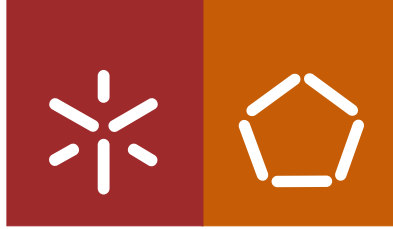


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Diana Sofia Rodrigues Machado

**Investigação dos biofilmes microbianos
em cateteres de diálise peritoneal**



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Diana Sofia Rodrigues Machado

Investigação dos biofilmes microbianos em cateteres de diálise peritoneal

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Rosário Oliveira
e da
Doutora Margarida Martins

Outubro de 2012

DECLARAÇÃO

Nome: Diana Sofia Rodrigues Machado

Endereço eletrónico: a52550@alunos.uminho.pt

Telefone: 912119615

Número do Bilhete de Identidade: 13534635

Título dissertação Investigação dos biofilmes microbianos em cateteres de diálise peritoneal

Orientadores: Professora Doutora Rosário Oliveira

Doutora Margarida Martins

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE.

Universidade do Minho, 31/10/2012

Diana Sofia Rodrigues Machado

*A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.*

Albert Einstein

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram na realização desta dissertação e, conseqüentemente, na finalização do meu curso.

À **Doutora Rosário Oliveira**, por toda a orientação e disponibilidade, pelo apoio e motivação, que foram importantes para que tudo corresse bem.

À **Doutora Margarida Martins**, que se demonstrou ser um importante alicerce para o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada por todo o apoio e incentivo, por todas as palavras de amizade, principalmente nos momentos em que nada parecia correr bem, pela transmissão de conhecimentos e por toda a paciência que teve para me ensinar e para corrigir toda a dissertação.

À **enfermeira Olívia Santos**, à **Doutora Anabela Rodrigues**, ao **Doutor António Cabrita** e à **Doutora Maria João Carvalho** do Serviço de Nefrologia do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António e à **Doutora Ana Marta Gomes** do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, pela disponibilização das amostras para este estudo e pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram ao longo do trabalho.

À **Doutora Elsa Ribeiro**, pelo apoio prestado no laboratório de Microscopia Eletrónica e ao **Doutor Cledir Santos**, pela disponibilização do espectrómetro MALDI-TOF.

A todos **os colegas do LMA**, por me terem recebido tão bem e por estarem sempre disponíveis a esclarecer qualquer dúvida.

Esta dissertação representa o culminar de uma etapa muito importante da minha vida. Como tal, não posso deixar de agradecer às pessoas mais importantes que, embora não estando diretamente ligadas a este trabalho, foram um grande apoio para mim ao longo de todos estes anos, contribuindo em muito para o meu sucesso e para a minha realização pessoal.

Aos **meus pais**, por todo o apoio e encorajamento ao longo destes anos, por me erguerem a cabeça nos momentos mais difíceis e por terem acreditado em mim mais do que eu própria. Todas as palavras são poucas para vos agradecer!

Ao **Pedro**, pelo amor e carinho, por todo o incentivo, confiança e, claro, por toda a felicidade que me dá.

Aos **meus amigos** de curso, a minha “segunda família”, pela amizade, por todo o apoio e por todos os momentos que partilhamos, muitos deles os melhores da minha vida.

Resumo

A diálise peritoneal (DP) é um dos tratamentos disponíveis para a insuficiência renal crónica. Esta técnica permite a remoção de substâncias tóxicas e de fluidos em excesso do sangue, através do peritoneu, usando uma solução que é introduzida na cavidade peritoneal por via de um cateter. Apesar de apresentar várias vantagens em relação à hemodiálise, um dos principais problemas associados à DP são as infeções. Embora existam na literatura vários estudos relativos à análise microbiológica de amostras de efluentes e do orifício de saída, a investigação relativa aos biofilmes em cateteres de DP é escassa. Contudo, foi sugerido que a presença de biofilme no cateter está associada a peritonites recorrentes, recidivantes e repetitivas.

