho do neonato visa remover resíduos presentes na pele e reduzir sua colonização. Porém, nem sempre ele produz resultados benéficos. Para os recém-nascidos pré-termo, nascidos com menos de 37 semanas de idade gestacional segundo a Organização Mundial da Saúde, o banho pode trazer prejuízos devido à fragilidade da epiderme (1, 2). Os agentes químicos usados nos sabonetes podem causar irritação da pele e absorção de substâncias tóxicas; além disso, o banho pode desencadear hipotermia e desestabilizar os sinais vitais do prematuro (2, 3).

Pouco se sabe em relação à suavidade dos sabonetes para bebê, devido à escassez de testes publicados (4, 5). Tanto os sabonetes para bebê quanto os sabonetes suaves genéricos oferecidos no mercado apresentam como ingrediente ativo os surfactantes, que são substâncias irritantes para a pele (5). Também são raros os estudos comparando técnicas de banho ou o efeito de diferentes produtos de limpeza sobre o pH da pele do recém-nascido a termo e prematuro (2).

A pele do recém-nascido pré-termo é delicada e propícia a lesões, especialmente quando ele se encontra em condição crítica em Unidade de Terapia Intensiva (UTIN) (6, 7). A ocorrência de lesão na pele propicia a penetração de microorganismos, podendo causar infecção (8). Manter a integridade da pele durante o período crítico de adaptação é fundamental para a diminuição da morbidade e mortalidade neonatal (9).

Este artigo pretende, através da revisão da bibliografia, determinar o papel do banho na colonização da pele do recém-nascido pré-termo internado em UTIN, analisando a utilização dos agentes de limpeza e as características da pele do prematuro.

### **Aspectos anatomofisiológicos da pele do recém-nascido pré-termo**

A pele é um grande órgão do organismo, correspondendo a 13% do peso corporal do recém-nascido pré-termo (3, 10). É o órgão sensório mais sofisticado no neonato, através do qual ele obtém a maioria das informações do ambiente (11).

A pele é composta pela epiderme, derme e subcutâneo. A epiderme possui o estrato córneo e as camadas granulosa, espinhosa e basal; a derme é composta de colágeno e elastina, de nervos e de glândulas sudoríparas e sebáceas. O subcutâneo é composto de tecido conjuntivo gorduroso (12).

A principal barreira da pele está localizada na camada mais superficial da epiderme, o estrato córneo (2, 3, 13). O estrato córneo consiste em camadas bilaminares consolidadas, compostas por lipídios hidrofóbicos (ácidos graxos, colesterol e ceramidas), localizados em espaços extracelulares de múltiplas camadas de células mortas e sem núcleo denominadas corneócitos (células que migraram da camada basal para a superfície da epiderme), que são firmemente unidos, cobertos por invólucro celular cornificado rico em proteína e queratina (3, 13). Em adultos e em recém-nascidos a termo, o estrato córneo é composto por 10 a 20 camadas, que proporcionam uma barreira contra toxinas e microorganismos e retêm calor e água (12). Já os prematuros possuem poucas camadas de estrato córneo; a partir de 24 semanas de idade gestacional, eles podem ter apenas duas ou três camadas e, com idade gestacional inferior a 24 semanas, pode não haver estrato córneo (2, 13).

O estrato córneo do feto inicia seu desenvolvimento por volta de 24 semanas de gestação (13). Sua função de barreira torna-se madura entre 32 e 34 semanas de idade gestacional (14, 15, 16). No recém-nascido pré-termo, a barreira epidérmica desenvolve-se nas primeiras duas semanas do período pós-natal (13, 17), período em que o neonato é mais vulnerável devido à imaturidade da barreira (17). Em estudo realizado por Kalia e colaboradores com recém-nascidos pré-termo entre 23 e 32 semanas de idade gestacional, em sua maioria com menos de 26 semanas de idade gestacional, evidenciou-se que nos pré-termos com idade

gestacional entre 23 e 25 semanas o desenvolvimento funcional do estrato córneo pode necessitar mais de quatro semanas para se completar (16).

As funções fisiológicas da pele consistem em proteção contra prejuízos químicos e físicos, infecções, radiação ultravioleta, prevenção da perda de fluidos e manutenção da termorregulação. A pele atua nas sensações de dor, pressão, tato e temperatura, contribuindo na manutenção da pressão sangüínea através da vasodilatação e vasoconstrição de capilares periféricos, e possui precursores da vitamina D (11).

Entre as funções da pele, a mais importante é agir como barreira entre o meio interno e o ambiente, prevenindo a desidratação através da perda de água corporal, a absorção de substâncias químicas e a invasão de microorganismos da superfície da pele (3, 13, 15), além de proteção quanto a traumas e radiação ultravioleta, termorregulação e sensação tátil (3, 15).

Recém-nascidos a termo, com idade gestacional > 37 semanas segundo a Organização Mundial de Saúde (1), possuem barreira epidérmica competente, comparada com a dos adultos (16), porém mais fina e com menos sulcos (13). Recém-nascidos pré-termo possuem epiderme menos desenvolvida e menos preparada para enfrentar as condições extra-uterinas (16).

Durante a vida intra-uterina, a partir da 20<sup>a</sup> semana de gestação, a pele do feto é recoberta por uma substância gordurosa, denominada vérnix caseosa, que a protege do contato constante com o líquido amniótico e a urina. A vérnix caseosa, resultante da descamação de células da epiderme e do sebo secretado pelas glândulas sebáceas da pele, também minimiza a fricção da pele durante o parto (18, 19, 20). Essa camada isolante é perdida com o banho, e sua remoção expõe a pele ao ambiente seco após o nascimento (11).

A transição do recém-nascido do líquido amniótico para o ar ambiente impõe uma rápida adaptação pós-natal. As mudanças nas propriedades da barreira epidérmica ocorrem progressivamente nas primeiras quatro semanas de vida extra-uterina (21).

Os princípios gerais do cuidado com a pele envolvem as propriedades da barreira da epiderme, a perda de água transepidérmica e a absorção transcutânea (6, 16). A barreira epidérmica do pré-termo é ineficaz devido à imaturidade da epiderme (13). A disfunção da barreira manifesta-se através da inabilidade da pele em manter a homeostase decorrente da perda excessiva de fluidos (16, 17, 22). A maturação da barreira epidérmica, que é refletida pela diminuição da perda de água transepidérmica, envolve também a capacidade de reter umidade, a regulação da homeostase pelo pH e a coordenação de descamação e regeneração da pele (22, 23).

O desenvolvimento imaturo, associado à grande área de superfície corporal e à função da barreira epidérmica do recém-nascido pré-termo, pode causar perda de água transepidérmica (3). Essa perda, que pode ser de 10 a 15 vezes maior em pré-termos com idade gestacional inferior a 25 semanas do que em recém-nascidos a termo, pode resultar em perda de fluidos correspondente a 30% do peso corporal nas primeiras 24 horas e ter significativa associação com a morbidade causada por desidratação e hipotensão, com risco para hemorragia intraventricular e enterocolite necrosante (3). Além da perda de fluidos, a imaturidade da barreira epidérmica predispõe à absorção percutânea de produtos químicos e à vulnerabilidade ao trauma. A tendência a lesões de pele propicia um aumento no risco de crescimento bacteriano e infecção (13, 17, 24).

### **Acidificação da pele do recém-nascido**

O pH da pele do recém-nascido ao nascer é neutro (25, 21, 15), adquirindo uma tendência para acidez entre o terceiro e o quarto dias de vida e tornando-se ácido durante a

primeira semana de vida, tanto no recém-nascido a termo como no pré-termo (2, 21). A estabilização do pH similar ao dos adultos ocorre dentro do primeiro mês de vida (15, 26), com valores em torno de 5 (27). Em adultos, o pH ácido da pele tem sido associado com o decréscimo da colonização estafilocócica (28, 29).

O pH também é o responsável pela integridade e coesão do estrato córneo do adulto. Assim, o pH ácido propicia resistência à sua ruptura mecânica (30), ao passo que a neutralização do pH da epiderme provoca anormalidades funcionais, incluindo permeabilidade aumentada da barreira e diminuição da coesão e integridade do estrato córneo (31).

Devido à dificuldade em se obter material humano, as pesquisas sobre a análise da barreira epidérmica são desenvolvidas em ratos no período perinatal (fetos e recém-nascidos). As pesquisas em fetos de ratos em diversas fases da gestação possibilitaram a criação de um modelo experimental apropriado para o estudo da ontogênese da permeabilidade da barreira do estrato córneo (32, 33).

Embora o “manto ácido” tenha sido descrito há várias décadas (desde 1928), a sua origem e função ainda não estão completamente entendidas (25, 31, 34). A origem do pH ácido do estrato córneo vem sendo pesquisada por vários autores (25, 30, 31, 34, 35) e tem sido relacionada a processos endógenos e exógenos do estrato córneo (25, 36). Entre os processos endógenos, destaca-se a geração de ácidos graxos livres a partir da hidrólise fosfolipídica que ocorre durante a cornificação do estrato córneo e que regula a sua acidificação e integridade (30). Os mecanismos exógenos à epiderme foram, inicialmente, associados à produção de acidez pelos ácidos graxos livres de origem pilosebácea e aos metabólitos microbianos (28). Entretanto, em recente estudo realizado com estrato córneo de ratos recém-nascidos, foi constatado não haver correlação entre a colonização da flora normal bacteriana e a produção do pH ácido da epiderme, o que sugere que a colonização microbiana não é o mecanismo responsável pela acidificação pós-natal do estrato córneo (25).

Atualmente, sabe-se que a regulação do pH ácido da pele depende da ação dos lipídios gerados no estrato córneo. Este é composto por grande quantidade de lipídios hidrofóbicos dispostos na forma de múltiplas camadas de membranas entre as células cornificadas (13, 32). Os lipídios representam de 5% a 10% do peso do estrato córneo da pele madura. Apesar da reconhecida importância dos lipídios na função de barreira, pouca informação existe acerca do papel do conteúdo lipídico e da organização das camadas na maturação da barreira na espécie humana e em mamíferos (32).

A maturação do estrato córneo, que ocorre tardiamente no desenvolvimento fetal, gera uma competente barreira cutânea permeável, que proporciona defesa contra agressões do ambiente externo (25). Estudos experimentais em ratos têm demonstrado que a permeabilidade da barreira epidérmica desenvolvida no final da gestação ocorre simultaneamente ao aumento da produção de enzimas processadoras de lipídios, que são pH dependentes, e à redução do pH no estrato córneo (32, 34, 35, 36).

### **Higiene corporal do recém-nascido**

O recém-nascido normal pode receber o primeiro banho após a estabilização térmica (37). O primeiro banho remove a maior parte dos resíduos de sangue e de outras secreções maternas, minimizando, assim, a exposição do recém-nascido e de seus cuidadores aos microorganismos transmitidos pelo sangue, como o vírus da hepatite B, o de herpes simples e o HIV, entre outros (37).

No pré-termo, deve-se adiar o primeiro banho até que os sinais vitais estejam estáveis por várias horas (3). Esse período é necessário para que sejam observadas as condições respiratórias e circulatórias de adaptação à vida extra-uterina, bem como para permitir pronto atendimento de possíveis complicações decorrentes da imaturidade (38). O banho é um procedi-

mento estressante; ele pode ocasionar hipotermia e aumento do choro, com elevação no consumo de oxigênio, sofrimento respiratório e desestabilização dos sinais vitais. Durante o período que precede o primeiro banho, devem ser utilizadas as precauções universais, tais como o uso de luvas, para prevenir a exposição dos cuidadores a patógenos dos fluidos corporais (3).

O banho altera o pH da pele do recém-nascido. Durante o banho, a aplicação de agentes tópicos pode desfazer o manto ácido (12). Na maioria dos recém-nascidos normais, após a pele ser lavada com sabonete alcalino, é necessário o período de uma hora para que haja a regeneração do pH cutâneo. Nos bebês pré-termos, a normalização do pH necessita de mais tempo. Por isso, produtos de limpeza de pH alcalino não são recomendados para recém-nascidos (2, 39).

No banho do recém-nascido, é recomendado o uso de sabonete uma a duas vezes por semana, pois o seu uso diário altera o balanço químico da pele (8). O banho rotineiro diário é uma prática que causa ressecamento da pele, predispondo à ruptura (40). Somente após completar dois meses de idade, quando a pele tornar-se mais resistente, o bebê poderá receber banho diário com sabonete. Os recém-nascidos com peso inferior a 1.500 g não devem receber banho com sabonete devido ao ressecamento, descamação e quebra da integridade da pele causados pela ação do produto na pele (8). A falta de integridade da pele propicia a penetração de bactérias e fungos presentes na flora cutânea, podendo evoluir para infecção sistêmica (8, 41).

Estudo realizado por Munson e colaboradores nas UTIN de 139 hospitais americanos, sobre procedimentos no cuidado com a pele, constatou que, em 51% das unidades avaliadas, os recém-nascidos pré-termo de baixo peso ao nascer eram rotineiramente banhados. Dessas unidades, 15% utilizavam somente água e 85% faziam uso de algum tipo de produto de limpeza. Em cerca de 75% das unidades, usavam-se preferencialmente produtos de limpeza



líquidos, como os xampus ou banhos líquidos para bebê. Nos demais locais (25%), era usado algum tipo de sabonete comercial em barra (9).

Pesquisa realizada pela *Association of Women's Health Obstetric and Neonatal Nurses* – AWHONN (Associação de Enfermeiros da Saúde da Mulher, Obstétricos e Neonatais), nos Estados Unidos, investigou os cuidados com a pele em vários locais de assistência ao recém-nascido hospitalizado, na sua maioria em UTIN. A pesquisa foi realizada em 51 hospitais localizados em 27 Estados americanos (2, 42, 43).

O estudo da AWHONN buscou desenvolver as diretrizes para a prática clínica, baseadas em evidências, no cuidado com a pele no período neonatal. Primeiramente, foi realizada uma revisão da literatura das práticas baseadas em evidências. Em seguida, foi feito um levantamento das práticas adotadas por 4.755 enfermeiros dos 51 hospitais participantes do estudo. Após, os enfermeiros implantaram as recomendações das diretrizes baseadas em evidências em 2.820 recém-nascidos. E, finalmente, compararam-se os resultados observados antes e após a aplicação das recomendações das práticas nos hospitais do estudo (2, 42, 43).

A implementação das recomendações da AWHONN resultou em mudanças relevantes (44). Em relação ao banho do recém-nascido, houve diminuição na frequência e na adoção de sabonetes com pH neutro. No pré-termo com peso inferior a 1.000 g, passou a predominar o banho somente com água (43).

Segundo as diretrizes da AWHONN, as recomendações para o banho do recém-nascido são as seguintes:

- Evitar o banho diário com sabonete.
- Optar por sabonetes suaves, com pH neutro.
- Alternar banhos somente com água e banhos com água e sabonetes.

- Nos recém-nascidos pré-termo com < 32 semanas de idade gestacional (durante a primeira semana de vida), utilizar somente água morna com bolas ou compressas de algodão. Nas áreas lesionadas da pele, lavar somente com água esterilizada.
- Por não ser um procedimento inócua, os benefícios do banho diário necessitam ser claramente justificados (44).

### **Uso de sabonetes e detergentes**

Sabonete é um surfactante natural feito com sal de sódio ou de potássio. Detergente é um surfactante sintético que age como removedor. Os detergentes sintéticos, usualmente, representam alternativas mais suaves para sabonetes. Todos os detergentes contêm alguma forma de surfactante. Surfactantes são substâncias químicas que aderem à pele e induzem trocas que facilitam a remoção da sujeira e dos resíduos da superfície da pele (45).

Os termos sabonete e detergente são freqüentemente utilizados como sinônimos. Apesar das diferenças na composição química, eles costumam ser usados como palavras genéricas indicando algum produto de limpeza, incluindo desde um detergente de lavar roupas a um sabonete para as mãos (45).

Considerando-se que, na literatura científica consultada, os termos sabonete e detergente são referidos pelos autores de forma genérica, optou-se por manter essa generalização no texto para não descaracterizar as palavras dos autores.

O processo de limpeza consiste na remoção de gordura da camada externa da pele na qual a sujeira está aderida. Os surfactantes danificam os lipídios e as proteínas do estrato córneo e alteram a propriedade de barreira da epiderme (46). A pele saudável é ácida, com pH em torno de 5,5. O manto ácido evita colonização bacteriana e promove retenção de umidade

na barreira da pele (45, 47). A flora residente da pele é formada por diferentes espécies de bactérias, que são influenciadas pelo tipo de agente de limpeza utilizado (47). O aumento do pH da superfície da pele devido ao uso de sabonetes está relacionado com o crescimento de *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermides*. Os *Staphylococcus aureus* demonstram ótimo crescimento com pH cutâneo de 7,5 (47). Repetidas lavagens com sabonete podem reduzir a flora normal, propiciando um aumento na colonização da pele com *Staphylococcus coagulase* negativo. Esse efeito tem sido relacionado com a mudança do pH causada pelo sabonete (48).

Para os adultos, recomenda-se a escolha de um agente de limpeza com pH entre 4 e 7. O agente de limpeza ideal remove microorganismos indesejáveis enquanto mantém a função de barreira da pele (45). Sabonetes e detergentes alcalinos provocam aumento no pH cutâneo, afetando a proteção fisiológica da pele, o “manto ácido”, através da redução da gordura da epiderme (48). Uma nova geração de detergentes sintéticos com pH 5,5 tem se destacado por não modificar o pH da pele (47, 48).

Estudo realizado em adultos por Baranda e colaboradores, para testar a correlação entre pH e efeitos de irritação à pele, testando 17 produtos de limpeza (sabonetes e detergentes) indicados para pele seca e 12 produtos de limpeza (sabonetes e detergentes) comuns, evidenciou que os detergentes sintéticos, com pH entre 5,1 e 7,53, causam menos irritação à pele (48).

Lóden e colaboradores, em pesquisa realizada em adultos utilizando oito tipos de sabonetes de pH ácido tidos como suaves, evidenciaram que a interação entre as moléculas surfactantes e outros ingredientes da fórmula influenciam na irritação da pele. Mesmo após o enxágüe com água, os surfactantes deixam seus resíduos. Constatou-se, assim, que vários produtos para pele sensível apresentam efeitos irritantes (49).

Todos os sabonetes são potencialmente danosos à pele. Por isso, os especialistas recomendam diminuir seu uso no banho (46). Detergentes sintéticos ácidos são mais adequados do que outros tipos de agentes de limpeza (47). O uso de água pura na higiene da pele causa menos irritação do que os sabonetes suaves (49).

Quanto ao tipo de apresentação dos agentes de limpeza, a recomendação é que se prefiram os produtos líquidos a sabonetes em barra, pois estes são passíveis de contaminação por bactérias, como por exemplo as *Pseudomonas*, tornando-se um veículo para transmissão e disseminação de bactérias (45).