Desta forma, o principal objetivo do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação consistiu no estudo microbiológico de biofilmes associados a cateteres de DP. Complementarmente, foram avaliadas as metodologias de análise microbiológica dos diferentes elementos cateteres de DP (extensores, segmento externo, *cuffs* e segmento intraperitoneal), usando cateteres de hemodiálise e cateteres contaminados *in vitro*. Adicionalmente, foi efetuada a avaliação dos agentes patogénicos associados a peritonites e infeções do orifício de saída (IOS). A análise das diferentes amostras de DP envolveu a execução de métodos de cultura qualitativos e (semi-) quantitativos e a identificação dos microrganismos isolados, utilizando meios seletivos e diferenciais e *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

Neste estudo foram analisados 55 extensores, 10 cateteres permanentes de DP, 6 amostras de efluente e 3 do orifício de saída. Da análise efetuada aos cateteres verificou-se que na maior parte das amostras a densidade celular dos extensores e dos segmentos externos foi inferior a 300 UFC/extensor e inferior a 3000 UFC/segmento, respetivamente. Nos *cuffs*, em geral, a densidade celular foi inferior a 15000 UFC/*cuff*; no entanto, para uma percentagem significativa de amostras foi superior a 15000 UFC/*cuff*. Na maioria dos segmentos intraperitoneais, a densidade celular foi inferior ao limite de deteção (100 UFC/segmento). Portanto, em geral foi observada maior densidade celular nos *cuffs* do que nos restantes segmentos dos cateteres. Em concordância, a densidade celular nas amostras do orifício de saída foi superior a 15000 UFC/zaragatoa e na maioria dos efluentes foi entre 1 e 14 UFC/mL. Todos os microrganismos identificados por MALDI-TOF MS nos cateteres, peritonites e IOS pertencem ao domínio Bacteria. As bactérias Gram-positivas foram as mais frequentemente encontradas. No caso dos cateteres, as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, especificamente *Staphylococcus epidermidis*, e *Pseudomonas aeruginosa* foram as maioritariamente identificadas entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respetivamente. Contudo, foram identificadas espécies não associadas a cateteres de DP até à data, tais como *Sphingomonas*, *Delftia acidovorans* e *Herbaspirillum huttiense*. No caso dos efluentes e das zaragatoas, foram maioritariamente identificadas espécies do género *Staphylococcus*. Contudo, 42% dos isolados de extensores, 32% dos isolados de cateteres permanentes e 25% dos isolados do orifício de saída não foram identificados por MALDI-TOF MS.

Em conclusão, este trabalho permitiu mostrar a importância das bactérias Gram-positivas na colonização de cateteres de DP e nas infeções.

Abstract

Peritoneal dialysis (PD) is one of the treatments available for chronic kidney disease. This technique allows the removal of excess toxic substances and fluid from blood, through the peritoneum, using a solution that is introduced into the peritoneal cavity through a catheter. Despite the several advantages of PD over hemodialysis, infections are a major concern in PD. Although there are several studies in the literature concerning the microbiological analysis of effluents and exit-site samples, the investigation of biofilms on PD catheters is scarce. However, it has been suggested that the presence of biofilms on the catheters is associated to recurrent, relapsing and repeat peritonitis.

Thus, this work aimed at investigating PD catheter-associated microbial biofilms. Additionally, the methodologies used for microbiological analysis of PD catheters segments (transfer set, external, cuffs and intraperitoneal) were evaluated using hemodialysis catheters and catheters contaminated *in vitro*. Furthermore, the microbial agents associated with peritonitis and exit-site infections (ESI) were evaluated. The PD samples were analyzed using qualitative and (semi-) quantitative culture methods and microorganisms were identified using selective and differential media and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry.

In this study, 55 transfer sets, 10 PD permanent catheters, 6 effluent samples and 3 exit-site samples were analyzed. The analysis performed on catheters showed that the transfer sets and the external segments cell density was low: less than 300 CFU/ segment and less than 3000 CFU/ segment, respectively. Regarding the cuffs, the cell density observed was lower than 15000 CFU/ cuff, although for a significant percentage of samples it was found to be above 15000 CFU/ cuff. On the other hand, for most intraperitoneal segments, the cell density was below the detection limit (100 CFU/segment). Thus, in general the cell density in the cuffs was higher than in the other catheter segments. In accordance, the cell density in exit-site samples was above 15000 CFU/swab and in the effluent samples it was only between 1 and 14 CFU/mL. All the MALDI-TOF MS identified microorganisms recovered from the samples analyzed belong to the domain Bacteria. Gram-positive bacteria were the most frequently found. For catheters, coagulase-negative Staphylococci, namely *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* were the most frequently identified Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, species not yet described in PD catheters, such as *Sphingomonas*, *Delftia acidovorans* and *Herbaspirillum huttiense* were identified herein. In the case of effluent and swab samples, microorganisms belonging to the *Staphylococcus* genus were the most frequently identified. However, 42% of isolates from transfer sets, 32% of isolates from permanent catheters and 25% of isolates from exit-site samples were not identified using MALDI-TOF MS.

In conclusion, this study revealed the relevance of Gram-positive bacteria in the PD catheter colonization and infections.

Índice

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Índice.....	VII
Índice de Tabelas	XI
Índice de Figuras	XII
Lista de Abreviaturas	XIII
Preâmbulo.....	XIV
1 Introdução.....	15
1.1 Diálise Peritoneal.....	15
1.1.1 Sistema de diálise peritoneal.....	17
1.1.2 Infecções associadas à diálise peritoneal	19
1.1.2.1 Definições, sintomas e diagnóstico	19
1.1.2.2 Vias de entrada dos microrganismos	21
1.1.2.3 Principais agentes patogénicos e terapêutica recomendada	22
1.2 Biofilmes microbianos.....	26
1.2.1 Definição e estrutura do biofilme.....	26
1.2.2 Formação do biofilme	27
1.2.3 Tolerância dos biofilmes a agentes antimicrobianos.....	29
1.3 Biofilmes microbianos em diálise peritoneal	30
1.3.1 Metodologias de análise do biofilme de cateteres	30
1.3.1.1 Métodos microscópicos.....	30
1.3.1.2 Métodos de recuperação de microrganismos do biofilme	30

1.3.1.3 Métodos de identificação dos microrganismos recuperados	34
1.3.2 Evidência do biofilme associado ao cateter de diálise peritoneal.....	35
1.3.3 Composição microbiológica do biofilme associado ao cateter de diálise peritoneal ..	37
1.3.4 Relação entre biofilme associado ao cateter e as infeções em diálise peritoneal	38
1.3.5 Estratégias de prevenção da formação de biofilmes em cateteres de diálise peritoneal	38
1.4 Objetivos	40
2 Materiais e Métodos	41
2.1 Meios de cultura e soluções.....	41
2.1.1 <i>Tryptic Soy Broth</i>	41
2.1.2 <i>Tryptic Soy Agar</i>	41
2.1.3 <i>Mannitol Salt Agar</i>	42
2.1.4 <i>Eosin Methylene Blue Levine Agar</i>	42
2.1.5 <i>Luria– Bertani Agar</i>	42
2.1.6 Efluente artificial de diálise peritoneal.....	42
2.1.7 <i>Phosphate Buffered Saline</i>	43
2.1.8 NaCl 0,9%	43
2.1.9 Solução matriz 2,5 – ácido dihidroxidobanzoico	43
2.2 Microrganismos.....	43
2.2.1 Estirpes de referência e isolados clínicos.....	43
2.2.2 Manutenção e armazenamento	44
2.3 Pesquisa de microrganismos aeróbios em amostras de diálise peritoneal	44
2.3.1 Colheita e transporte de amostras.....	44
2.3.2 Recuperação dos microrganismos dos diferentes tipos de amostras	45
2.3.2.1 Efluentes de diálise peritoneal	45

2.3.2.2 Zaragatoas do orifício de saída	45
2.3.2.3 Extensores de cateter de diálise peritoneal	46
2.3.2.4 Cateteres permanentes de diálise peritoneal.....	46
2.3.2.4.1 Segmento externo	46
2.3.2.4.2 <i>Cuffs</i>	46
2.3.2.4.3 Segmento intraperitoneal	47
2.3.3 Isolamento e (semi-) quantificação dos microrganismos	47
2.3.4 Avaliação de metodologia para a recuperação de microrganismos em zaragatoas do orifício de saída.....	48
2.3.5 Avaliação da metodologia para a recuperação de microrganismos em cateteres de diálise peritoneal.....	49
2.3.5.1 Extensor/ segmento externo	49
2.3.5.1.1 Descontaminação da superfície extraluminal	49
2.3.5.1.2 Recuperação de microrganismos da superfície intraluminal	49
2.3.5.2 <i>Cuff</i>	51
2.3.5.3 Segmento intraperitoneal	52
2.3.6 Avaliação do efeito da sonicação na viabilidade celular dos microrganismos recuperados.....	52
2.3.7 Identificação dos microrganismos	52
2.3.7.1 Identificação com base em meios seletivos e diferenciais	52
2.3.7.2 Identificação por MALDI-TOF MS	53
2.4 Microscopia.....	53
2.5 Análise estatística	53
3 Resultados	55
3.1 Efeito da sonicação na viabilidade celular dos microrganismos	55