Conforme estudo realizado por Gfatter, Hack e Barun com bebês a partir de duas semanas até 16 meses de vida, todo agente de limpeza, inclusive a água de torneira, traz conseqüências para a superfície da pele do bebê. O banho com sabonete desencadeia um aumento no pH da pele que interfere na proteção fisiológica (manto ácido), provocando mudança na composição da flora bacteriana cutânea e na atividade das enzimas da epiderme. Outra conseqüência é a dissolução da gordura da superfície da epiderme, o que, influenciando nas condições de hidratação, predispõe à secura e à descamação da pele (39).

O uso de sabonetes e detergentes no pré-termo tem sido questionado na literatura. A maioria dos especialistas concorda que todos os sabonetes são um pouco irritantes, ressaltando que o seu uso freqüente aumenta a irritação da pele, porque, ao remover a sujeira, também é removido o filme lipídico da superfície da pele (39, 46, 47, 48, 49).

O grau de irritação provocado pelo uso dos sabonetes depende da duração do contato e da freqüência do banho. A escolha mais sensata é utilizar sabonetes com pH neutro com o mínimo de corantes e perfumes. Além disso, deve-se dar banho com sabonete nos recém-nascidos apenas duas ou três vezes por semana, reduzindo dessa forma o risco de sensibilização da pele (10).

Em pré-termos nascidos com idade gestacional inferior a 32 semanas, recomenda-se a utilização de água esterilizada morna para a remoção dos fluidos corporais, pois ela não altera a flora da pele (3). Em prematuros com menos de 26 semanas de idade gestacional, a utilização de água esterilizada é fundamental (2).

Sabonetes anti-sépticos como a clorexidina têm sido utilizados no primeiro banho do recém-nascido em muitos hospitais para prevenir a transmissão de infecção através de secreções vaginais maternas (2).

O uso de clorexidina a 4% no banho diário do recém-nascido pode resultar em absorção percutânea do produto, principalmente em bebês pré-termos (50). Porém, em bebês com barreira epidérmica não comprometida, pode-se usar uma solução aquosa de clorexidina a 0,25%, seguida de enxágüe (3).

No passado, era rotina em algumas regiões americanas a utilização de agentes anti-sépticos durante o banho. Esses agentes realmente diminuem a colonização da pele, efeito que dura pouco tempo, mas também irritam e ressecam a pele. Dentre os anti-sépticos, a clorexidina parece ser a alternativa mais segura; apesar de haver uma pequena absorção sistêmica, ela não foi associada com toxicidade sistêmica (3).

O hexaclorofeno é um produto anti-séptico que reduz a colonização por *Stafilococcus aureus*, mas sua absorção é altamente tóxica, principalmente em pré-termos, razão pela qual ele não deve ser usado, tendo seu uso sido abolido pela Academia Americana de Pediatria (2).

Atualmente, houve uma diminuição no uso de agentes anti-sépticos no banho, o que representa uma evolução nas práticas de enfermagem (5). Sabonetes de clorexidina e de povidine-iodo reduzem a colonização por quatro horas, mas também podem ser absorvidos. Como não conferem um longo tempo de redução de microorganismos, o uso de anti-sépticos no banho diário não é recomendado. Sabe-se que é comum o uso desses anti-sépticos nos hospitais durante o primeiro banho do neonato para uma melhor limpeza das secreções maternas,

as quais podem conter patógenos como o vírus HIV, porém não há estudos que apoiem o uso de anti-sépticos para esse fim (2).

Pouco se sabe sobre o efeito dos detergentes e sabonetes no banho do recém-nascido sobre a flora da pele, especialmente durante o período neonatal, quando a colonização está se estabelecendo (51). Em estudo realizado por Cowan e Frost (1986) para comparar o efeito entre sabonete de bebê e detergente para banho de bebê sobre a flora da pele dos recém-nascidos a termo, foi demonstrado que nenhum dos dois produtos foi efetivo na redução do crescimento de microorganismos indesejáveis. Não houve diferença significativa nas culturas de pele entre os neonatos banhados com um ou outro. O estudo não levou em conta o pH dos produtos utilizados (51).

Franck e colaboradores investigaram a frequência do banho em relação à colonização da pele de recém-nascidos pré-termo hospitalizados em UTIN. A frequência do banho foi de quatro em quatro dias. A pesquisa utilizou o banho de rotina com água e sabonete (Neutrogena<sup>®</sup>). Foram coletadas culturas de pele dos prematuros 30 minutos, 48 horas, 72 horas e 96 horas após o banho. Os autores, que consideraram os *Staphylococcus coagulase* negativos como flora normal da pele, identificaram esses microorganismos na pele de 93% dos pré-termos. Em 26% dos prematuros, ocorreu a presença de patógenos (*Enterococcus*, *Citrobacter*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*) nas culturas, pelo menos uma vez em alguma das coletas, sem contudo ter havido desenvolvimento de infecções durante o estudo. Os resultados sugerem que a frequência do banho de quatro em quatro dias nos pré-termos não aumenta o risco para infecção (52).

Os efeitos dos métodos de limpeza, como o uso de sabonete e água e o uso de apenas água, durante a internação em UTIN não foram relatados em estudos anteriores. Medves e O'Brien realizaram uma pesquisa com o primeiro banho após o nascimento, comparando o banho somente com água e o banho com sabonete e água em dois grupos randomizados de

recém-nascidos a termo. Eles fizeram culturas de pele dos neonatos antes e após o primeiro banho. Os resultados das culturas foram classificados como tendo crescimento de microorganismo ou sem crescimento de microorganismo. Não foram realizadas contagens de colônias, nem foi identificada a espécie do microorganismo. Os germes identificados nas culturas foram descritos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, “flora mista de pele”, difteróides e coliformes. O estudo evidenciou que, logo após o nascimento, tanto o primeiro banho com água e sabonete quanto o com somente água produzem efeito mínimo sobre a colonização bacteriana da pele. Os achados não apóiam, portanto, a eficácia do banho com água e sabonete na redução da colonização da pele (53).

### **Epidemiologia da colonização da pele**

Colonização da pele é definida como a presença da flora normal que protege a pele e que supre a barreira contra potenciais patógenos, por ajudar na manutenção do equilíbrio ácido normal. Infecções de pele ocorrem quando o equilíbrio entre a flora normal e os patógenos são interrompidos, como quando ocorrem lesões (53).

A colonização da pele é, pois, um processo normal que necessita de tempo para se estabelecer. Colonização é presença de microorganismo no hospedeiro, com crescimento e multiplicação, mas sem qualquer expressão clínica ou reação imune (54, 55). Ela ocorre naturalmente durante e depois do nascimento até que a flora normal seja estabelecida. A flora normal evolui e muda ao longo da vida do homem. A colonização pode resultar do contato com microorganismos exógenos associados com seres vivos ou com objetos inanimados. A flora normal da pele reduz a colonização por patógenos e mantém o equilíbrio do pH (53). São exemplos de bactérias normalmente encontradas na pele humana: *Staphylococcus*, *Micrococcus*,

*Neisseria*, *Peptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Acinetobacter*.

A maioria das pessoas carrega no mínimo cinco dessas espécies como flora normal (45).

A pele do recém-nascido é sensível ao ambiente. Quando a criança nasce, sua pele é estéril, a menos que se contamine pela flora vaginal (53). A superfície corporal do neonato torna-se rapidamente colonizada com microorganismos prevalentes no meio ambiente (53). A colonização pode ocorrer muito tempo ou imediatamente antes da infecção, porém representa um grande papel no desenvolvimento da infecção nosocomial (54).

Em circunstâncias normais, o neonato muda durante o processo do parto de um ambiente esterilizado para outro não-esterilizado. Ele estabelece a flora normal através do contato com a mãe durante o parto, com outras pessoas, com objetos inanimados e com o meio ambiente. Dentro de horas a dias, *Staphylococcus epidermidis* colonizam a pele (54).

A maioria dos neonatos saudáveis permanecem pouco tempo no hospital e, por isso, não adquirem a flora nosocomial. Assim, independentemente do peso de nascimento do neonato ou do tipo de parto, o recém-nascido torna-se colonizado e estabelece a flora normal similar à do adulto dentro de semanas após o parto (54).

No entanto, recém-nascidos internados em UTIN tendem a se tornar colonizados com a flora hospitalar, que possui microorganismos resistentes a antibióticos, como por exemplo bactérias gram-negativas (54). As culturas de pele dos neonatos internados em UTIN detectam *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Candida albicans*, microorganismos que refletem o tipo de colonização nosocomial (43).

Muitos patógenos, como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e a *Candida species*, entre outros, podem progredir de colonização para infecção, dependendo da gravidade da doença, da terapia antimicrobiana e da exposição a instrumentos invasivos ou procedimentos (54).



### **Colonização e infecção nosocomial**

Os recém-nascidos pré-termo possuem alto risco para o desenvolvimento de infecção, em razão da imaturidade da barreira epidérmica associada a um sistema imunológico pouco desenvolvido. O pré-termo assistido em uma UTIN necessita de uma variedade de procedimentos (venopunção, uso de sensores de temperatura, monitores transcutâneos, linhas intravasculares, tubos, sondas, sacos coletores de urina), os quais predispõem à formação de lesão na sua frágil epiderme. A lesão está sujeita à contaminação por microorganismos presentes no ambiente e na pele do neonato, o que o coloca em risco de desenvolver bacteremia e sepse associadas com bactéria cutânea e fungo. A ocorrência de infecção nosocomial em UTIN atinge índices de 30% (14).

As doenças infecciosas, a prematuridade e a asfixia ao nascer são as maiores causas de óbito neonatal no mundo. Nos países em desenvolvimento, a prevalência de sepse no recém-nascido pré-termo encontra-se entre 30% e 60%, com taxa de mortalidade de 40% a 70%. A metade desses casos ocorre na primeira semana de vida, quando a função da barreira epidérmica se encontra altamente comprometida (3).

Em razão da infecção nosocomial ser de origem multifatorial, os fatores envolvidos nessa patologia precisam ser analisados pelos profissionais da equipe de saúde que cuidam do recém-nascido pré-termo hospitalizado, para que possam ser geradas medidas preventivas de controle de infecção hospitalar (56).

A sepse é definida como presença de sinais e sintomas sugestivos de infecção (hipotermia, febre, apnéia ou bradicardia) acompanhados de hemocultura positiva. A sepse de início precoce, designada como de origem materna, ocorre antes de 72 horas e está associada à exposição à flora materna (56). Já a sepse de início tardio ocorre a partir de 3 dias de vida,

sendo sua origem materna menos freqüente. Por fim, pré-termos enfermos com longa hospitalização apresentam sepse de origem nosocomial (57).

### **Microflora cutânea do recém-nascido pré-termo na UTI Neonatal**

A ocorrência de bacteremia nosocomial é um fator significativo na morbidade e mortalidade neonatal. Kilbride e colaboradores realizaram um estudo em seis UTIN nos Estados Unidos mediante implementação de práticas em UTIN baseadas em evidências, tendo eles conseguido reduzir a incidência de bacteremia por *Staphylococcus coagulasse* negativo nos recém-nascidos hospitalizados. Dentre as práticas recomendadas, enfatizou-se a lavagem das mãos, porque as mãos das pessoas da equipe de saúde podem transmitir microorganismos que causam infecção nosocomial (58).

A microflora da pele consiste em microorganismos residentes e transitórios. A microflora transitória representa contaminação recente, podendo ela incluir os patógenos adquiridos de pacientes colonizados ou infectados. Essa microflora sobrevive apenas por um período limitado de tempo nas mãos dos cuidadores em UTIN, ao passo que a flora residente sobrevive e se multiplica na pele (59). Lavagem de mãos efetiva em UTIN deveria constituir-se num processo mecânico de remoção da flora transitória e num processo químico de remoção da flora residente (59).

A colonização dos pré-temos pode também provir de objetos que entram em contato com sua pele. Estudo realizado por Davies e colaboradores investigou a contaminação de brinquedos por fungo e bactéria nos berços da UTIN. As bactérias identificadas não foram classificadas como patogênicas ou não patogênicas, já que os prematuros extremos podem ser infectados por microorganismos que não são patogênicos para crianças e adultos. A pesquisa evidenciou que, com o tempo, todos os brinquedos tornam-se colonizados com bactérias

nosocomiais. Assim, o *Staphylococcus coagulase* negativo, por exemplo, foi detectado em 98% das culturas dos brinquedos encontrados nos berços neonatais. O estudo concluiu que brinquedos podem ser potenciais reservatórios para sepse nosocomial (60).

Estudo nacional multicêntrico realizado nos Estados Unidos por Sohn e colaboradores evidenciou que o *Staphylococcus coagulase* negativo é o patógeno encontrado em 48% das hemoculturas de infecções nosocomiais em UTIN. Os enterococos e a *Candida species* também foram identificados como patógenos responsáveis pelas infecções nosocomiais (61).

Nos últimos anos, o *Staphylococcus coagulase* negativo, especialmente o *Staphylococcus epidermidis*, tem-se revelado o patógeno mais prevalente nas graves infecções nosocomiais das UTIN (62). O *Staphylococcus coagulase* negativo é atualmente a principal causa de infecção com hemocultura positiva em UTIN (55, 58, 61, 63).

No passado, o *Staphylococcus coagulase* negativo foi considerado um microorganismo contaminante de pouca importância clínica; hoje, contudo, é reconhecido que ele possui um significativo potencial patogênico (63, 64).

Entre as várias espécies de *Staphylococcus coagulase* negativos, somente algumas produzem infecções em humanos. Quando o seu isolamento está relacionado com os achados clínicos, geralmente o *S. epidermidis* é o microorganismo responsável, representando de 50% a mais de 80% dos casos (64). Atualmente, diversas espécies de *Staphylococcus coagulase* negativos vêm sendo descritas como causadoras de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos, como por exemplo em recém-nascidos pré-termo e pacientes hospitalizados submetidos a procedimentos invasivos, entre outros. As infecções causadas por *Staphylococcus coagulase* negativos são geralmente adquiridas no ambiente hospitalar. As espécies responsabilizadas por estas infecções são *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. scheleiferi* e *S. saccharolyticus* (64).

A septicemia neonatal causada pelo *Staphylococcus coagulase* negativo é mais frequentemente causada por cepas resistentes a antibiótico presentes em neonatos e profissionais da UTIN, o que sugere contaminação cruzada (65).

Os *Staphylococcus coagulase* negativos fazem parte da flora normal da pele. Entretanto, septicemias e meningites neonatais com essas bactérias estão associadas a significativas taxas de morbidade e mortalidade. Apesar de esse germe estar presente na superfície da pele de muitos neonatos ao nascimento, a colonização da pele dos recém-nascidos ocorre rapidamente nos primeiros dias de vida. Suspeita-se que a terapia antimicrobiana possa estar relacionada com essa colonização. Os recém-nascidos muito colonizados possuem grande risco de adquirir infecção com cepas de *Staphylococcus coagulase* negativo resistentes a antibiótico (66).

O *Staphylococcus aureus*, também responsável por infecções nosocomiais, tem sido alvo de preocupação devido a relatos da presença de cepas emergentes dessa bactéria com suscetibilidade reduzida para vancomicina (62).

Outro patógeno importante causador de infecções neonatais é a *Candida species*, responsável por considerável morbidade e mortalidade, especialmente em pré-termos, uma vez que estes são frequentemente mais colonizados com espécies de fungos do que os neonatos a termo (67). A colonização prévia com *Candida species* é o maior fator de risco para candidemia (67, 68, 69).

Poucos são os estudos que têm investigado os fatores de risco para a colonização, particularmente em pacientes internados em UTI (67). Estudos para elucidar a epidemiologia da colonização, os mecanismos de colonização dos microorganismos patogênicos e as intervenções preventivas precisam ter prioridade nas pesquisas futuras (54).

## CONCLUSÕES

A colonização da pele do recém-nascido internado em UTIN é consequência de múltiplos fatores do ambiente hospitalar, entre eles o banho rotineiro. Sabe-se que esse procedimento interfere na proteção fisiológica da pele, o “manto ácido”, causando aumento no pH e propiciando a alteração dos microorganismos da flora normal da pele por microorganismos patogênicos do ambiente nosocomial. Poucas são as pesquisas documentadas sobre os efeitos do banho do pré-termo hospitalizado e a colonização da pele, justificando-se a necessidade de estudos que investiguem o banho do pré-termo internado em UTIN.

## REFERÊNCIAS

1. Segre CAM, Armellini PA. RN. 2. ed. São Paulo: Savier; 1985.
2. Lund C, Kuller J, Lane A, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: the scientific basis for practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999;28:241-54.
3. Darmstadt GL, Dinulos JG. Neonatal skin care. *Pediatr Clin North Am* 2000;47:757-82.
4. Morelli JG, Weston WL. Soaps and shampoos in pediatric practice. *Pediatrics* 1987;80:634-7.
5. Siegfried EC. Neonatal skin and skin care. *Dermatol clin* 1998;16:437-47.

6. Garcia-Gonzalez E, Rivera-Rueda MA. Neonatal dermatology: skin care guidelines, *Dermatol Nurs* 1998;10:274-5, 279-81.
7. Rutter N. The newborn skin. *Editorial Semin Neonatol* 2000;5:271.
8. Tamez RN, Silva MJ. *Enfermagem na UTI Neonatal: assistência ao recém-nascido de alto risco*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
9. Munson KA, Bare DE, Hoath SB, Visscher MO. A survey of skin care practices for premature low birth weight infants. *Neonatal Netw* 1999;18:25-31.
10. Lund C, Durand DJ. Skin and skin care. In: Merenstein GB, Gardner SL. *Handbook of neonatal intensive care*. 4th ed. St Louis: Mosby;1998. 317-31.
11. Blackburn ST, Loper DL. The integumentary system. In: Blackburn ST, Loper DL. *Maternal, fetal and neonatal physiology: a clinical perspective*. Philadelphia: Mosby; 1992. 491-521.
12. Lund C. Prevention and management of infant skin breakdown. *Nurs Clin North Am* 1999;34:907-20.
13. Cartlidge P. The epidermal barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:273-80.
14. Nopper AJ, Horii KA, Sookdeo-Drost S, Wang TH, Mancini AJ, Lane AT. Topical ointment therapy benefits premature infants. *J Pediatr* 1996;128:660-9.
15. Yosipovitch G, Maayan-Metzger A, Merlob P, Sirota L. Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatrics* 2000;106:105-8.
16. Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 1998;111:320-6.
17. Rutter N. Clinical consequences of an immature barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:281-7.
18. Moore KL. *Embriologia clínica*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
19. Youssef W, Wickett RR, Hoath SB. Surface free energy characterization of vernix caseosa: potential role in waterproofing the newborn infant. *Skin Res Technol* 2000;7:10-7.
20. Marchini G, Lindow S, Brismar H, Stabi B, Berggren V, Ulfgren A-K, et al. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *British J Dermatol* 2002;147:1127-34.
21. Visscher MO, Chatterjee R, Munson KA, Pickens WL, Hoath SB. Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol* 2000;17:45-51.
22. Giusti F, Martella A, Bertoni L, Seidenari S. Skin barrier, hydration, and pH of the skin of infants under 2 years of age. *Pediatr Dermatol* 2001;18:93-6.

23. Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002;19:256-62.
24. Askin DF. Bacterial and fungal infections in the neonate. *J Obstet Gynecol Neonatol Nurs* 1995;24:635-43.
25. Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Mao-Qiang M, et al. Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2004;122:320-9.
26. Fox C, Nelson D, Warechsm J. The timing of skin acidification in very low birth weight infants. *J Perinatol* 1998;18:272-5.
27. Öhman H, Vahlquist A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the acid skin mantle? *J Invest Dermatol* 1998;111:674-7.
28. Puhvel SM, Reisner RM, Sakomoto M. Analysis of lipid composition of isolated human sebaceous gland homogenates after incubation with cutaneous bacteria. Thin-layer chromatography. *J Invest Dermatol* 1975;64:406-11.
29. Aly R, Maibach H, Rahman R, Shinefield HR, Mandel AD. Correlation of human in vivo and in vitro cutaneous antimicrobial factors. *J Invest Dis* 1975;131:579-83.
30. Fluhr JW, Kao J, Jain M, Ahn SK, Feingold KR, Elias PM. Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J Invest Dermatol* 2001;117:44-51.
31. Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostases, and stratum corneum integrity/cohesion. *J Invest Dermatol* 2003;121:345-53.
32. Aszterbaum M, Menon GK, Feingold KR, Williams ML. Ontogeny of the epidermal barrier to water loss in the rat: correlation of function with stratum corneum structure and lipid content. *Pediatr Res* 1992;31:308-17.
33. Hoath SB, Tanaka R, Boyce ST. Rate of stratum corneum formation in the perinatal rat. *J Invest Dermatol* 1993;100:400-6.
34. Mauro T, Grayson S, Gao WN, Man M-Q, Kriehuber E, Behne M, et al. Barrier recovery is impeded at neutral pH, independent of ionic effects: implications for extracellular lipid processing. *Arch Dermatol Res* 1998;290:215-22.
35. Behne MJ, Barry NP, Hanson KM, Aronchik I, Clegg RW, Gratton E, et al. Neonatal development of stratum corneum pH: localization and mechanisms leading to emergence of optimal barrier function. *J Invest Dermatol* 2003;120:998-1006.

36. Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, et al. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. *J BiolChem* 2002;277:47399-406.
37. Kelly JM. Cuidados gerais. In: Avery GB, Fletcher MA, MacDonald MG. *Neonatologia: fisiologia e tratamento do recém-nascido*. 4. ed. São Paulo: Medsi; 1999. 302-12.
38. Askin DF. Complications in the transition from fetal to neonatal life. *J Obst Gynecol Neonatal Nurs* 2002; 31(3):318-26.
39. Gfatter R, Hackl P, Braun F. Effects of soap and detergents on skin surface pH, stratum corneum hydration and fat content in infants. *Dermatology* 1997;195:258-62.
40. Maguire DP. Skin protection and breakdown in the ELBW infant. *Clin Nurs Res* 1999;8(3):222-34.
41. Rowen JL, Atkins JT, Levy ML, Baer SC, Baker CJ. Invasive fungal dermatitis in the 1000-gram neonate. *Pediatrics* 1995;95:682-7.
42. Lund CH, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA, Thomas KK. Neonatal skin care: evolution of the AWHONN/NANN research-based practice project on nurse' knowledge and skin care practices. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30:30-40.
43. Lund CH, Osborne JW, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: clinical outcomes of the AWHONN/NANN evidence-based clinical practice guideline. *J Obste Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30:41-51.
44. Association of Women's Health, Obstetric and Neonatal Nurses (AWHONN). *Neonatal skin care: evidence-based clinical practice guideline*. Washington (DC): Association of Women's Health, Obstetric and neonatal Nurses (AWHONN); 2001. 54 p.
45. Nix DH. Factors to consider when selecting skin cleansing products. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2000;27:260-8.
46. Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. Soaps, shampoos, and detergents. *Clin Dermatol* 2001;19:393-7.
47. Schmid MH, Korting HC. The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. *Dermatology* 1995;191:276-80.
48. Baranda L, Gonzalo-Amaro R, Torres-Alvares B, Alvares C, Ramírez V. Correlation between pH and irritant effect of cleansers marked for dry skin. *Int J Dermatol* 2002;41:494-9.
49. Lodén M, Buraczewska I, Edlund F. The irritation potential and reservoir effect of mild soaps. *Contact Dermatitis* 2003;49:91-6.
50. Cowen J, Ellis SH, McAinsh J. Absorption of chlorhexidine from the intact skin of newborn infants. *Arch Dis Child* 1979;54:379-83.



51. Cowan ME, Frost MR. A comparison between a detergent baby bath additive and baby soap on the skin flora of neonate. *J Hosp Infect* 1986;7:91-5.
52. Franck LS, Quinn D, Zahr L. Effect of less frequent bathing of preterm infants on skin flora and pathogen colonization. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2000;29:584-9.
53. Medves JM, O'Brien B. Does bathing newborns remove potentially harmful pathogens from the skin? *Birth* 2001;28:161-5.
54. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:47-52.
55. Mussi-Pinhata MM, Nascimento SD. Neonatal nosocomial infections. *J Pediatr (Rio)* 2001;77(Supl.1):S81-S96.
56. Edwards WH. Preventing nosocomial bloodstream infection in very low birth weight infants. *Semin Neonatol* 2002;7:325-33.
57. Miura E. Sepses bacteriana. In: Miura E, Procianoy RS. *Neonatologia: princípios e prática*. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas;1997.
58. Kilbride HW, Wirtschafter DD, Powers R, Sheehan MB. Implementation of evidence-based potentially better practices to decrease nosocomial infections. *Pediatrics* 2003;111(Supl. 2):e519-e533.
59. Kilbride HW, Powers R, Wirtschafter DD, Sheehan MB, Charsha DS, LaCorte M, et al. Evolution and development of potentially better practices to prevent neonatal nosocomial bacteremia. *Pediatrics* 2003;111(Supl. 1):e504-e518.
60. Davies M, Mehr S, Garland ST, Morley CJ. Bacterial colonization of toys in neonatal intensive care cots. *Pediatrics* 2000;106:e18-e22.
61. Sohn AH, Garret DO, Sinkowitz-Cochran RL, Grohskopf LA, Levine GL, Stover BH. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. *J Pediatr* 2001;139:821-7.
62. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol* 2000;38:1740-6.
63. Savey A, Fleurette J, Salle BL. An analysis of microbial flora of premature neonates. *J Hosp Infect* 1992;21:275-89.
64. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.
65. Krediet TG, Jones ME, Janssen K, Gerards LJ, Flier A. Prevalence of molecular types and *mecA* gene carriage of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: relation to nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3376-8.

66. D'Angio CT, McGowan KL, Baumgart S, Geme JS, Harris MC. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J Pediatr* 1989;114:1029-34.
67. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin T. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1119-24.
68. Huang Y-C, Li C-C, Lin T-Y, Lien R-I, Chou Y-H, Wu J-L, et al. Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:819-22
69. Baley JE, Kliegman RM, Boxerbaum B, Fanaroff AA. Fungal colonization in very low birth weight infant. *Pediatrics* 1986;78:225-32.

# **1 INTRODUÇÃO**

---

## **1 INTRODUÇÃO**

---

A preservação da integridade da pele é um aspecto importante do cuidado durante o período neonatal, especialmente no caso do recém-nascido pré-termo, isto é, o nascido, segundo a Organização Mundial de Saúde, com idade gestacional < 37 semanas (SEGRE; ARMELLINI, 1985). De acordo com Darmstadt e Dinulos (2000), as doenças infecciosas, a prematuridade e a asfíxia ao nascer são as maiores causas de óbito neonatal no mundo. A prevalência de sepse em recém-nascido pré-termo após o terceiro dia de vida é de 21%, com taxa de mortalidade de 18% (STOLL, 2002). A maioria desses casos ocorre na primeira semana de vida, quando a função da barreira epidérmica se encontra altamente comprometida (DARSMTADT; DINULOS, 2000).

Entre os cuidados com a pele do pré-termo em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), está o banho com sabonete, um procedimento rotineiro e tradicional de higiene não justificado por evidências (FRANCK *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que essa rotina de banho pode trazer prejuízos à pele, devido à fragilidade da epiderme do recém-nascido (LUND *et al.*, 1999).

O banho do neonato visa remover resíduos presentes na pele e reduzir sua colonização. Porém, nem sempre o banho produz resultados benéficos. Os agentes químicos usados nos sabonetes podem causar irritação da pele e absorção de substâncias tóxicas, além de ocasionar estresse, hipotermia e aumento do choro, com elevação no consumo de oxigênio,

sofrimento respiratório e desestabilização dos sinais vitais (LUND *et al.*, 1999; DARMSTADT, DINULOS, 2000).

A pele do pré-termo merece cuidados especiais, pois quanto menor a idade gestacional do recém-nascido, maior é a imaturidade da pele. A pele é composta pela epiderme, derme e subcutâneo (LUND, 1999). A principal barreira da pele está localizada na camada mais superficial da epiderme, o estrato córneo, que consiste em camadas bilaminares consolidadas, compostas por lipídios hidrofóbicos (ácidos graxos, colesterol e ceramidas) localizados em espaços extracelulares de múltiplas camadas de células mortas e sem núcleo, denominadas corneócitos (células que migraram da camada basal para a superfície da epiderme), os quais estão firmemente unidos e cobertos por invólucro celular cornificado rico em proteína e queratina (CARTLIDGE, 2000; DARMSTADT; DINULOS, 2000).

O estrato córneo do feto inicia seu desenvolvimento por volta de 24 semanas de gestação (CARTLIDGE, 2000). A função de barreira torna-se madura funcionalmente entre 32 e 34 semanas de idade gestacional (NOPPER *et al.*, 1996; KALIA; NONATO, 1998; YOSIPOVITCH *et al.*, 2000). A transição do recém-nascido do líquido amniótico para o ar ambiente impõe uma rápida adaptação pós-natal (VISSCHER *et al.*, 2000). No recém-nascido pré-termo, a barreira epidérmica desenvolve-se nas primeiras duas semanas do período pós-natal, período em que ele é mais vulnerável devido à imaturidade da barreira (RUTTER, 2000; CARTLIDGE, 2000).

Dentre as funções da pele, a mais importante é a de agir como barreira entre o meio interno e o ambiente – prevenir desidratação através da perda de água corporal, evitar absorção de substâncias químicas e proteger da invasão de microorganismos da superfície da pele (CARTLIDGE, 2000; DARMSTADT; DINULOS, 2000; YOSIPOVITCH *et al.*, 2000). Além disso, ela protege contra traumas e radiação ultravioleta e provê termorregulação e

sensação tátil (BLACKBURN; LOPER, 1992; DARMSTADT; DINULOS, 2000; YOSIPOVITCH *et al.*, 2000).

Os princípios gerais do cuidado com a pele envolvem as propriedades da barreira da epiderme, a absorção transcutânea e a perda de água transepidermica (GARCIA-GONZALEZ; RIVERA-RUEDA, 1998; KALIA; NONATO, 1998). A maturação da barreira epidérmica, refletida pela diminuição da perda de água transepidermica, envolve também a capacidade de reter umidade, a regulação da homeostase pelo pH e a coordenação de descamação e regeneração da pele (GIUSTI *et al.*, 2001; HOEGER; ENZMANN, 2002).

O pH da pele do recém-nascido, ao nascer, é neutro (VISSCHER *et al.*, 2000; YOSIPOVITCH *et al.*, 2000; FLUHR *et al.*, 2004). A pele adquire uma tendência para acidez entre o terceiro e o quarto dias de vida, tornando-se ácida durante a primeira semana de vida, tanto no recém-nascido a termo como no pré-termo (LUND *et al.*, 1999; VISSCHER *et al.*, 2000). A estabilização do pH similar ao dos adultos ocorre dentro do primeiro mês de vida (FOX *et al.*, 1998; YOSIPOVITCH *et al.*, 2000).

A pele saudável é ácida, com pH em torno de 5,5. Esse manto ácido evita colonização bacteriana e promove retenção de umidade na barreira da pele (SCHMID; KORTING, 1995; NIX, 2000). A flora residente da pele é formada por diferentes espécies de bactérias que são influenciadas pelo tipo de agente de limpeza utilizado (SCHMID; KORTING, 1995). O aumento do pH da superfície da pele dos adultos, devido ao uso de sabonetes, está relacionado com o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Estudos mostram que *Staphylococcus aureus* têm ótimo crescimento com pH cutâneo de 7,5 (SCHMID; KORTING, 1995).

O uso de sabonetes e detergentes no pré-termo tem sido questionado na literatura. A maioria dos especialistas concorda que todos os sabonetes são um pouco irritantes. Seu uso freqüente aumenta a irritação da pele, porque, ao removerem a sujeira, também removem o

filme lipídico da superfície da pele (SCHMID; KORTING, 1995; GFATTER *et al.*, 1997; WOLF *et al.*, 2001; BARANDA *et al.*, 2002; LÓDEN *et al.*, 2003).

Estudo realizado nos Estados Unidos pela *Association of Women's Health Obstetric and Neonatal Nurses* – AWHONN (Associação das Enfermeiras da Saúde da Mulher, Obstétricas e Neonatais) criou e implementou as diretrizes baseadas em evidências, para o cuidado, na prática clínica, com a pele no período neonatal (LUND *et al.*, 1999; LUND *et al.*, 2001a; LUND *et al.*, 2001b). Segundo essas diretrizes, o banho do recém-nascido não é um procedimento inócua, razão pela qual os benefícios do banho diário necessitam ser claramente justificados. A associação recomenda que se evite o banho diário com sabonete, que se alternem banhos somente com água e banhos com água e sabonetes e que se opte por sabonetes suaves e com pH neutro. Nos recém-nascidos pré-termo com < 32 semanas de idade gestacional, deve-se utilizar somente água morna com bolas ou compressas de algodão durante a primeira semana de vida. As áreas lesionadas da pele devem ser lavadas somente com água esterilizada (*Association of Women's Health Obstetric and Neonatal Nurses*, 2001).

Medves e O'Brien (2001), em pesquisa sobre o primeiro banho após o nascimento, compararam o banho somente com água e o banho com sabonete e água em dois grupos randomizados de recém-nascidos a termo. No estudo, foram realizadas culturas de pele dos neonatos antes e após o primeiro banho. Os germes identificados nas culturas foram descritos como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, “flora mista de pele”, difteróides e coliformes. O estudo evidenciou que, logo após o nascimento, tanto o primeiro banho com água e sabonete quanto o com somente água produzem efeito mínimo sobre a colonização bacteriana da pele. Os achados não apóiam a eficácia do banho com água e sabonete na redução da colonização da pele (MEDVES; O'BRIEN, 2001).

A pele do recém-nascido é sensível ao ambiente. A superfície corporal do neonato torna-se rapidamente colonizada com microorganismos prevalentes no seu meio ambiente (MEDVES; O'BRIEN, 2001). Colonização é a presença de microorganismo no hospedeiro, com crescimento e multiplicação, mas sem qualquer expressão clínica ou reação imune (JARVIS, 1996; MUSSI-PINHATA; NASCIMENTO, 2001). A colonização ocorre naturalmente durante e depois do nascimento, até que a flora normal seja estabelecida. A flora normal evolui e muda ao longo da vida do homem. A colonização pode resultar do contato com microorganismos exógenos associados com seres vivos ou com objetos inanimados. Ela pode ocorrer muito tempo ou imediatamente antes da infecção, porém representa um papel importante no desenvolvimento da infecção nosocomial (JARVIS, 1996).

Os *Staphylococcus coagulase* negativos, especialmente o *Staphylococcus epidermidis*, têm emergido nos últimos anos como patógeno em crescimento nas graves infecções nosocomiais das UTIN (VILLARI *et al.*, 2000). São atualmente a principal causa de infecção com hemocultura positiva em UTIN (SAVEY *et al.*, 1992; DAVIES *et al.*, 2000; MUSSI-PINHATA; NASCIMENTO, 2001; KILBRIDE *et al.*, 2003).

O *Staphylococcus aureus*, também responsável por infecções nosocomiais, tem sido alvo de preocupação devido a relatos da presença de cepas com suscetibilidade reduzida para vancomicina (VILLARI *et al.*, 2000).

Outro importante patógeno causador de infecções neonatais é a *Candida species*, responsável por considerável morbidade e mortalidade, especialmente em pré-termos, que são freqüentemente mais colonizados com espécies de fungos do que os neonatos a termo (SAIMAN *et al.*, 2001). A colonização prévia com *Candida species* é o maior fator de risco para candidemia (BALEY *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 1998; SAIMAN *et al.*, 2001).

A utilização rotineira de agentes de limpeza no banho do recém-nascido pré-termo tem sido pouco estudada. A literatura a esse respeito é bastante escassa. O uso somente de água e o



uso de sabonete e água, em relação à colonização da pele dos recém-nascidos pré-termo, merece uma investigação específica. A proposta deste estudo é comparar a colonização da pele dos recém-nascidos pré-termo internados em UTIN que receberem banho somente com água com a dos que receberam banho com sabonete líquido neutro e água.

## **2 HIPÓTESE**

---

## **2 HIPÓTESE**

---

Os mecanismos envolvidos na colonização da pele do recém-nascido pré-termo internado em UTIN não estão totalmente esclarecidos, podendo o tipo de banho influenciar na quantidade de colônias e no tipo de microorganismos presentes na flora da pele dos recém-nascidos pré-termo.

## **3 OBJETIVOS**

---

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do banho somente com água e do banho com água e sabonete neutro sobre a flora microbiana da pele dos recém-nascidos pré-termo.

### 3.2 Objetivos específicos

- Comparar o tipo de microorganismo presente na flora cutânea dos recém-nascidos pré-termo banhados somente com água com o tipo de microorganismo presente na flora cutânea dos pré-termos banhados com sabonete neutro e água.
- Comparar a quantidade de colônias de microorganismos presentes na flora cutânea dos recém-nascidos pré-termo banhados somente com água com a dos pré-termos banhados com sabonete neutro e água.
- Comparar a quantidade de colônias de microorganismos presentes na flora cutânea no momento antes e no momento após o banho nos pré-termos banhados somente com água com as presentes, nos mesmos momentos, nos pré-termos banhados com sabonete neutro e água.