3.2 Validação das metodologias de recuperação de microrganismos das amostras de diálise peritoneal	55
3.2.1 Zaragatoas do orifício de saída	55
3.2.2 Extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal.....	56
3.2.2.1 Extensor/ Segmento externo	56
3.2.2.2 <i>Cuff</i>	58
3.2.2.3 Segmento intraperitoneal	60
3.3 Recuperação de microrganismos das amostras de diálise peritoneal	60
3.3.1 Efluentes	60
3.3.2 Zaragatoas do orifício de saída	61
3.3.3 Extensores.....	62
3.3.4 Cateteres permanentes.....	65
3.4 Análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento e por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X.....	70
4 Discussão.....	73
5.1 Conclusões	84
5.2 Sugestões de trabalho	85
6 Bibliografia	87

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Terminologia recomendada para as peritonites	20
Tabela 2 - Classificação recomendada para infeções do orifício de saída.....	21
Tabela 3 - Resultados da recuperação e da identificação microbiana realizados em cateteres removidos de pacientes em DP	32
Tabela 4 - Número de UFC do inóculo inicial e presente nos sobrenadantes após incubação relativo aos ensaios de recuperação de biofilme em extensores contaminados <i>in vitro</i> com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	57
Tabela 5 - Detecção de microrganismos nos <i>cuffs</i> de cateteres de HD através de dois métodos de análise semi-quantitativa (<i>rolling</i> e sonicação pós- <i>rolling</i>)	59
Tabela 6 - Resultados da recuperação microbiana efetuada nos efluentes de DP	61
Tabela 7 - Resultados da recuperação microbiana efetuada nas zaragatoas do orifício de saída	62
Tabela 8 - Resultados da recuperação microbiana em extensores de cateteres de DP em que foram detetados microrganismos pelos métodos microbiológicos	63
Tabela 9 - Resultados da identificação presuntiva dos microrganismos recuperados a partir dos extensores de DP e não identificados por MALDI- TOF MS	65
Tabela 10 - Resultados da recuperação microbiana efetuada em cateteres permanentes de DP... ..	67
Tabela 11 - Resultados da identificação presuntiva dos microrganismos recuperados a partir dos cateteres permanentes e não identificados por MALDI- TOF MS.....	69
Tabela 12 - Detecção de microrganismos nos <i>cuffs</i> de cateteres de DP através de dois métodos de análise semi-quantitativa (<i>rolling</i> e sonicação pós- <i>rolling</i>)	70

Índice de Figuras

Figura 1 - Diagrama representativo do sistema de A) DPCA e B) DPA	17
Figura 2 - Diagrama representativo de um cateter permanente <i>Tenckhoff</i> curvo com duplo <i>cuff</i>	18
Figura 3 - Diagrama representativo das vias de entrada dos microrganismos para a cavidade peritoneal	22
Figura 4 - Fases da formação de um biofilme numa superfície.....	27
Figura 5 - Número de UFC recuperado por raspagem e por sonicação pós-raspagem (controlo da raspagem) dos extensores contaminados <i>in vitro</i> com <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>P. aeruginosa</i> . Os valores exatos do número de UFC introduzido encontram-se na Tabela 4. ** Para o extensor contaminado com $\approx 10^3$ UFC de <i>S. aureus</i> não são apresentados resultados devido à ocorrência de um erro experimental na raspagem.....	58
Figura 6 - Imagens de MEV representativas da superfície intraluminal da marca A (A) e da marca B (B) e respetiva composição elementar (C) e (D) analisada por EDS. O ouro detetado nas amostras corresponde ao revestimento usada para análise. yy: 0 - 4×10^3 counts.	71
Figura 7 - Imagens de MEV representativas da superfície intraluminal da amostra 5 (A) e da amostra 6 (B) e respetiva composição elementar (C) e (D) analisada por EDS. O ouro detetado nas amostras corresponde ao revestimento usada para análise. yy: 0 - 4×10^3 counts.....	72

Lista de Abreviaturas

API	<i>Analytical Profile Index</i>
DHB	2,5-ácido dihidroxidobenzoico
DP	Diálise Peritoneal
DPCA	Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória
DPA	Diálise Peritoneal Automática
EADP	Efluente Artificial de Diálise Peritoneal
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X
EMBA	<i>Eosin Methylene Blue Levine Agar</i>
HD	Hemodiálise
IOS	Infeção do Orifício de Saída
IR	Insuficiência Renal
ISPD	<i>International Society for Peritoneal Dialysis</i>
IT	Infeção do Túnel
LBA	<i>Luria-Bertani Agar</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time- of- Flight Mass Spectrometry</i>
MCVL	Microscopia Confocal de Varrimento a Laser
MET	Microscopia Eletrónica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
MSA	<i>Mannitol Salt Agar</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	rotações por minuto
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

Preâmbulo

A premência do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação está relacionada com o facto de se prever um aumento na prescrição da diálise peritoneal (DP) para o tratamento de pacientes com insuficiência renal e de as infeções associadas a cateter, nomeadamente as peritonites, representarem uma importante causa de falha da técnica. Pensa-se que o biofilme no cateter está associado à recorrência e repetição das peritonites, no entanto os estudos associados à investigação de biofilmes microbianos em cateteres são limitados. O tratamento inadequado das infeções predispõe para complicações que eventualmente conduzem à remoção do cateter. Consequentemente, o conhecimento das características do biofilme e do seu desenvolvimento é importante para promover estratégias preventivas e adjuvantes em DP. Deste modo, neste trabalho foi efetuada a análise da composição microbiológica de biofilmes recuperados de extensores e de cateteres permanentes recolhidos de pacientes em DP. Adicionalmente foi realizada a avaliação dos principais agentes patogénicos responsáveis pelas infeções (peritonites e IOS) na população em estudo.

Parte dos resultados obtidos nesta dissertação foram apresentados sob a forma de Poster na Conferência “Microbial Diagnostic Applications of Mass Spectrometry”, 4 e 5 de Abril de 2012, em Londres, segundo a referência Martins, M., Santos, C., Machado, D.; Maciel, M., Lima, N.; Santos, O., Rodrigues, A., Cabrita, A., Carvalho, M.J., Silva, H., Silva, F., Queirós, J., Gomes, A. M. & Oliveira, R. (2012) “Application of MALDI-TOF MS to the identification of dialysis catheters associated microorganisms”.

Esta dissertação está dividida em seis capítulos principais. No Capítulo 1 são apresentados conceitos teóricos sobre a DP, infeções associadas a esta modalidade dialítica e os biofilmes microbianos. Também é apresentada uma revisão bibliográfica dos métodos que têm sido adotados para o estudo dos biofilmes em cateteres de DP, dos resultados da análise microbiológica e das estratégias que têm sido estudadas para minimizar a formação de biofilme. No Capítulo 2 encontram-se descritos os materiais usados e métodos efetuados durante o trabalho experimental. No Capítulo 3 estão apresentados os resultados obtidos no trabalho experimental e no Capítulo 4 é feita a discussão desses resultados. No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões e fornecidas algumas sugestões para trabalhos futuros. No Capítulo 6 compreende as referências bibliográficas de onde foi recolhida a informação necessária para o desenvolvimento da dissertação.

1 Introdução

1.1 Diálise Peritoneal

Os rins são os principais órgãos excretores do organismo humano e desempenham um papel muito importante na manutenção homeostática do organismo. Em geral, as funções dos rins incluem: (1) a produção e a excreção de urina, através da qual são removidas do organismo substâncias tóxicas resultantes do metabolismo celular (como a ureia, a creatinina e o ácido úrico), substâncias ingeridas na dieta e fármacos; (2) a manutenção do equilíbrio de eletrólitos, através da eliminação, reabsorção e conservação de íons de sódio, potássio, bicarbonato, cloro e hidrogénio; (3) a regulação da osmolaridade dos fluidos extracelulares, por ação da hormona antidiurética; (4) a regulação da pressão sanguínea, a partir do controlo de sais e do volume de água e através do mecanismo renina-angiotensina-aldosterona; (5) a produção da forma ativa da vitamina D, necessária para absorção óssea do cálcio; e (6) a síntese de eritropoietina, necessária para controlar a produção de eritrócitos na medula óssea (Sodré *et al.* 2007, Porth 2010).