## **4 METODOLOGIA**

---

## 4 METODOLOGIA

---

### 4.1 Delineamento do estudo

A proposta metodológica para o desenvolvimento da pesquisa consistiu em um estudo experimental do tipo ensaio clínico randomizado cego.

### 4.2 População

#### 4.2.1 *População em estudo*

A população em estudo foi composta por todos recém-nascidos pré-termo internados na UTIN, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

#### 4.2.2 *População da pesquisa*

Recém-nascidos pré-termo nascidos no Centro Obstétrico (CO) do HCPA e admitidos na UTIN desse hospital no período de 01 de outubro de 2002 a 30 de dezembro de 2003, com idade gestacional entre 28 e 35 semanas e com peso ao nascer entre 800 g e 1.800 g.

## 4.3 Amostra e amostragem

### 4.3.1 Critérios de inclusão

Todos os recém-nascidos participantes da pesquisa nasceram no CO do hospital onde o estudo foi conduzido e foram admitidos na UTIN. Os pré-termos foram considerados elegíveis para o estudo conforme os seguintes critérios:

- a) idade gestacional entre 28 e 35 semanas;
- b) peso ao nascer entre 800 g e 1.800 g.
- c) participar do método Mãe Canguru (contato pele-a-pele).

Os pré-termos nascidos com idade gestacional < 28 semanas e peso < 800 g não foram incluídos porque apresentam maior imaturidade da epiderme que possui alto risco para lesões.

### 4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

- a) recém-nascidos pré-termo sem pele íntegra;
- b) recém-nascidos pré-termo com malformação congênita;
- c) filhos de mães com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV+);
- d) filhos de mães com qualquer infecção do grupo STORCH durante a gestação;
- e) recém-nascidos pré-termo com suspeita clínica ou com infecção comprovada no momento da coleta das culturas;
- f) recém-nascidos pré-termo que tivessem recebido antibioticoterapia dentro dos sete dias antes da coleta de cultura;
- g) recém-nascidos pré-termo que estivessem em ventilação mecânica no momento da coleta das culturas;



h) recém-nascidos pré-termo que estivessem com cateter intravenoso ou intra-arterial no momento da coleta das culturas;

i) recém-nascidos sem consentimento dos pais para participar da pesquisa.

#### 4.3.3 Recrutamento

Todos os recém-nascidos pré-termo que preencheram os critérios de elegibilidade admitidos na UTIN do hospital do estudo foram alocados aleatoriamente nos dois grupos através da randomização.

A inscrição e randomização no estudo ocorreu no terceiro dia de vida, período em que se avaliaram as condições clínicas do pré-termo e sua elegibilidade, ou não, para inclusão no estudo. A colonização cutânea nosocomial necessita de tempo para se estabelecer, portanto os três primeiros dias de vida foram considerados como parte do processo de formação da flora microbiana da pele dos pré-termos em ambos os grupos. Nos três primeiros dias de vida, todos os recém-nascidos pré-termo receberam banho com sabonete neutro líquido e água, de acordo com a rotina da unidade. Esses banhos não foram computados no estudo. A partir do quarto banho, quando do ingresso do pré-termo na pesquisa, ele recebeu um banho diário, por sete dias consecutivos, somente com água (grupo experimental) ou com água e sabonete neutro líquido (grupo controle). Após os sete banhos, foi realizada a coleta de dados.

Os sujeitos foram randomizados em blocos iguais de dez pré-termos cada um, contendo cada bloco cinco sujeitos do grupo experimental (grupo A) e cinco sujeitos do grupo controle (grupo B). Essa técnica visou garantir que o número de participantes fosse distribuído igualmente entre os grupos do estudo (HULLEY *et al.*, 2003). Utilizou-se o *Computer Program for Epidemiologists v.3.0* (PEPI) para a randomização em blocos (ABRAMSOM; GAHLINGER, 2000).

#### 4.4 Variáveis do estudo

**Variáveis predictoras:** randomização do tipo de banho diário, somente com água ou com água e sabonete neutro líquido.

**Variáveis de desfecho:** tipos de microorganismos (*Staphylococcus coagulase* negativo, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos, *Candida sp.*) identificados nas culturas e quantidade de colônias de microorganismos identificados na pele (axila direita), nos dois grupos (experimental e controle) de pré-termos randomizados, após sete dias consecutivos de banho diário somente com água ou banho diário com água e sabonete neutro líquido.

**Variáveis controladas:** idade gestacional = entre 28 e 35 semanas (a avaliação da idade gestacional foi determinada pelo método *New Ballard* (BALLARD *et al.*, 1991)), e peso de nascimento = entre 800 g e 1.800 g.

#### 4.5 Intervenção

Antes do estudo, os pré-termos internados na UTIN do HCPA recebiam rotineiramente, desde o primeiro banho após o nascimento, banhos diários com água e sabonete neutro líquido. Durante o estudo, os três primeiros banhos após o nascimento foram realizados com água e sabonete neutro líquido em todos os recém-nascidos, conforme a rotina da unidade. Após, os pré-termos foram randomizados para o grupo experimental ou para o grupo controle. O grupo experimental (grupo A) realizou a intervenção através de banho diário consecutivo, durante sete dias, somente com água. O grupo controle (grupo B) foi mantido dentro da rotina de banho da unidade, recebendo banho diário com água morna e sabonete neutro líquido.

Entre o 11<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dia de vida e de internação dos recém-nascidos pré-termo, realizou-se a coleta das culturas da pele na axila direita (ver 4.6.1). As bactérias pesquisadas foram *Staphylococcus coagulase* negativo, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos e os fungos *Candida sp.*, por serem os microorganismos responsáveis pela infecção neonatal na UTIN do HCPA, local em que se desenvolveu a pesquisa (HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE, 2001).

A idade dos pré-termos, na ocasião de coleta, variou, porque alguns receberam terapia antimicrobiana e necessitaram aguardar mais sete dias (após o término dos antibióticos), durante os quais receberam diariamente o tipo de banho para o qual haviam sido randomizados.

#### 4.6 Logística

Para a realização do estudo, foi composta uma equipe formada pelo orientador, pela pesquisadora e por três bolsistas acadêmicas da Escola de Enfermagem da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), devidamente orientadas e capacitadas. A análise dos exames das culturas foi realizada pela equipe do Laboratório de Microbiologia do HCPA sob coordenação da Dra. Suzana Barcelos. Duas alunas selecionadas obtiveram bolsa de iniciação científica (UFRGS e FAPERGS), e a terceira foi voluntária. Foi solicitado à enfermeira-chefe da unidade da Instituição em estudo que realizasse a divulgação da pesquisa nas reuniões com a equipe de enfermagem. A pesquisadora participou das reuniões, reforçando a importância da manutenção do tipo de banho dos recém-nascidos pré-termo incluídos no grupo experimental (grupo A) e no grupo controle (grupo B). Os técnicos de enfermagem foram orientados a realizar os banhos de acordo com a prescrição e com a supervisão dos enfermeiros, conforme os protocolos do banho somente com água e do banho com sabonete e água (Quadros 1 e 2).

A inclusão dos recém-nascidos foi feita pelas bolsistas, respeitando os critérios de elegibilidade da pesquisa. Após a seleção do pré-termo, foi solicitada a autorização dos pais, que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). Em seguida, a bolsista telefonava para a pesquisadora a fim de saber a randomização do pré-termo, ou seja, em que grupo (experimental ou controle) o neonato devia ser incluído. Esse cuidado foi tomado para evitar que a randomização fosse violada (HULLEY *et al.*, 2003). Essa estratégia impediu que os membros da equipe de pesquisa que tivessem contato com os sujeitos do estudo influenciassem a alocação. A inscrição dos sujeitos seguiu rigorosamente a ordem de randomização realizada pelo computador através do *Computer Program for Epidemiology*, versão 3.0 (PEPI). Após o ingresso dos pré-termos na pesquisa, os enfermeiros e os técnicos de enfermagem responsáveis pelo paciente eram informados da sua inclusão e era prescrito o tipo de banho, conforme a randomização. Na incubadora e na pasta do paciente, era afixada uma fita adesiva de cor azul, identificando os pacientes que deveriam receber banho somente com água (intervenção), além de uma pequena etiqueta, também afixada na incubadora, com os dizeres “banho somente com água”. No caso do grupo do banho com sabonete neutro e água, não foi necessária a identificação, pois esse seguiu a rotina da unidade. Após o ingresso do pré-termo no estudo, diariamente, a mesma bolsista revisava, junto à equipe de enfermagem, a manutenção do banho do recém-nascido e revisava o registro do banho na planilha de procedimentos de enfermagem a fim de checar se estava tudo de acordo com o prescrito. Após sete dias consecutivos de banho diário conforme o grupo alocado (experimental ou controle), era realizada a coleta das culturas nos sujeitos. Próximo ao momento da coleta, a bolsista agendava o dia da coleta dos *swabs*, comunicando-o à equipe de enfermagem. Apenas duas bolsistas estavam autorizadas a entrar na unidade para supervisionar o tipo de banho de cada pré-termo. Havia uma terceira bolsista (cega), incluída na pesquisa somente para realizar a coleta das culturas, que não se envolva com nenhum outro

tipo de atividade do estudo. No dia da coleta, a bolsista coletadora “cega” se encontrava com uma das bolsistas conhecedoras da pesquisa no Laboratório de Microbiologia para aquisição de dois tubos de ensaio com caldo glicosado (caldo de cultura para o *swab*). Depois, ambas se dirigiam à Unidade de Internação Neonatal (UIN). Antes de entrarem na unidade, a bolsista coletadora “cega” aguardava na sala ao lado da unidade o chamado da outra bolsista e pegava o *swab* de algodão com haste plástica esterilizado (sem meio de cultura, Marca Steriler<sup>®</sup>, Italy) que se encontrava estocado em um armário destinado à pesquisa. Enquanto isso, a outra bolsista entrava na sala onde o pré-termo estava internado e combinava com a técnica de enfermagem a execução do banho, cobrindo a incubadora com lençol no local da identificação e escondendo a pasta e a prancheta do paciente, evitando, assim, deixar sinais de alusão ao tipo de banho realizado, ou seja, “mascarando” o tipo de banho. Após, a bolsista coletadora “cega” era convidada a entrar para realizar a coleta da cultura I (antes do banho do pré-termo). Após a coleta, o *swab* era identificado (nome do paciente, número do projeto de pesquisa no HCPA e data) e transportado pela bolsista coletadora “cega”, imerso no caldo de cultura do tubo de ensaio, na posição vertical, dentro de um suporte metálico. Durante esse período, a técnica de enfermagem realizava o banho do pré-termo sob a supervisão da outra bolsista. Quando a bolsista coletadora “cega” retornava do Laboratório de Microbiologia, ela ficava aguardando fora da unidade até ser autorizada a sua entrada pela outra bolsista. Transcorridos 30 minutos da realização do banho, era realizada a coleta da cultura II (após o banho) pela bolsista “mascarada” para o tipo de banho. Em seguida, o *swab* era identificado e encaminhado pelas duas bolsistas para o laboratório, seguindo os mesmos cuidados no transporte descritos anteriormente. A análise das culturas foi realizada no Laboratório de Microbiologia.

A autora do projeto foi responsável pela pesquisa, pela equipe e pelos trâmites necessários para a realização da mesma. O processo de sistematização e redação da pesquisa foi de

responsabilidade da pesquisadora. O tratamento estatístico foi acompanhado por um profissional da área, e o trabalho final foi revisado quanto à ortografia e gramática por profissional especializado. Todos os passos da pesquisa foram acompanhados pelo professor orientador.

#### 4.6.1 Procedimentos de coleta de dados

Os recém-nascidos pré-termo foram randomizados para ingressar no grupo A (experimental) e no grupo B (controle). Os procedimentos da coleta de dados foram os seguintes: cada recém-nascido pré-termo recebeu, conforme a randomização, sete banhos de aspersão somente com água ou com sabonete neutro líquido e água.

**Grupo A (experimental):** recém-nascidos pré-termo que receberam sete banhos de aspersão somente com água, conforme protocolo deste banho (Quadro 1).

**Quadro 1** - Protocolo do banho de aspersão somente com água

<b>Equipamento</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Água morna com pH = 6,77*</li><li>- Compressas de algodão (15 x 15 cm)</li><li>- Bacia de inox esterilizada</li></ul>
<b>Procedimentos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Lavar a face com compressa úmida e secar.</li><li>- Lavar o couro cabeludo com compressa úmida e secar.</li><li>- Lavar o pescoço, abdome, dorso e extremidades com compressa úmida.</li><li>- Lavar os genitais e nádegas com compressa úmida.</li><li>- Secar todo o corpo.</li><li>- Colocar fralda.</li><li>- Posicionar o bebê.</li></ul>

\* pH de três amostras coletadas de torneiras da Unidade de Internação Neonatal, pH medido na Farmácia Industrial do HCPA.

**Grupo B (controle):** recém-nascidos pré-termo que receberam sete banhos de aspersão com sabonete neutro líquido e água, conforme protocolo deste banho (Quadro 2).

**Quadro 2** - Protocolo do banho de aspersão com sabonete neutro líquido e água

<b>Equipamento</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Água morna com pH = 6,77*</li><li>- Sabonete** neutro líquido contendo texapon SBN (detergente), dehyton KB (coco de amido), plantaren 2000 (detergente), glicerina (emoliente), coperlan KDB (espessante), ácido cítrico, cloreto de sódio e água deionizada, com pH 7</li><li>- Compressas de algodão (15 x 15 cm)</li><li>- Bacia de inox esterilizada</li><li>- Cuba redonda de inox esterilizada</li></ul>
<b>Procedimentos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Lavar a face com compressa úmida e secar.</li><li>- Lavar o couro cabeludo com compressa úmida ensaboada.</li><li>- Enxaguar o couro cabeludo com água morna e secar.</li><li>- Lavar o pescoço, abdome, dorso e extremidades com compressa úmida ensaboada.</li><li>- Enxaguar o pescoço, abdome, dorso e extremidades com água morna.</li><li>- Lavar os genitais e nádegas com compressa úmida ensaboada.</li><li>- Enxaguar os genitais e nádegas com água morna.</li><li>- Secar todo o corpo.</li><li>- Colocar fralda.</li><li>- Posicionar o bebê.</li></ul>

\* pH de três amostras coletadas de torneiras da Unidade de Internação Neonatal, pH medido na Farmácia Industrial do HCPA.

\*\* Fórmula manipulada na Farmácia Industrial do HCPA.

A coleta das culturas da pele dos pré-termos de ambos os grupos ocorreu entre o 11<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dia do período de internação hospitalar, após eles terem recebido sete banhos consecutivos conforme o grupo da randomização. Antes do banho (cultura I – pré-banho) e após 30 minutos do banho (cultura II – pós-banho), foram coletas amostras para cultura da pele de todos os pré-termos, de ambos os grupos. A coleta do material para cultura na axila baseou-se na técnica utilizada por Franck *et al.* (2000) em seu estudo sobre a colonização da pele de pré-termos *versus* frequência do banho. De acordo com esses autores, a axila é uma das primeiras áreas da pele do recém-nascido a se tornar colonizada por microorganismos.

O procedimento de coleta foi realizado da seguinte forma: um *swab* de algodão foi mergulhado em 5 ml de caldo de soja tripcaseína (caldo glicosado) e, após, foi pincelado 10 vezes na axila direita numa mesma área de 2 cm<sup>2</sup>. A ponta de algodão do *swab* foi pincelada

na axila cinco vezes na direção vertical e cinco vezes na horizontal. Essa mesma extremidade de algodão do *swab* foi recolocada no caldo de soja trip-caseína e enviada ao Laboratório de Microbiologia imediatamente após a coleta.

A coleta foi feita pela bolsista, sem o conhecimento do tipo de produto utilizado no banho (somente com água ou com sabonete e água). Durante o procedimento do banho, a bolsista se ausentou do local (tornando “cego” o sujeito para a coletadora).

#### 4.7 Método microbiológico empregado nas culturas

No laboratório de microbiologia, o *swab* foi removido do tubo de ensaio, e o caldo de cultura sofreu agitação em vortex. Após, 50 µl (0,05 ml) do caldo de cultura foram semeados por esgotamento em ágar sangue de carneiro. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de cada microorganismo foi determinado no período de incubação, que durou 48 horas, a 35°C de temperatura. A conversão dos resultados para ml foi feita através do fator de multiplicação igual a 20, em razão do volume semeado ser de 0,05 ( $20 \times 0,05 = 1$  ml). Conforme os procedimentos-padrão utilizados na Unidade de Microbiologia do HCPA (CASKEY, 1992), a identificação dos microorganismos baseou-se na análise morfológica das colônias, em provas bioquímicas e no uso do sistema automatizado mini API<sup>®</sup> (bioMérieux, Dulham, USA).

Os microorganismos pesquisados incluíram as bactérias do tipo *Staphylococcus coagulase* negativo, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos e os fungos *Candida sp.*

Todos os *swabs* foram enviados ao Laboratório de Microbiologia sem identificação quanto ao tipo de banho do pré-termo, tornando o microbiologista “mascarado” ao realizar a análise das culturas.



## 4.8 Banco de dados

Cada recém-nascido pré-termo teve, dentro do banco de dados, uma identificação numérica única numa ficha de protocolo, onde foram registrados os dados de identificação dos sujeitos (Anexo B).

## 4.9 Aspectos estatísticos

### 4.9.1 Cálculo do tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho da amostra, utilizou-se como referência o estudo de Franck *et al.* (2000), estimando-se que a diferença de proporção de microorganismos entre os grupos fosse de 34% (26% *versus* 60%).

Utilizou-se para esse cálculo um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) e um poder de 80% ( $\beta = 0,2$ ). Calculando-se serem necessários 33 pré-termos para cada grupo (experimental e controle), num total de 66 sujeitos, acrescentaram-se 10 sujeitos em cada grupo para suprir as perdas e exclusões, totalizando-se 86 sujeitos (43 recém-nascidos pré-termo em cada grupo). O programa utilizado para este cálculo foi o *Computer Program for Epidemiologists v.3.0* (PEPI) (ABRAMSOM; GAHLINGER, 2000).

### 4.9.2 Análise estatística

Os resultados das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram resumidos pela mediana com amplitude interquartil (percentil 25 e percentil 75) e expressos na potência  $10^3$ .

Em virtude dos dados em UFC terem apresentado distribuição assimétrica, utilizou-se a função logarítmica para a sua transformação em distribuição simétrica, o que possibilitou o emprego de testes paramétricos. Segundo Altman (1994), através dos *logs* dos dados da distribuição assimétrica se obtém freqüentemente uma distribuição muito próxima da normal, dessa forma a utilização da função logarítmica (*Lognormal Distribution*) permite o uso de testes paramétricos na comparação entre grupos.

O momento basal (cultura antes do banho) dos grupos foi comparado pelo teste *t* de Student para amostras independentes; as demais comparações foram realizadas pela análise de variância de medidas repetidas (HOPKINS, 1997).

Os dados categóricos envolvendo a ocorrência ou não dos diferentes microorganismos estudados foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Dados demográficos também foram comparados entre os grupos utilizando-se *t* de Student e qui-quadrado. O nível de significância estatística aceito foi de  $\alpha = 0,05$ . Para a análise dos dados, utilizou-se o *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 10.0).

#### **4.10 Considerações éticas**

Toda pesquisa realizada com seres humanos compreende riscos. Os aspectos éticos relativos à pesquisa em saúde visam assegurar o respeito e a dignidade ao ser humano (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Preocupados com as questões éticas, os pesquisadores realizaram o mínimo de intervenções não invasivas nos recém-nascidos pré-termo. O banho utilizado em ambos os grupos (controle e experimental) baseou-se nas recomendações atuais da literatura científica e nos procedimentos de rotina adotados na UTIN. O procedimento de coleta dos dados foi realizado através de movimentos suaves do *swab* de algodão estéril em contato com a pele, o que constitui pesquisa com risco mínimo (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Os pais dos prematuros selecionados para o estudo foram informados dos objetivos e procedimentos, com garantia de anonimato e da possibilidade de desistência em qualquer momento do seu desenvolvimento. Estando de acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, através da Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, sob número 02-318.

## **5 REFERÊNCIAS**

---

## 5 REFERÊNCIAS

---

Abramson JH, Gahlinger PM. Computer programs for epidemiologists: PEPI v.3.0. Sal Lake City, Utah: Sagesbrush Press; 2000.

Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall; 1994.

Association of Women's Health, Obstetric and Neonatal Nurses (AWHONN). Neonatal skin care: evidence-based clinical practice guideline. Washington (DC): Association of Women's Health, Obstetric and neonatal Nurses (AWHONN); 2001.

Baley JE, Kliegman RM, Boxerbaum B, Fanaroff AA. Fungal colonization in very low birth weight infant. *Pediatrics* 1986;78:225-32.

Ballard JL, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman L, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991;119:417-23.

Baranda L, Gonzalo-Amaro R, Torres-Alvares B, Alvares C, Ramírez V. Correlation between pH and irritant effect of ceansers marked for dry skin. *Int J Dermatol* 2002;41:494-9.

Blackburn ST, Loper DL. The integumentary system. In: Blackburn ST, Loper DL. Maternal, fetal and neonatal physiology: a clinical perspective. Philadelphia: Mosby; 1992. p. 491-521.

Cartlidge P. The epidermal barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:273-80.

Caskey LJ. Processing of skin and subcutaneous: tissue specimens. In: Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. vol. I, 1992. 356 p.

Conselho Nacional de Saúde. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Disponível em: <http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm> Acesso em: 28 jul. 2004.

Darmstadt GL, Dinulos JG. Neonatal skin care. *Pediatr Clin North Am* 2000;47:757-82.

Davies M, Mehr S, Garland ST, Morley CJ. Bacterial colonization of toys in neonatal intensive care cots. *Pediatrics* 2000;106(2):e18-e22.

Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Mao-Qiang M, et al. Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2004;122:320-9.

Fox C, Nelson D, Warechsm J. The timing of skin acidification in very low birth weight infants. *J Perinatol* 1998;18:272-5.

Franck LS, Quinn D, Zahr L. Effect of less frequent bathing of preterm infants on skin flora and pathogen colonization. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2000;29:584-9.

Garcia-Gonzalez E; Rivera-Rueda MA. Neonatal dermatology: skin care guidelines. *Dermatol Nurs* 1998;10:274-5, 279-81.

Gfatter R, Hackl P, Braun F. Effects of soap and detergents on skin surface pH, stratum corneum hydration and fat content in infants. *Dermatology* 1997;195:258-62.

Giusti F, Martella A, Bertoni L, Seidenari S. Skin barrier, hydration, and pH of the skin of infants under 2 years of age. *Pediatr Dermatol* 2001;18:93-6.

Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002;19(3):256-62.

Hopkins WG. A new view of statistics: repeated-measures ANOVA with two trials plus a between-subjects effect model. Disponível em: <http://www.sportsci.org/resource/stats/twotrials.html>. Acesso em: 08 jan. 2004.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Serviço de Controle de Infecção Hospitalar. Relatório de infecções hospitalares: neonatologia. Porto Alegre: jan. 2001.

Huang Y-C, Li C-C, Lin T-Y, Lien R-I, Chou Y-H, Wu J-L, et al. Association of fungal colonization and invasive disease in very low birth weight infants. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:819-22

Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady D, Hearst N, Newman TB. Delineando a pesquisa clínica: uma abordagem epidemiológica. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2003.

Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17:47-52.

Kalia YN, Nonato LB, Lund CH, Guy RH. Development of skin barrier function in premature infants. *J Invest Dermatol* 1998;111:320-6.

Kilbride HW, Wirtschafter DD, Powers R, Sheehan MB. Implementation of evidence-based potentially better practices to decrease nosocomial infections. *Pediatrics* 2003;111(Supl. 2):e519-e533

Lodén M, Buraczewska I, Edlund F. The irritation potential and reservoir effect of mild soaps. *Contact Dermatitis* 2003;49:91-6.

Lund C. Prevention and management of infant skin breakdown. *Nurs Clin North Am* 1999;34:907-20.

Lund C, Kuller J, Lane A, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: the scientific basis for practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999;28:241-54.

Lund CH, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA, Thomas KK. Neonatal skin care: evolution of the AWHONN/NANN research-based practice project on nurse' knowledge and skin care practices. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30:30-40. a.

Lund CH, Osborne JW, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: clinical outcomes of the AWHONN/NANN evidence-based clinical practice guideline. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30:41-51. b.

Medves JM, O'Brien B. Does bathing newborns remove potentially harmful pathogens from the skin? *Birth* 2001;28:161-5.

Mussi-Pinhata MM, Nascimento SD. Neonatal nosocomial infections. *J Pediatr (Rio)* 2001;77 (Supl.1):S81-S96.

Nix DH. Factors to consider when selecting skin cleansing products. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2000;27:260-8.

Nopper AJ, Horii KA, Sookdeo-Drost S, Wang TH, Mancini AJ, Lane AT. Topical ointment therapy benefits premature infants. *J Pediatr* 1996;128:660-9.

Rutter N. Clinical consequences of an immature barrier. *Semin Neonatol* 2000;5:281-7.

Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin T. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1119-24.

Savey A, Fleurette J, Salle BL. An analysis of microbial flora of premature neonates. *J Hosp Infect* 1992;21:275-89.

Segre CAM, Armellini PA. RN. 2. ed. São Paulo: Savier; 1985.

Schmid MH, Korting HC. The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. *Dermatology* 1995;191:276-80.

Stoll BJ, Hansen N, Fannaroff AA, Wright L, Carlo WA, Ehrenkrans R, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics* 2002; 2:285-91.

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

Visscher MO, Chatterjee R, Munson KA, Pickens WL, Hoath SB. Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol* 2000;17:45-51.

Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. Soaps, shampoos, and detergents. *Clin Dermatol* 2001; 19:393-7.

Yosipovitch G, Maayan-Metzger A, Merlob P, Sirota L. Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatrics* 2000;106:105-8.



**Artigo em Português**

---

**EFEITO DO BANHO SOBRE A FLORA MICROBIANA  
DA PELE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

---

## **EFEITO DO BANHO SOBRE A FLORA MICROBIANA DA PELE DE RECÉM-NASCIDOS PRÉ-TERMO**

---

Maria Luzia Chollopetz da Cunha (1)

Renato S. Procianoy (2)

- (1) Profa. Assistente do Departamento de Enfermagem Materno-Infantil - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Mestre em Enfermagem.
- (2) Prof. Titular de Pediatria - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Chefe do Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Pesquisador 1 A CNPq.

Endereço para correspondência:  
Maria Luzia Chollopetz da Cunha  
Rua São Manoel, 963 - Campus da Saúde  
CEP: 90.620-110 - Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (0XX51) 3316 5428  
e-mail: [luzia@adufrgs.ufrgs.br](mailto:luzia@adufrgs.ufrgs.br)

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do banho somente com água e do banho com sabonete neutro e água sobre a flora microbiana cutânea, comparando a quantidade de colônias e o tipo de microorganismos presentes na pele dos recém-nascidos pré-termo antes e após o banho.

**Método:** Ensaio clínico randomizado cego, com 73 pré-termos de idade gestacional entre 28 e 35 semanas e peso de nascimento entre 800 g e 1.800 g, alocados por randomização para um grupo que recebeu sete banhos somente com água ou para outro grupo que recebeu sete banhos com sabonete neutro e água. Foram coletados *swabs* da região axilar antes e após o banho para comparação da flora cutânea de ambos os grupos.

**Resultados:** O *Staphylococcus coagulase* negativo foi o microorganismo com maior prevalência nos dois grupos. Na comparação, entre os grupos, da contagem de colônias de microorganismos, não houve diferença significativa. A comparação do número de UFC realizada pela ANOVA de medidas repetidas, mostrou uma diferença significativa ao longo do tempo dos germes gram-positivos ( $P < 0,001$ ) e dos germes gram-negativos ( $P = 0,032$ ) nos dois grupos, indicando que a colonização da pele diminuiu em ambos os grupos de maneira semelhante, sem haver diferença significativa entre os dois grupos de pré-termos.

**Conclusões:** O banho do pré-termo com sabonete neutro e água e o banho somente com água produzem efeitos semelhantes sobre a colonização da pele do recém-nascido pré-termo hospitalizado em UTIN, sendo ambos eficazes na redução do número de colônias de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

**Palavras chave:** flora microbiana da pele, banho, recém-nascido pré-termo.

## INTRODUÇÃO

A preservação da integridade da pele é fundamental no período neonatal, especialmente em recém-nascidos pré-termo internados em unidade de terapia intensiva neonatal (UTIN) (1, 2). A prevalência de sepse em recém-nascido pré-termo, após o terceiro dia de vida, é de 21%, com taxa de mortalidade de 18% (3). A grande maioria desses casos ocorre na primeira semana de vida, quando a função da barreira epidérmica se encontra altamente comprometida (4).

Entre os cuidados com a pele do recém-nascido pré-termo, o banho com sabonete é um procedimento rotineiro que segue uma tradição de higiene sem justificativa baseada em evidências (5). No entanto, essa rotina de banho pode trazer prejuízos à pele, devido à fragilidade da epiderme (6). A maioria dos autores afirma que todos os sabonetes são irritantes e ressaltam que o seu uso freqüente é prejudicial, porque esses agentes removem o filme lipídico da superfície da pele (7, 8, 9, 10, 11). Fisiologicamente, o pH da pele, que é neutro no nascimento do indivíduo, torna-se ácido durante a primeira semana de vida, com pH variando entre 5,0 e 5,5 (6, 12, 13, 14, 15, 16). Esse “manto ácido” diminui a colonização bacteriana e promove a retenção de umidade na barreira da pele (7, 17). Entretanto, o banho pode desfazer o “manto ácido”, aumentando o pH cutâneo (8, 18).

A pele do recém-nascido é rapidamente colonizada por microorganismos prevalentes no meio ambiente (19). A flora normal, que reduz a colonização por patógenos e mantém o equilíbrio do pH, pode também desempenhar um papel importante na gênese de infecção (19,

20). O *Staphylococcus coagulase* negativo, existente na flora normal da pele, é o principal responsável por infecção neonatal tardia (17, 21, 22, 23, 24)

Os mecanismos envolvidos na colonização da pele do recém-nascido pré-termo internado em UTIN não estão totalmente esclarecidos (25). Nossa hipótese é que o tipo de banho possa influenciar na quantidade de colônias e no tipo de microorganismos presentes na flora da pele dos recém-nascidos pré-termo. A proposta deste estudo é comparar o tipo de microorganismo e a quantidade de colônias presentes na pele dos recém-nascidos pré-termo internados em UTIN antes e após o banho quando utilizados somente água ou sabonete neutro e água.

## PACIENTES E MÉTODOS

Foi realizado um ensaio clínico randomizado cego com recém-nascidos pré-termo, nascidos com idade gestacional entre 28 e 35 semanas e com peso ao nascimento entre 800 g e 1.800 g, que realizaram o método Mãe Canguru. Participaram da pesquisa os pré-termos que nasceram no Centro Obstétrico (CO) e foram admitidos na UTIN do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de 1º de outubro de 2002 a 31 de dezembro de 2003. A avaliação da idade gestacional, realizada logo após o nascimento, foi determinada pelo método *New Ballard* (26).

**Os critérios de exclusão foram:** recém-nascidos pré-termo sem pele íntegra, com malformação congênita, filhos de mães com soropositividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV+), filhos de mães com qualquer infecção do grupo STORCH durante a gestação, recém-nascidos pré-termo que apresentavam suspeita clínica ou infecção comprovada no momento da coleta das culturas, que tivessem recebido antibioticoterapia dentro dos sete últimos dias antes da coleta das culturas, ou que estivessem em ventilação mecânica no

momento da coleta das culturas, que estivessem com cateter intravenoso ou intra-arterial no momento da coleta das culturas.

Todos os recém-nascidos pré-termo, nascidos no período de coleta de dados, que preencheram os critérios de elegibilidade do estudo foram randomizados para alocação no grupo A ou no grupo B. O grupo A consistiu de recém-nascidos pré-termo que receberam o banho diário somente com água durante sete dias consecutivos. O grupo B consistiu de recém-nascidos pré-termo que receberam o banho diário com sabonete neutro líquido e água durante sete dias consecutivos. Os sujeitos foram randomizados em blocos de 10 pré-termos cada um, contendo cada bloco cinco sujeitos de cada grupo, técnica que visou garantir que o número de participantes fosse distribuído igualmente entre os grupos do estudo. Foi utilizado o *Computer Program for Epidemiologists (PEPI v.3.0)* (27) para a randomização em blocos. A inscrição do recém-nascido pré-termo no estudo ocorreu no terceiro dia de vida. Durante esse período, foram avaliadas as condições clínicas do pré-termo, e o mesmo foi considerado elegível, ou não, para inclusão na pesquisa. Nos três primeiros dias de vida, todos os recém-nascidos pré-termo receberam banho com sabonete neutro líquido (ver quadro) e água, de acordo com a rotina da unidade. Esses banhos não foram computados na pesquisa. A partir do quarto banho, quando do ingresso do pré-termo no estudo, ele recebeu um banho diário por sete dias consecutivos somente com água (grupo A) ou com água e sabonete neutro líquido (grupo B).

A técnica do banho de aspersão (banho de leite) foi semelhante para os dois grupos, com exceção quanto ao agente de limpeza utilizado. Entretanto, os procedimentos de higiene foram os mesmos. Nos dois grupos, foi utilizada a mesma água de torneira, com pH = 6,77. O banho de aspersão foi realizado com compressas de algodão macio, que foram umedecidas somente em água (grupo A), ou com sabonete neutro líquido e água (grupo B). Iniciou-se o banho lavando-se a face do recém-nascido com gaze embebida somente em água e secando

após, em ambos os grupos. Após, lavou-se o couro cabeludo, que também foi secado. Em seguida, foi lavado o pescoço, o abdome, o dorso e as extremidades. E, por último, lavaram-se os genitais e as nádegas. Secou-se então todo o corpo e colocou-se fralda no recém-nascido, que, finalmente, foi posto na incubadora.

#### Quadro - Sabonete neutro líquido

Fórmula do sabonete*
- Texapon SBN (detergente)
- Dehyton KB (coco de amido)
- Plantaren 2000 (detergente)
- Glicerina (emoliente)
- Coperlan KDB (espessante)
- Ácido cítrico
- Cloreto de sódio
- Água deionizada
- pH = 7

\*Fórmula manipulada na Farmácia Industrial do HCPA.

Entre o 11<sup>o</sup> e o 30<sup>o</sup> dia de vida e de internação dos recém-nascidos pré-termo, realizou-se a coleta das culturas da pele na axila direita. A idade, na coleta, variou, porque alguns pré-termos receberam terapia antimicrobiana, que durou em média dez dias. Após o término dos antibióticos, eles necessitaram aguardar mais sete dias, durante os quais receberam diariamente o tipo de banho para o qual haviam sido randomizados. Somente após esse período foi possível realizar a coleta das culturas.

Todos os recém-nascidos pré-termo participantes do estudo realizaram a coleta de material para cultura após sete banhos diários consecutivos sem uso de antibióticos, conforme o grupo. O procedimento de coleta foi executado por um único investigador mascarado para o tipo de banho recebido pelo pré-termo. O método de coleta para cultura microbiana da pele

baseou-se em técnica previamente utilizada por Franck e colaboradores (5). Foram realizadas duas coletas com *swab* em cada recém-nascido pré-termo (grupo A e grupo B), uma imediatamente antes do banho (cultura I) e a outra após 30 minutos do banho (cultura II). O *swab* de algodão foi mergulhado em 5 ml de caldo de soja tripcaseína (caldo glicosado) e, após, foi pincelado 10 vezes na axila direita, numa mesma área de 2 cm<sup>2</sup>. A ponta de algodão do *swab* foi pincelada na axila cinco vezes na direção vertical e cinco vezes na horizontal. Essa mesma extremidade de algodão do *swab* foi recolocada no caldo de soja tripcaseína e enviada, imediatamente após cada coleta, ao laboratório de microbiologia.

No laboratório de microbiologia, o *swab* foi removido do tubo de ensaio e o caldo de cultura sofreu agitação em *vortex*. Após, 50 µl (0,05 ml) do caldo de cultura foram semeados por esgotamento em ágar sangue de carneiro. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de cada microorganismo foi determinado no período de incubação, que durou 48 horas, a 35°C de temperatura. A conversão dos resultados para ml foi feita através do fator de multiplicação igual a 20, em razão do volume semeado ser de 0,05 (20 x 0,05 = 1 ml). A identificação dos microorganismos baseou-se na análise morfológica das colônias, em provas bioquímicas e no uso do sistema automatizado mini API<sup>®</sup> (bioMérieux, Dulham, USA). Os microorganismos pesquisados foram *Staphylococcus coagulase* negativo, *Staphylococcus aureus*, bacilos gram-negativos e *Candida sp.*

Todos os *swabs* foram enviados ao Laboratório de Microbiologia sem identificação quanto ao tipo de banho, o que tornou o microbiologista “mascarado” ao realizar a análise das culturas.

Tamanho da amostra: para o cálculo do tamanho da amostra, utilizou-se como referência o estudo de Franck e colaboradores, estimando-se que a diferença de proporção (microorganismos) entre os grupos fosse de 34% (26% *versus* 60%) (5). Estabeleceu-se um



nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) e um poder de 80% ( $\beta = 0,2$ ), estimando-se serem necessários 66 sujeitos, 33 pré-termos para cada grupo (27).

**Análise estatística:** os resultados das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) foram resumidos pela mediana com amplitude interquartil (percentil 25 e percentil 75) e expressos na potência  $10^3$ .

Em virtude dos dados em UFC terem apresentado distribuição assimétrica, utilizou-se a função logarítmica para a sua transformação em distribuição simétrica, o que possibilitou o emprego de testes paramétricos. O momento basal (cultura antes do banho) dos grupos foi comparado pelo teste  $t$  de Student para amostras independentes, e as demais comparações foram realizadas pela análise de variância de medidas repetidas.

Os dados categóricos envolvendo a ocorrência ou não dos diferentes microorganismos estudados foram comparados entre os grupos utilizando-se o teste qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de Fisher. Dados demográficos também foram comparados entre os grupos, utilizando-se  $t$  de Student e qui-quadrado. O nível de significância estatística aceito foi de  $\alpha = 0,05$ . Para a análise dos dados, utilizou-se o *Statistical Package for Social Science* (SPSS versão 10.0).

**Ética:** o protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital onde se realizou o estudo, e os pais de todos os recém-nascidos pré-termo consentiram por escrito que seus filhos participassem do projeto.

## RESULTADOS

Foram admitidos 86 recém-nascidos pré-termo no estudo, 43 em cada grupo. No grupo que recebeu banho somente com água (grupo A), ocorreram dez exclusões: nove devido ao uso de antibióticos por período prolongado nos 30 dias de vida, sem permanecerem sete dias antes da coleta sem tratamento com antibióticos, e um por óbito. No grupo do banho com sabonete neutro e água (grupo B), três recém-nascidos foram excluídos: dois pelo uso de antibioticoterapia prolongada e por não terem permanecido sete dias antes da coleta sem usar antibióticos, e um por óbito. Portanto, participaram da análise 73 prematuros, distribuídos nos grupos A (n = 33) e B (n = 40).

Os dois grupos não diferiram quanto ao peso de nascimento, idade gestacional, tipo de parto e idade (dias de vida) na coleta das culturas de pele. Os recém-nascidos de ambos os grupos tiveram seus exames obtidos, em média, com 19 dias de vida. O número de pacientes que realizou tratamento com antibióticos, permanecendo sete dias sem antibióticos antes da coleta das culturas, foi semelhante nos dois grupos (tabela 1).

**Tabela 1** - Características dos recém-nascidos pré-termo estudados

Características	Tipo de banho		P
	Com água (n = 33)	Com água e sabão (n = 40)	
Idade gestacional (semanas)	31 ± 2	32 ± 2	0,22
Peso do nascimento (g)	1.356 ± 270	1.384 ± 221	0,63
Idade na coleta (dias de vida)	19 ± 6	19 ± 5	0,91
Uso de antibióticos	16 (48,5%)	17 (42,5%)	0,78
Parto vaginal	9 (27,3%)	10 (25,0%)	0,96
Cesariana	24 (72,7%)	30 (75,0%)	

Dados expressos em média ± desvio-padrão ou frequência (percentual).

Quanto ao tipo de microorganismos presentes na cultura I, antes do banho, não houve diferença significativa nos dois grupos. Houve maior prevalência do *Staphylococcus coagulase* negativo nos dois grupos estudados (tabela 2).

**Tabela 2** - Comparação dos microorganismos presentes na pele dos grupos de pré-termos banhados somente com água e com sabonete neutro e água

Microorganismos	Tipo de banho		P
	Com água (n = 33)	Com água e sabão (n = 40)	
<i>Staphylococcus coagulase</i> negativo	29 (87,9%)	36 (90%)	0,77 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (18,2%)	12 (30,0%)	0,24 <sup>a</sup>
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	2 (6,1%)	1 (2,5%)	0,59 <sup>b</sup>
<i>Enterobacter sp.</i>	1 (3,0%)	2 (5,0%)	0,99 <sup>b</sup>
<i>Eschericia coli</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>
<i>Klebsiela oxytoca</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>
<i>Acinetobacter sp.</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>
<i>Serratia sp.</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>
<i>Cândida sp.</i>	1 (3,0%)	0 (0,0%)	0,45 <sup>b</sup>

Dados expressos em frequência e percentual.

P: significância estatística, <sup>a</sup> teste Qui-quadrado, <sup>b</sup> teste exato de Fisher.

Na comparação entre os dois grupos de recém-nascidos pré-termo quanto à contagem de UFC no momento basal, não houve diferença significativa, tendo ambos os grupos apresentado resultados semelhantes na cultura da pele antes do banho (tabela 3).

A maioria dos pré-termos não apresentou contagens de colônias de bactérias gram-negativas e de *Staphylococcus aureus*, o que resultou em mediana e amplitude interquartil igual a zero. O percentil máximo indica os valores das contagens encontradas desses microorganismos.

Em relação à diferença no número de UFC entre o momento basal (cultura antes do banho) e o momento final (cultura após o banho), a ANOVA de medidas repetidas mostrou uma diferença significativa ao longo do tempo dos germes gram-positivos ( $P < 0,001$ ) e dos germes gram-negativos ( $P = 0,032$ ) nas contagens de UFC, indicando que a colonização da pele diminuiu entre o momento basal (cultura antes do banho) e o momento final (cultura após o banho) em ambos os grupos de maneira semelhante. Entretanto, não ocorreu diferença significativa no número de UFC entre os dois grupos de recém-nascidos pré-termo (tabela 3).

**Tabela 3** - Comparação dos grupos de pré-termos banhados somente com água e com sabonete neutro e água nas contagens de unidades formadoras de colônias no momento basal e na diferença basal – final

UFC x 10 <sup>3</sup>	Basal			Diferença Basal – Final		
	Água n = 33	Água+sabonete n = 40	P <sup>(1)</sup>	Água n = 33	Água+sabonete n = 40	P <sup>(2)</sup>
Gram +	6 (2 a 56) [< 1 a 200]	16 (5 a 100) [0 a 200]	0,09	2 (< 1 a 9) [0 a 165]	4 (1 a 28) [0 a 101]	0,13
Gram –	0 (0 a 0) [0 a < 1]	0 (0 – 0) [0 a 2]	0,79	0 (0 a 0) [0 a < 1]	0 (0 a 0) [0 a 2]	0,80
<i>S. aureus</i>	0 (0 a 0) [0 a 10]	0 (0 a < 1) [0 a 100]	0,34	0 (0 a 0) [0 a 5]	0 (0 a < 1) [0 a 30]	0,29
<i>S. coagulase</i> negativo	6 (< 1 a 50) [0 a 200]	12 (3 a 100) [0 a 200]	0,12	1 (0 a 7) [0 a 165]	3 (0 a 20) [0 a 100]	0,26

Os dados são apresentados como mediana (amplitude interquartil: P25 a P75) e [mínimo a máximo]. UFC: unidades formadoras de colônias. *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S. coagulase* negativo: *Staphylococcus coagulase* negativo. P: significância estatística, <sup>(1)</sup> *t* de Student, em log (UFC), <sup>(2)</sup> análise de variância para medidas repetidas, em log (UFC).

Dos 73 recém-nascidos pré-termo investigados, três tiveram hemocultura positiva entre o momento da randomização e o momento da coleta, porém nenhum após o momento da coleta. Dois pré-termos do grupo do banho somente com água (grupo A) apresentaram hemocultura positiva: em um deles foi identificado o *Staphylococcus coagulase* negativo, presente também na cultura da pele, e, no outro, o *Staphylococcus aureus*, não encontrado na cultura da pele. No grupo do banho com sabonete neutro e água (grupo B), foi identificado, em um pré-termo, o *Staphylococcus coagulase* negativo na hemocultura, que estava presente na cultura da pele.

## DISCUSSÃO

Vários estudos analisaram culturas da superfície da pele de recém-nascidos pré-termo admitidos em UTIN, evidenciando que o *Staphylococcus coagulase* negativo está presente em 90% delas, dado semelhante ao descrito neste estudo (21, 28, 29, 30). Franck e colaboradores constataram a presença desse microorganismo em 93% dos casos quando investigaram a frequência do banho e a colonização da pele de recém-nascidos pré-termo hospitalizados em UTIN (5). Apesar desse microorganismo fazer parte da flora normal da pele, as septicemias e as meningites neonatais causadas por essa bactéria estão associadas a significativas taxas de morbidade e mortalidade (30).

Savey e colaboradores demonstraram que o *Staphylococcus aureus* foi responsável por 9,6% do total de microorganismos encontrados na axila dos pré-termos em UTIN (21). Entretanto, o estudo realizado por Cowan e Frost, que comparou o efeito do uso de sabonete com o de detergente no banho do recém-nascido a termo sobre a flora da pele, encontrou a

prevalência de *Staphylococcus aureus* entre 18,35% e 20,3%, resultados semelhantes aos nossos (31).

Cowan e Frost demonstraram uma prevalência de 1,3% de germes gram-negativos, valor bem inferior à dos gram-positivos na flora cutânea (31). Isso se explica porque recém-nascidos normais hospitalizados por curto período de tempo não adquirem a flora nosocomial. Além disso, os microorganismos gram-negativos geralmente não colonizam a pele devido a seu ambiente seco, com exceção do acinetobácter, que pode fazer parte da flora residente da pele (32).

No estudo de Franck e colaboradores com recém-nascidos pré-termo hospitalizados, foi constatada uma prevalência de 26% de germes gram-negativos, taxa semelhante à deste estudo, porque ambos analisaram recém-nascidos pré-termo internados em UTIN (5).

Sabe-se que os recém-nascidos internados em UTIN tendem a se tornar colonizados por microorganismos resistentes a antibióticos, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Candida albicans* (20, 33).

Os resultados do nosso estudo não demonstraram diferença significativa na quantidade de colônias dos microorganismos presentes na flora cutânea entre os pré-termos hospitalizados que receberam banho somente com água e os que receberam banho com sabonete neutro e água.

Ao realizar a comparação da colonização presente na pele dos pré-termos nos dois grupos nos momentos antes e após o banho, verificou-se que os valores das contagens de colônias de microorganismos nos dois grupos sofreram redução significativa, sem ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos.

Não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa semelhante a essa que realizamos, com recém-nascidos pré-termo internados em UTIN. Existe um único estudo comparando o

banho somente com água com o banho com sabonete em recém-nascidos a termo. Medves e O'Brien compararam as culturas da pele de dois grupos de recém-nascidos a termo no banho de admissão, logo após o nascimento, quando a pele dos recém-nascidos se encontra coberta por fluidos maternos do parto. O estudo evidenciou que, logo após o nascimento, tanto o primeiro banho com água e sabonete quanto o com somente água produzem efeito mínimo sobre a colonização bacteriana da pele ao nascimento (19).

Estudo realizado por Gaftter e colaboradores evidenciou que o banho com sabonete desencadeia um aumento no pH da pele que interfere na proteção fisiológica (manto ácido), provocando mudança na composição da flora bacteriana cutânea e na atividade das enzimas da epiderme (8). Por esse motivo, o uso de sabonete, no banho do recém-nascido, é recomendado uma a duas vezes por semana, considerando-se que o banho rotineiro diário é uma prática responsável pelo ressecamento da pele e que predispõe à ruptura (6, 34). A falta de integridade da pele propicia a penetração de bactérias e fungos presentes na flora cutânea, podendo evoluir para infecção sistêmica (35).

No presente estudo, a cultura da pele não foi um bom preditor de sepse, porque foi encontrado apenas um pequeno número de casos com hemocultura positiva, ou seja, dos 73 pré-termos do estudo, apenas três desenvolveram sepse entre o momento da randomização e a coleta das culturas. Talvez essa associação possa ser esclarecida se for resultante de uma amostra com um número maior de casos. Entretanto, o cálculo da amostra não foi realizado para esse objetivo. Além disso, segundo Evans e colaboradores, as culturas da superfície da pele têm valor limitado para predizer a etiologia da sepse neonatal (28).

Em razão da infecção nosocomial ser de origem multifatorial, os fatores envolvidos nessa doença precisam ser analisados pelos profissionais da equipe de saúde que cuidam do recém-nascido pré-termo hospitalizado, para que possam ser geradas medidas preventivas de controle de infecção hospitalar (36).

Poucos são os estudos que têm investigado os fatores de risco para a colonização, particularmente em pacientes internados em UTI (25). Estudos para elucidar a epidemiologia da colonização, os mecanismos de colonização dos microorganismos patógenos e as intervenções preventivas precisam ter prioridade nas pesquisas futuras (20). Entre eles, merecem investigação as técnicas de banho dos recém-nascidos pré-termo internados em UTIN, por apresentarem um papel importante na colonização da pele.

Os resultados deste estudo sugerem que o banho com sabonete neutro e água e o com somente água produzem efeito semelhante sobre a colonização da pele do recém-nascido pré-termo hospitalizado em UTIN. Ambos são eficazes na redução do número de colônias de bactérias gram-positivas e gram-negativas.



## REFERÊNCIAS

1. Garcia-Gonzalez E, Rivera-Rueda MA. Neonatal dermatology: skin care guidelines, *Dermatol Nurs* 1998;10:274-5, 279-81.
2. Munson KA, Bare DE, Hoath SB, Visscher MO. A survey of skin care practices for premature low birth weight infants. *Neonatal Netw* 1999;18:25-31.
3. Stoll BJ, Hansen N, Fannaroff AA, Wright L, Carlo WA, Ehrenkrans R, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics* 2002; 2:285-91.
4. Darmstadt GL, Dinulos JG. Neonatal skin care. *Pediatr Clin North Am* 2000;47:757-82.
5. Franck LS, Quinn D, Zahr L. Effect of less frequent bathing of preterm infants on skin flora and pathogen colonization. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2000;29(6):584-9.
6. Lund C, Kuller J, Lane A, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: the scientific basis for practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999;28:241-54.
7. Schmid MH, Korting HC. The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. *Dermatology* 1995;191:276-80.
8. Gfatter R, Hackl P, Braun F. Effects of soap and detergents on skin surface pH, stratum corneum hydration and fat content in infants. *Dermatology* 1997;195:258-62.
9. Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. Soaps, shampoos, and detergents. *Clin Dermatol* 2001;19:393-7.
10. Baranda L, Gonzalo-Amaro R, Torres-Alvares B, Alvares C, Ramírez V. Correlation between pH and irritant effect of cleansers marked for dry skin. *Int J Dermatol* 2002;41:494-9.
11. Lodén M, Buraczewska I, Edlund F. The irritation potential and reservoir effect of mild soaps. *Contact Dermatitis* 2003;49:91-6.
12. Fox C, Nelson D, Warechsm J. The timing of skin acidification in very low birth weight infants. *J Perinatol* 1998;18:272-5.
13. Visscher MO, Chatterjee R, Munson KA, Pickens WL, Hoath SB. Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol* 2000;17:45-51.
14. Yosipovitch G, Maayan-Metzger A, Merlob P, Sirota L. Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatrics* 2000;106:105-8.

15. Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Mao-Qiang M, et al. Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2004;122:320-9.
16. Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002;19:256-62.
17. Nix DH. Factors to consider when selecting skin cleansing products. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2000;27:260-8.
18. Lund C. Prevention and management of infant skin breakdown. *Nurs Clin North Am* 1999;34(4):907-20.
19. Medves JM, O'Brien B. Does bathing newborns remove potentially harmful pathogens from the skin? *Birth* 2001;28:161-5.
20. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17(1):47-52.
21. Savey A, Fleurette J, Salle BL. An analysis of microbial flora of premature neonates. *J Hosp Infect* 1992;21:275-89.
22. Davies M, Mehr S, Garland ST, Morley CJ. Bacterial colonization of toys in neonatal intensive care cots. *Pediatrics* 2000;106(2):e18-e22.
23. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1740-6.
24. Kilbride HW, Wirtschafter DD, Powers R, Sheehan MB. Implementation of evidence-based potentially better practices to decrease nosocomial infections. *Pediatrics* 2003;111(Supl. 2):e519-e533.
25. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin T. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(12):1119-24.
26. Ballard JL, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman L, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119:417-23.
27. Abramson JH, Gahlinger P. Computer programs for epidemiologists: PEPI v. 3.0. Salt Lake City, Utah: Sagebrush Press; 2000.

28. Evans ME, Schaffner W, Federspiel CF, Cotton RB, McKee T, Stratton CW. Sensitivity, specificity, and predictive value of body surface cultures in a neonatal intensive care unit. *JAMA* 1988;259(2):248-52.
29. Keyworth N, Millar MR, Holland KT. Developmente of cutaneous microflora in premature neonates. *Arch Dis Child* 1992; 67(7Spec No):797-801.
30. D'Angio CT, McGowan KL, Baumgart S, Geme JS, Harris MC. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J Pediatr* 1989;114(6):1029-34.
31. Cowan ME, Frost MR. A comparison between a detergent baby bath additive and baby soap on the skin flora of neonate. *J Hosp Infect* 1986;7:91-5.
32. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001; 6(3):170-4.
33. Lund CH, Osborne JW, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: clinical outcomes of the AWHONN/NANN evidence-based clinical practice guideline. *J Obste Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30(1):41-51.
34. Maguire D P. Skin protection and breakdown in the ELBW infant. *Clin Nurs Res* 1999;8(3):222-34.
35. Rowen JL, Atkins JT, Levy ML, Baer SC, Baker CJ. Invasive fungal dermatitis in the  $\leq$  1000-gram neonate. *Pediatrics* 1995;95:682-7.
36. Edwards WH. Prevening nosocomial bloodstream infection in very low birth weight infants. *Semin Neonatol* 2002;7:325-33.

**Artigo em Inglês**

---

**THE EFFECT OF BATHING ON THE MICROBIAL  
SKIN FLORA OF PRETERM NEWBORNS**

---

**THE EFFECT OF BATHING ON THE MICROBIAL SKIN FLORA OF  
PRETERM NEWBORNS**

---

Maria Luzia Chollopetz da Cunha (1)

Renato S. Procianoy (2)

(1) Assistant Professor, Scholl of Nursing- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, MSc.

(2) Full Professor of Pediatrics – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Head of the  
Serviço de Neonatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Address for correspondence:

Maria Luzia Chollopetz da Cunha

Rua São Manoel, 963 - Campus da Saúde

CEP: 90.620-110 - Porto Alegre - RS - Brasil

Fone: (0XX51) 3316 5428

e-mail: [luzia@adufrgs.ufrgs.br](mailto:luzia@adufrgs.ufrgs.br)

## ABSTRACT

**Objective:** To assess the effects of bathing with water only and bathing with mild pH neutral soap and water on the microbial skin flora, comparing the number of colonies and the type of microorganism present on the skin of preterm newborns before and after the bath.

**Method:** Randomized blind clinical trial with 73 preterm newborns with a gestational age between 28 and 35 weeks and birth weight between 800 g and 1.800 g, allocated by randomization to a group that was given seven baths with water only, or to another groups that had seven baths with mild pH neutral soap and water. Swabs were collected from the axillary region before and after bathing to compare the skin flora of both groups.

**Results:** Coagulase-negative Staphylococcus was the most prevalent microorganism in both groups. Comparing the count of microorganism colonies between the groups, no significant difference was found. The comparison of the number of CFU done by ANOVA for repeated measures, showed a significant difference over time of gram-positive bacteria ( $P < 0.001$ ) and gram-negative bacteria ( $P = 0.032$ ) in the two groups, indicating that skin colonization diminished similarly in both groups, without any significant difference between the two groups of preterm newborns.

**Conclusions:** Bathing the preterm newborns with mild pH neutral soap and water and bathing them with water alone produces similar effects on the skin colonization of a preterm neonate in the NICU. Both are effective to reduce the number of colonies of gram-positive and gram-negative bacteria.

**Key words:** microbial skin flora, bathing, preterm newborn

## INTRODUCTION

It is essential to preserve the integrity of the skin during the neonatal period, especially in preterm newborns in the neonatal intensive care unit (NICU) (1, 2). The prevalence of sepsis in a preterm newborn after the third day of life occurs in 21% with a mortality rate of 18% (3). The vast majority of these cases occur in the first week of life, when the function of the epidermal barrier is highly compromised (4).

Among the measures taken to care for the skin of the preterm newborn, bathing with soap is a routine procedure that follows a tradition of hygiene without evidence-based justification (5). However, this bathing routine may harm the skin because of the fragile epidermis (6). Most authors state that all soaps are irritant and emphasize that their frequent use is harmful, because these agents remove the lipid film from the skin surface (7, 8, 9, 10, 11). Physiologically, the skin pH, which is neutral at birth, acidifies during the first week of life, with a pH varying from 5.0 to 5.5 (6, 12, 13, 14, 15, 16). This “acid mantle” diminishes bacterial colonization and promotes the retention of humidity at the skin barrier (7, 17). However, bathing may undo the “acid mantle” elevating the skin pH (8, 18).

The newborn’s skin is rapidly colonized by microorganisms, which are prevalent in the environment (19). The normal flora reduces pathogen colonization and maintains pH balance (19), but it may also play an important role in the genesis of infection (19, 20). The coagulase-negative *Staphylococcus* in the normal skin flora is the main agent responsible for late neonatal infection (17, 21, 22, 23, 24).

The mechanisms involved in the colonization of the skin of the preterm newborn in the NICU have not been fully explained (25). Our hypothesis is that the type of bath may

influence the number of colonies and type of microorganisms present in the skin flora of neonates. This study proposes a comparison of the type of microorganism and quantity of colonies present on the skin of the preterm newborns in the NICU before and after bathing, when only water or mild pH neutral soap and water are used.

## PATIENTS AND METHODS

A randomized blind clinical trial was performed with preterm neonates born with a gestational age between 28 and 35 weeks and a birth weight between 800 g and 1.800 g, who had used the Kangaroo Mother Method. The preterm newborns that participated in the study were those born in the Obstetrical Center (OC) and admitted to the NICU at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, during the period from October 1, 2002 to December 31, 2003. The evaluation of gestational age, performed immediately after birth, was determined using the *New Ballard* method (26).

**Exclusion criteria were:** preterm newborns with skin breakdown, congenital malformation, children of HIV-positive mothers, children of mothers with any infection of the STORCH group during pregnancy, preterm newborns who presented a clinical suspicion or proven infection at the time of taking the cultures, who had already been treated with antibiotics in the seven days preceding culture collection, who were on mechanical ventilation at the time of culture collection, who had an intravenous or intra-arterial catheter at the time the cultures were collected.

All the preterm neonates born during the data collection period, who fulfilled the eligibility criteria, were randomized for allocation to group A or group B. Group A consisted of preterm neonates who were bathed daily with water only for seven consecutive days. Group B consisted of preterm newborns who were given a daily bath with water and liquid mild pH neutral soap for seven consecutive days. The subjects were randomized in blocks of



10 preterm newborns each, and each block contained five subjects from each group. The purpose of this technique was to ensure that the number of participants would be distributed equally among the study groups. The Computer Program for Epidemiologists (PEPI v.3.0) (27) was used for block randomization. The preterm newborn was enrolled in the study on the third day of life. During this period the clinical conditions of the preterm newborn were evaluated and it was considered eligible for inclusion in the research study. Thus, during the first three days of life, all preterm newborns were bathed with liquid mild pH neutral soap and water, according to the unit routine. These baths were not taken into account in the study. From the fourth bath onwards, when the preterm newborn entered the study, it received a daily bath for seven consecutive days with water only (Group A) or with water and liquid mild pH neutral soap (Group B).

The technique of the sponge bath was similar for both groups except as to the cleansing agent used. In group A only water was used and in group B water and liquid mild pH neutral soap (table). However the washing procedures were the same. The same tap water was used in both groups with pH = 6.77. The sponge bath was performed using soft cotton wool compresses, which were wetted only with water (group A) or with liquid mild pH neutral soap and water (group B). The bath began by washing the newborn's face with gauze soaked only in water and afterwards dried, in both groups. Then the scalp was washed and dried. Next the neck, abdomen, back and extremities were washed. Finally, the genitals and the buttocks were the buttocks washed. The newborn's whole body was dried, it was diapered, and finally placed in the incubator.

**Table** - Liquid mild pH neutral soap

Soap formula*
- Texapon SBN (detergent)

- Dehyton KB (cocamide)
- Plantaren 2000 (detergent)
- Glycerin (emolient)
- Coperlan KDB (thickener)
- Citric acid
- Sodium chloride
- Deionized water
- pH = 7

\*Formula manipulated in the Industrial Pharmacy at HCPA.

Between the 11<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> day of life and hospital stay of the preterm newborns, the skin cultures were collected from the right axilla. The age at collection varied because a few preterm newborns received antimicrobial therapy for an average of ten days. After the course of antibiotics ended, they had to wait another seven days during which they received daily the type of bath to which they had been randomized. It was only possible to collect the cultures after this period.

The collection of culture material in all the preterm newborns participating in the study was performed after seven consecutive daily baths without using antibiotics, according to group. A single researcher, masked to the type of bath given the newborn, performed the collection procedure. The collection method for a microbial skin culture was based on a technique previously used by Franck *et al.* (5). Two collections were performed with a swab in each preterm newborn (group A and group B), once immediately before the bath (Culture I) and the other 30 minutes after the bath (Culture II). The cotton swab was dipped into 5 ml of tryptic soy broth culture media and then painted 10 times on the right axilla in a same 2 cm<sup>2</sup> area. The cotton swab was painted on the axilla five times in the vertical direction and five times in the horizontal one. This same tip of the cotton swab was placed back into the tryptic soy broth culture media and sent to the microbiology laboratory immediately after each collection.

In the microbiology laboratory, the swab was removed from the culture tube and the tryptic soy broth was shaken in a vortex. After this, 50  $\mu$ l (0.05 ml) of the tryptic soy broth were inoculated to the sheep blood agar and spread over the surface. The number of colony forming units (CFU) per ml of each microorganism was determined during the incubation period which lasted 48 hours at 35°C. The results were converted into ml using a multiplication factor equal to 20, because the volume to be seeded was 0.05 ( $20 \times 0.05 = 1$  ml). The identification of microorganisms was based on the morphological analysis of the colonies, on biochemical tests and on the use of an automated mini API<sup>®</sup> system (bioMérieux, Dulham, USA). The microorganisms researched were coagulase-negative *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, gram-negative bacillae and *Candida sp.*

All the swabs were sent to the Microbiology Laboratory without any identification as to the type of bath, “masking” the microbiologists while he analyzed the cultures.

**Sample Size:** The reference used to calculate the sample size, the reference used was the study by Franck *et al.*, estimating that the difference in proportion (microorganisms) between the groups was 34% (26% versus 60%) (5). A 5% ( $\alpha = 0.05$ ) level of significance and a power of 80% ( $\beta = 0.2$ ) were established, and it was estimated that 66 subjects would be needed, 33 preterm infants for each group (27).

**Statistical Analysis:** The results of colony formation unit (CFU) counts were summed up by the median with an interquartile range (percentile 25 and percentile 75) and expressed at the power of  $10^3$ .

Since the data in CFU presented an asymmetrical distribution, the logarithmic function was used to transform them into a symmetrical distribution, which enabled the use of parametric tests. The basal moment of the groups (culture before bathing) was compared using the Student *t* test for independent samples, and the other comparisons were performed using the analysis of variance of repeated measures.

The categorical data involving the occurrence or not of the different microorganisms studied were compared among the groups using the Chi-square test and, when necessary, the exact Fisher test. Demographic data were also compared among the groups using the Student *t* and Chi-square tests. The level of statistical significance accepted was  $\alpha = 0.05$ . The Statistical Package for Social Science (SPSS version 10.0) was used to analyze the data.

**Ethics:** The Ethics Committee of the hospital where the study was performed approved the research protocol, and all the preterm neonates had the written consent of their parents to participate in the project.

## RESULTS

Eighty-six preterm newborns were included in the study, 43 in each group. In the group bathed with water only (group A) there were ten exclusions, nine due to the use of antibiotics for a long period in the 30 days of life, who had not remained untreated by antibiotics for seven days before the collection, and one who died. In group that was bathed

with mild pH neutral and water (group B) three neonates were excluded, two because they had been treated for a long time with antibiotics and had not remained untreated by antibiotics in the seven days before the collection, and one who died. Thus, 73 premature newborns distributed in groups A (n = 33) and B (n = 40) participated in the analysis.

There was no difference in the two groups as to birth weight, gestational age and age (days of life) in collecting skin cultures. The exams of newborns in both groups were obtained at an average of 19 days of age. The number of patients treated with antibiotics, who were not treated with antibiotics for seven days before the cultures were collected, was similar in both groups (table 1).

**Table 1** - Characteristics of the preterm newborns studied

Characteristics	Type of bath		P
	With water (n = 33)	With water and soap (n = 40)	
Gestational Age (weeks)	31 ± 2	32 ± 2	0.22
Birth weight (grams)	1.356 ± 270	1.384 ± 221	0.63
Age at collection (days of life)	19 ± 6	19 ± 5	0.91
Use of antibiotics	16 (48.5%)	17 (42.5%)	0.78
Vaginal delivery	9 (27.3%)	10 (25.0%)	0.96
Cesarean	24 (72.7%)	30 (75.0%)	

Data expressed in mean ± standard deviation or frequency (percentage).

As to the type of microorganisms found in culture I, before the bath, no significant difference was found in the two groups, with a higher prevalence of coagulase-negative *Staphylococcus* in the two groups studied (table 2).

**Table 2** - Comparison of the microorganisms present in the skin of preterm infant groups bathed only with mild pH neutral soap and water

Microorganism	Type of bath		P
	With water (n = 33)	With water and soap (n = 33)	
<i>Coagulase-negative Staphylococcus</i>	29 (87.9%)	36 (90%)	0.77 <sup>a</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (18.2%)	12 (30.0%)	0.24 <sup>a</sup>
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	2 (6.1%)	1 (2.5%)	0.59 <sup>b</sup>
<i>Enterobacter sp.</i>	1 (3.0%)	2 (5.0%)	0.99 <sup>b</sup>
<i>Eschericia coli</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>
<i>Klebsiela oxytoca</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>
<i>Acinetobacter sp.</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>
<i>Serratia sp.</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>
<i>Candida sp.</i>	1 (3.0%)	0 (0.0%)	0.45 <sup>b</sup>

Data expressed in frequency and percentage.

P: statistical significance, <sup>a</sup> Chi-square test, <sup>b</sup> exact Fisher test.

Comparing the two groups of preterm newborns in the CFU count at the basal moment, no significant difference was found. Both groups presented similar results in the skin culture before the bath (table 3).

Most of the preterm newborns did not present gram-negative bacteria and *Staphylococcus aureus* colony counts, resulting a median and interquartile range equal to zero. The maximum percentile indicates the values of the counts found for these microorganisms.

As to the difference in the number of CFU between the basal moment (culture before the bath) and the final moment (culture after the bath), the ANOVA for repeated measures showed a significant difference over time of gram-positive bacteria ( $P < 0.001$ ) and gram-

negative bacteria ( $P = 0.032$ ) in the CFU counts, indicating that the skin colonization diminished between the basal moment (culture before the bath) and the final moment (culture after the bath), similarly in both groups. However, no significant difference occurred in the number of CFU between the two groups of preterm newborns (table 3).

**Table 3** - Comparison of the preterm groups bathed only with water and with mild pH neutral soap and water in the colony forming unit counts at the basal moment and in the basal-final difference

CFU x 10 <sup>3</sup>	Basal			Basal-Final Diference		
	Water n = 33	Water+soap n = 40	P <sup>(1)</sup>	Water n = 33	Water+soap n = 40	P <sup>(2)</sup>
Gram +	6 (2 a 56) [< 1 a 200]	16 (5 a 100) [0 a 200]	0,09	2 (< 1 a 9) [0 a 165]	4 (1 a 28) [0 a 101]	0.13
Gram –	0 (0 a 0) [0 a < 1]	0 (0 – 0) [0 a 2]	0,79	0 (0 a 0) [0 a < 1]	0 (0 a 0) [0 a 2]	0.80
<i>S. aureus</i>	0 (0 a 0) [0 a 10]	0 (0 a < 1) [0 a 100]	0,34	0 (0 a 0) [0 a 5]	0 (0 a < 1) [0 a 30]	0.29
<i>Coagulase-negative S.</i>	6 (< 1 a 50) [0 a 200]	12 (3 a 100) [0 a 200]	0,12	1 (0 a 7) [0 a 165]	3 (0 a 20) [0 a 100]	0.26

The data are presented as median (interquartile range: P25 to P75) and [minimum to maximum]. CFU: colony forming units. *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*; Coagulase-negative *S.*: Coagulase-negative *Staphylococcus*. P: statistical significance, <sup>(1)</sup> Student *t* in log (CFU), <sup>(2)</sup> analysis of variance for repeated measures in log (CFU).

Of the 73 preterm newborns studied, three had a positive blood culture between the time of randomization and the time of collection, but none had one after the time of collection. Two preterm newborns in the group bathed only with water (group A) presented a positive blood culture, coagulase-negative *Staphylococcus* being identified in one of them, also present in the skin culture, and in the other *Staphylococcus aureus*, not found in the skin culture. In the group bathed with mild pH neutral soap and water (group B), coagulase-negative

*Staphylococcus* was identified in the blood culture, which was present in the skin culture of the same preterm newborn.

## DISCUSSION

Several studies analyzed surface cultures from the skin of preterm newborns admitted to a NICU, demonstrating that coagulase-negative *Staphylococcus* is present in 90% of them, information similar to what was described in this study (21, 28, 29, 30). Franck *et al.* found the presence of this microorganisms in 93% of the cases when they investigated the frequency of bathing and colonization of the skin of preterm newborns in a NICU (5). Although this microorganism is part of the normal skin flora, the septicemias and neonatal meningitis caused by this bacteria are associated to significant morbidity and mortality rates (30).

Savey *et al.* Demonstrated that *Staphylococcus aureus* was responsible for 9.6% of the total microorganisms found in the axilla of preterm newborns in the NICU (21). However the study performed by Cowan and Frost comparing the effect of using soap versus detergent in bathing a full-term newborn on the skin flora found a prevalence of *Staphylococcus aureus* between 18.35% and 20.3% (31). These results are similar to ours.

Cowan and Frost demonstrated a prevalence of 1.3% of gram-negative germs, a value much lower than the gram-positive ones in the skin flora (31). This is accounted for by the fact that normal newborns hospitalized for a short time do not acquire the nosocomial flora. Moreover, gram-negative microorganisms usually do not colonize the skin due to its dry environment, except in the case of acinobacter, which may be part of the flora residing on the skin (32).



In the study by Franck *et al.* on hospitalized preterm newborns, a prevalence of 26% gram-negative germs was found, similar to our results, because both studies analyzed preterm newborns in a NICU (5).

It is known that neonates in a NICU tend to become colonized by antibiotic-resistant microorganisms, especially *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Candida albicans* (20, 33).

The results of our study did not show a significant difference in the number of microorganism colonies present in the skin flora among the preterm newborns in hospital that were bathed with water only and those based with a mild pH neutral soap and water.

When we compare the colonization on the skin of preterm newborns in both groups at the times before and after bathing, the values of microorganism colonies counts in the two groups underwent a significant reduction, although no significant difference was found between the groups.

No research study similar to the one we performed on preterm newborns in a NICU was found in the literature. There is a single study comparing bathing with water only and bathing with soap in full-term neonates. Medves and O'Brien compared the skin cultures of two groups of full-term neonates in the admission bath, right after birth, when their skin is covered by maternal fluids from the delivery. This study showed that right after birth, both the first bath with water and soap and that performed with water only have a minimal effect on the bacterial colonization of skin at birth (19).

A study performed by Gaftter *et al.* showed that bathing with soap triggers an elevation in skin pH which interferes in physiological protection (acid mantle) provoking a change in the composition of the cutaneous bacterial flora and in the activity of enzymes on the epidermis (8). For this reason, the use of soap to bathe the neonate once or twice a week is recommended considering the daily bath routine a practice which is responsible for drying

skin and predisposes to breakdown (6, 34). The lack of skin integrity favors the penetration of bacteria and fungi present in the skin flora, and may develop into a systemic infection (35).

In the present study, skin culture was not a good predictor of sepsis, since a small number of cases with positive blood culture was found, i.e., of the 73 preterm newborns in the study, only three developed sepsis between the time of randomization and the culture collection. Possibly this association may be explained if it results from a sample with a larger number of cases. However, the sample was not calculated for this purpose, although, according to Evans *et al.*, the surface cultures of the skin are of limited value in predicting the etiology of neonatal sepsis (28).

Since nosocomial infections are multifactorial in origin, the factors involved in this disease need to be analyzed by health care team professionals who take care of the hospitalized preterm newborn, in order to make it possible to generate preventive measures to control hospital infection (36).

Few studies have investigated risk factors for colonization, particularly in NICU patients (25). Studies to elucidate the epidemiology of colonization, the pathogenic microorganism colonization mechanisms and preventive interventions must be prioritized in future studies (20). Among those that deserve further investigation are the bathing techniques for preterm newborns in a NICU, since they play an important role in skin colonization.

The results this study suggest that bathing the preterm newborns with mild pH neutral soap and water and bathing them with water alone produces similar effects on the skin colonization of a preterm neonate in the NICU. Both are effective to reduce the number of colonies of gram-positive and gram-negative bacteria.

**Acknowledgements:** The authors thank Prof. Dr. Mario Wagner for his assistance with the statistical analysis.

## REFERENCES

1. Garcia-Gonzalez E, Rivera-Rueda MA. Neonatal dermatology: skin care guidelines, *Dermatol Nurs* 1998;10:274-5, 279-81.
2. Munson KA, Bare DE, Hoath SB, Visscher MO. A survey of skin care practices for premature low birth weight infants. *Neonatal Netw* 1999;18:25-31.
3. Stoll BJ, Hansen N, Fannaroff AA, Wright L, Carlo WA, Ehrenkrans R, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD neonatal research network. *Pediatrics* 2002; 2:285-91.
4. Darmstadt GL, Dinulos JG. Neonatal skin care. *Pediatr Clin North Am* 2000;47:757-82.
5. Franck LS, Quinn D, Zahr L. Effect of less frequent bathing of preterm infants on skin flora and pathogen colonization. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2000;29(6):584-9.
6. Lund C, Kuller J, Lane A, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: the scientific basis for practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 1999;28:241-54.
7. Schmid MH, Korting HC. The concept of the acid mantle of the skin: its relevance for the choice of skin cleansers. *Dermatology* 1995;191:276-80.
8. Gfatter R, Hackl P, Braun F. Effects of soap and detergents on skin surface pH, stratum corneum hydration and fat content in infants. *Dermatology* 1997;195:258-62.
9. Wolf R, Wolf D, Tüzün B, Tüzün Y. Soaps, shampoos, and detergents. *Clin Dermatol* 2001;19:393-7.
10. Baranda L, Gonzalo-Amaro R, Torres-Alvares B, Alvares C, Ramírez V. Correlation between pH and irritant effect of cleansers marked for dry skin. *Int J Dermatol* 2002;41:494-9.
11. Lodén M, Buraczewska I, Edlund F. The irritation potential and reservoir effect of mild soaps. *Contact Dermatitis* 2003;49:91-6.
12. Fox C, Nelson D, Warechsm J. The timing of skin acidification in very low birth weight infants. *J Perinatol* 1998;18:272-5.

13. Visscher MO, Chatterjee R, Munson KA, Pickens WL, Hoath SB. Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life. *Pediatr Dermatol* 2000;17:45-51.
14. Yosipovitch G, Maayan-Metzger A, Merlob P, Sirota L. Skin barrier properties in different body areas in neonates. *Pediatrics* 2000;106:105-8.
15. Fluhr JW, Behne MJ, Brown BE, Moskowitz DG, Selden C, Mao-Qiang M, et al. Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum. *J Invest Dermatol* 2004;122:320-9.
16. Hoeger PH, Enzmann CC. Skin physiology of the neonate and young infant: a prospective study of functional skin parameters during early infancy. *Pediatr Dermatol* 2002;19:256-62.
17. Nix DH. Factors to consider when selecting skin cleansing products. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 2000;27:260-8.
18. Lund C. Prevention and management of infant skin breakdown. *Nurs Clin North Am* 1999;34(4):907-20.
19. Medves JM, O'Brien B. Does bathing newborns remove potentially harmful pathogens from the skin? *Birth* 2001;28:161-5.
20. Jarvis WR. The epidemiology of colonization. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996;17(1):47-52.
21. Savey A, Fleurette J, Salle BL. An analysis of microbial flora of premature neonates. *J Hosp Infect* 1992;21:275-89.
22. Davies M, Mehr S, Garland ST, Morley CJ. Bacterial colonization of toys in neonatal intensive care cots. *Pediatrics* 2000;106(2):e18-e22.
23. Villari P, Sarnataro C, Iacuzio L. Molecular epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* in a neonatal intensive care unit over a three-year period. *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1740-6.
24. Kilbride HW, Wirtschafter DD, Powers R, Sheehan MB. Implementation of evidence-based potentially better practices to decrease nosocomial infections. *Pediatrics* 2003;111(Supl. 2):e519-e533.
25. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin T. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20(12):1119-24.
26. Ballard JL, Wedig K, Wang L, Ellers-Walsman L, Lipp R. New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants. *J Pediatr* 1991; 119:417-23.

27. Abramson JH, Gahlinger P. Computer programs for epidemiologists: PEPI v. 3.0. Salt Lake City, Utah: Sagebrush Press; 2000.
28. Evans ME, Schaffner W, Federspiel CF, Cotton RB, McKee T, Stratton CW. Sensitivity, specificity, and predictive value of body surface cultures in a neonatal intensive care unit. *JAMA* 1988;259(2):248-52.
29. Keyworth N, Millar MR, Holland KT. Development of cutaneous microflora in premature neonates. *Arch Dis Child* 1992; 67(7Spec No):797-801.
30. D'Angio CT, McGowan KL, Baumgart S, Geme JS, Harris MC. Surface colonization with coagulase-negative staphylococci in premature neonates. *J Pediatr* 1989;114(6):1029-34.
31. Cowan ME, Frost MR. A comparison between a detergent baby bath additive and baby soap on the skin flora of neonate. *J Hosp Infect* 1986;7:91-5.
32. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001; 6(3):170-4.
33. Lund CH, Osborne JW, Kuller J, Lane AT, Lott JW, Raines DA. Neonatal skin care: clinical outcomes of the AWHONN/NANN evidence-based clinical practice guideline. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2001;30(1):41-51.
34. Maguire D P. Skin protection and breakdown in the ELBW infant. *Clin Nurs Res* 1999;8(3):222-34.
35. Rowen JL, Atkins JT, Levy ML, Baer SC, Baker CJ. Invasive fungal dermatitis in the  $\leq$  1000-gram neonate. *Pediatrics* 1995;95:682-7.
36. Edwards WH. Preventing nosocomial bloodstream infection in very low birth weight infants. *Semin Neonatol* 2002;7:325-33.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O banho altera o pH da pele. O tipo de banho pode representar um papel importante na colonização da pele. Recém-nascidos pré-termo banhados com sabonete neutro e água ou somente com água apresentaram quantidades elevadas de bactérias gram-positivas em culturas da superfície cutânea.

O tipo de microorganismo presente na pele não foi significativamente diferente na comparação dos dois grupos, tendo o *Staphylococcus coagulase* negativo sido a bactéria mais prevalente na pele de ambos os grupos.

Os resultados deste estudo não demonstraram diferença significativa na comparação da contagem de colônias de microorganismos presentes na pele antes do banho nos dois grupos de recém-nascidos pré-termo estudados.

Houve, no entanto, diferença significativa na quantidade de colônias de microorganismos presentes nas culturas antes e após o banho, o que indica que a colonização da pele diminuiu em ambos os grupos de maneira semelhante, sem diferença significativa na colonização cutânea entre os dois grupos de recém-nascidos pré-termo.

Os resultados evidenciados pela pesquisa sugerem que o banho com sabonete neutro e água e o com somente água produzem efeito semelhante sobre a colonização da pele do recém-nascido pré-termo hospitalizado em UTIN. Ambos são eficazes na redução do número de colônias de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

## **ANEXOS**



---

---

## ANEXO A

---

---

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado senhor (a):

Estamos realizando uma pesquisa com a finalidade de avaliar os efeitos do banho com água e sabonete neutro e do banho com água pura sobre a colonização da pele do bebê pré-termo. Esta avaliação será realizada através da comparação da colonização da pele entre bebês pré-termos banhados com água e sabonete neutro e bebês pré-termo banhados com água pura. Através deste trabalho, esperamos que os resultados possam auxiliar na escolha da substância mais indicada para o banho deste tipo de bebê.

Gostaríamos de obter autorização para incluir o seu filho neste estudo. Ressaltamos que será assegurado o caráter confidencial das informações, a possibilidade de interromper a participação de seu filho na pesquisa a qualquer momento e que os dados coletados serão utilizados unicamente para fins científicos.

A participação do seu filho neste estudo será através do exame da pele. Para isso, se passará suavemente na região da axila do bebê um cotonete de algodão antes de um banho e outro após 30 minutos deste mesmo banho. O bebê será incluído em um grupo que seguirá a rotina do HCPA (banho com água e sabonete líquido) ou em um grupo experimental que receberá banho apenas com água, uma vez que não existem evidências de que um procedimento seja melhor que o outro.

Este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde deste Hospital com o nº \_\_\_\_\_.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto de Pesquisa são o Dr. Renato Procianoy e a Enf. Maria Luzia da Cunha.

Fones para contato: 3316 8794 e 9955 0207.

Agradecemos a sua colaboração.

Eu \_\_\_\_\_, ( ) mãe, ( ) pai do RN \_\_\_\_\_ declaro que fui informado dos objetivos e justificativas desta pesquisa de forma clara e detalhada. Todas as minhas dúvidas foram respondidas e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Este termo foi elaborado em duas vias, sendo entregue uma para o pesquisador e outra para o entrevistado, em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

---

Assinatura do responsável pelo recém-nascido

---

Maria Luzia da Cunha (pesquisadora)

**ANEXO B**

**Ficha protocolo**

Número no banco de dados: .....

Nome do RN: .....

Registro: ..... Data de nascimento: .....

Idade gestacional: ..... Idade atual: .....

Peso do nascimento: ..... Sexo: F ( ) M ( )

Uso de antibióticos: Sim ( ) Não ( )

Término dos antibióticos sete dias antes da coleta: Sim ( ) Não ( )

Observações: .....

Data da coleta: ..... Hora: .....

Coleta de *swab* da pele da axila direita, antes do banho

Resultado: .....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Coleta de *swab* da pele da axila direita, após 30 minutos do banho

Resultado: .....

.....

.....

.....

.....

## ANEXO C

### Grupo A – RN pré-termo que receberam banho somente com água

Paciente	IG (sem)	PN (g)	Cultura I		Cultura II	
			Germe	UFC/ml	Germe	UFC/ml
1	29	1.030	1	4.000	1	1.000
2	31	1.195	2	6.400	2	3.600
3	30	1.560	1	2.500	1	320
4	32	970	1	8.000	1	8.000
			6	140	0	0
5	32	1.395	1	100.600	1	5460
6	33	1.565	1	180.000	1	15.000
7	34	1.560	1	55.000	1	20.000
			3	40	0	0
8	32	1.680	1	8.000	1	1.000
			3	340	0	0
9	31	1.375	1	21.500	1	10.450
10	34	1.405	1	50.000	0	0
			2	10.000	2	5.300
11	29	895	1	2.100	0	0
12	32	1.750	1	21.600	1	10.000
13	32	1.620	1	8.800	1	1.300
14	31	1.210	1	200	1	100
15	33	1.665	1	1.300	1	1.080
16	28	1.335	1	200	1	100
			5	20	0	0
			7	60	0	0
17	32	1.375	1	50.000	1	30.000
			2	1.000	2	400
18	35	1.690	1	6.140	1	2.400
19	30	935	1	10.000	1	8.000
20	28	960	1	80	0	0
			8	400	0	0
21	32	1.200	1	1.500	1	300
22	28	870	1	800	0	0
			4	400	0	0
			9	20	0	0
23	35	1.660	2	4.000	2	3.200
24	33	1.285	2	800	2	500
25	35	1.385	2	2.400	2	2.000
26	32	1.725	1	100.000	1	100.000
27	35	1.705	1	100.000	1	100.000
28	33	1.540	1	200.000	1	200.000
29	30	1.380	1	80.000	1	80.000
30	31	1.140	1	160	1	140
31	29	1.040	1	8.000	1	2.000
32	35	1.440	1	400	0	0
33	31	1.230	1	2.200	1	1000
			10	200	0	0

IG – Idade Gestacional; PN – Peso do nascimento

Germes: 1 - *Staphylococcus coagulase* negativo; 2 - *Staphylococcus aureus*; 3 - *Klebsiela pneumoniae*; 4 - *Enterobacter sp.*; 5 - *Eschericia. coli*; 6 - *Klebsiela oxytoca*; 7 - *Stenotrophomonas maltophilia*; 8 - *Acinetobacter sp.*; 9 - *Serratia sp.*; 10 - *Cândida sp.*

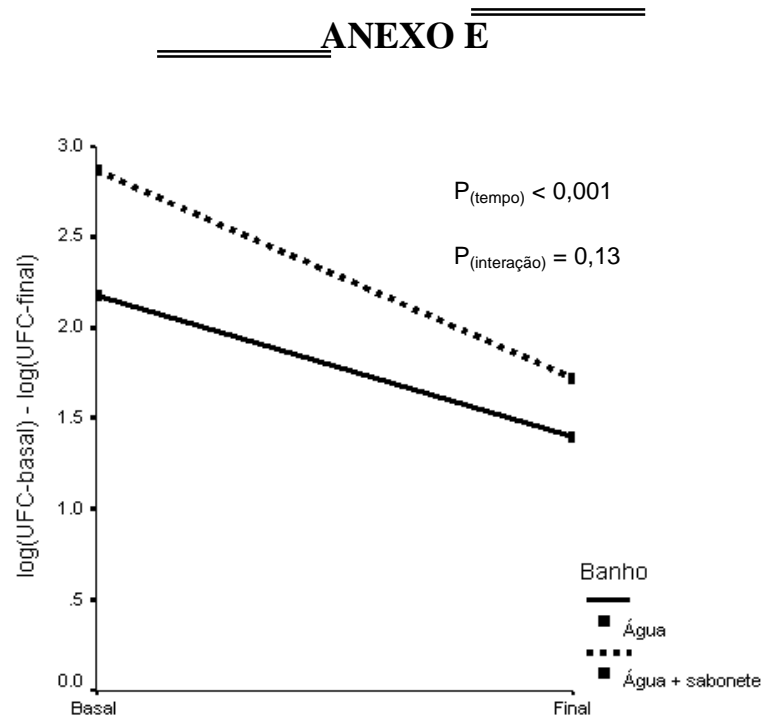
## ANEXO D

### Grupo B – RN pré-termo que receberam banho com sabonete neutro e água

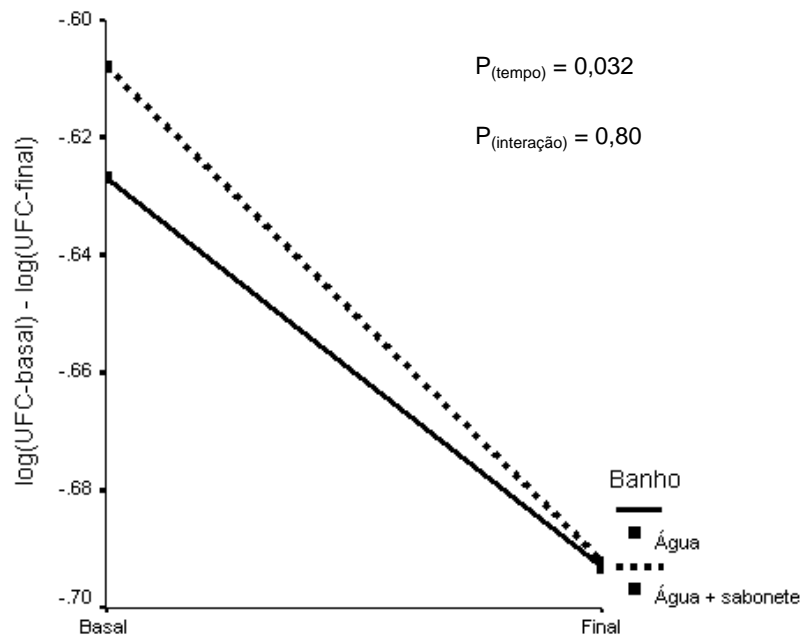
Paciente	IG (sem)	PN (g)	Cultura I		Cultura II	
			Germe	UFC/ml	Germe	UFC/ml
1	34	1.435	1	5.800	1	4.000
2	29	850	1	2.400	1	160
3	34	1.245	1	1.800	1	1.200
4	33	1.420	0	0	0	0
5	32	1.000	1	41.000	1	20.600
6	32	1.665	1	5.140	1	5.140
7	32	845	1	20.400	1	15.400
8	32	1.310	1	100.000	1	80.000
			2	600	2	400
9	34	1.200	1	2.400	1	600
10	30	1.355	1	100.000	1	20.000
11	34	1.515	1	100.000	1	100.000
12	33	1.215	1	10.000	1	6.000
			2	240	2	200
13	34	1.610	1	21.000	1	2.600
14	32	1.390	1	1.200	1	100
			4	40	0	0
15	31	1.475	1	100.000	1	1.200
			2	2.400	0	0
16	33	1.595	1	20.000	1	1.000
17	32	1.570	1	680	1	400
18	33	1.245	1	100.000	1	4.000
			2	300	0	0
19	30	985	1	8.900	1	6.000
20	33	1.315	1	2.800	1	400
21	31	1.655	1	6.440	1	560
22	33	1.545	1	12.000	1	2.000
			2	160	0	0
23	32	1.755	1	6.000	1	3.000
24	32	1.455	1	100.000	1	20.000
25	33	1.185	1	50.000	1	6.000
26	33	1.640	1	60.000	1	20.000
27	31	1.375	1	1.000	0	0
			2	160	0	0
28	31	1.305	1	3.000	1	3.000
29	34	1.580	1	18.800	1	2.000
30	33	1.530	2	5.000	2	4.000
31	32	1.350	1	8.400	1	360
			2	400	0	0
32	33	1.500	1	100.000	1	100.000
			2	80.000	2	50.000
33	35	1.675	1	200.000	1	100.000
34	31	1.355	1	100.000	1	100
			3	2.300	3	20
35	33	1.645	1	12.000	1	12.000
36	31	1.295	2	100.000	2	100.000
			4	2.000	0	0
37	31	1.345	1	100.000	1	100.000
38	33	1.415	1	100.000	1	100.000
			2	100.000	2	100.000
39	28	1.110	2	6.000	2	1.200
40	34	1.415	1	100.000	1	4.000

IG – Idade Gestacional; PN – Peso do nascimento

Germes: 1 - *Staphylococcus coagulase* negativo; 2 - *Staphylococcus aureus*; 3 - *Klebsiela pneumoniae*; 4 - *Enterobacter sp.*; 5 - *Eschericia. coli*; 6 - *Klebsiela oxytoca*; 7 - *Stenotrophomonas maltophilia*; 8 - *Acinetobacter sp.*; 9 - *Serratia sp.*; 10 - *Cândida sp.*



**Figura 1** - Diferença basal-final de germes gram-positivos. Teste ANOVA de medidas repetidas



**Figura 2** - Diferença de basal-final de germes gram-negativos. Teste ANOVA de medidas repetidas