Os casos em que os rins não desempenham adequadamente as suas funções são clinicamente designados por insuficiência renal (IR) que pode ser classificada de aguda ou crónica. A IR aguda consiste na perda súbita da função renal, sendo na maioria das vezes reversível. A IR crónica é um processo evolutivo de perda gradual e irreversível da função renal em resultado da destruição progressiva dos nefrónios (Porth 2010). A *National Kidney Foundation* classificou esta doença em 5 estádios de gravidade crescente. Genericamente, os estádios 1 e 2 são definidos com base no nível da taxa de filtração glomerular, estimada através dos valores de creatinina no sangue, em combinação com os dados laboratoriais relativos à albumina e eritrócitos na urina; os estádios 3 a 5 são definidos apenas com base na severidade da redução da taxa de filtração glomerular. Em resultado da diminuição da função tubular e da taxa de filtração glomerular ocorre o aumento de compostos azotados no sangue, como a ureia, a creatinina, o ácido úrico e o azoto, e o balanço eletrolítico e de fluidos não é mantido (Porth 2010). Em fases mais avançadas da doença, a acumulação de compostos tóxicos no sangue resulta na síndrome urémica, que afeta quase todos os sistemas do organismo. Especificamente, as consequências clínicas desta síndrome manifestam-se ao nível: (1) do sistema cardiovascular (hipertensão, aterosclerose, doença arterial coronária), (2) do sistema

hematológico (anemia, desordens hematológicas), (3) do sistema gastrointestinal (anorexia, náuseas, gastroparesia, parotidites, estomatites), (4) do sistema nervoso (problemas de memória e de concentração, astenia, confusão, dor de cabeça, polineurite, entre outros), (5) do sistema endócrino (deficiência do crescimento, esterilidade, infertilidade), (6) do sistema osteoarticular (hiperparatiroidismo secundário, osteomalacia), (7) da pele (ressecamento da pele, calcifilaxia), e (8) do sistema imunológico (diminuição das defesas) (Almeras e Argiles 2009).

O tratamento da IR crónica (estadio 5 da doença renal crónica) pode ser realizado com recurso a um transplante renal ou a duas modalidades dialíticas: a hemodiálise (HD) e a DP. No caso da IR aguda, esta também pode ser tratada por HD e DP (Porth 2010).

A HD é o procedimento mais comumente prescrito, sendo normalmente realizada em hospital ou centro extra-hospitalar, duas a três vezes por semana (3 a 4 h por sessão) (Briefel 2006). Na HD, o sangue é removido do paciente, através de um acesso venoso, e impulsionado por uma bomba até ao dialisador, localizado numa máquina externa. No dialisador, existe uma membrana semipermeável, através da qual ocorre a passagem de substâncias do sangue para uma solução de diálise que flui em contracorrente com o fluxo sanguíneo. Após a passagem no dialisador, o sangue é devolvido ao paciente através do acesso venoso (Jacobs e Opolinsky 2008).

A DP é uma modalidade dialítica realizada diariamente e requer a introdução de um cateter permanente na cavidade peritoneal de forma a permitir a entrada de uma solução de diálise para a cavidade e a drenagem da solução - designada de efluente - após o processo dialítico (Porth 2010). Na cavidade peritoneal, a passagem de substâncias dos capilares peritoneais para a solução de diálise ocorre através de uma membrana natural semipermeável que reveste a parede abdominal: o peritoneu (Gokal 2000).

Apesar de a DP ser menos usual no tratamento de doentes com IR crónica, vários autores (Heaf *et al.* 2002, Tokgoz 2009, Rodrigues 2010) têm chamado a atenção para várias vantagens da DP comparativamente com a HD, como por exemplo: (1) a simplicidade da técnica, sendo executada pelo próprio paciente em casa; (2) o aumento de qualidade de vida e autonomia do paciente; (3) a conservação dos acessos vasculares, que poderão vir a ser necessários no decurso do tratamento da IR crónica; (4) a maior preservação da função renal residual, quando efetuada como primeira modalidade de tratamento; e (5) a maior sobrevivência nos dois primeiros anos de tratamento. Apesar destas vantagens e de a HD e a DP serem modalidades igualmente eficientes, embora dependente do perfil clínico de cada paciente, a

utilização da DP é menor que a HD, e conseqüentemente a investigação em DP é reduzida. No entanto, a necessidade de otimização dos recursos humanos e financeiros e de oferta de melhor qualidade de vida aos pacientes antecipa um aumento da prescrição desta modalidade dialítica. Conseqüentemente, torna-se necessário o investimento na investigação básica com foco clínico (Krediet 2007, Burkart 2009).

1.1.1 Sistema de diálise peritoneal

Um ciclo de DP abrange três etapas distintas: (1) entrada da solução de diálise para a cavidade peritoneal, (2) permanência da solução de diálise na cavidade peritoneal, durante a qual se realiza a troca dos solutos, e (3) saída do efluente. Esta modalidade dialítica pode ser realizada através de dois procedimentos diferentes: a DP contínua ambulatoria (DPCA) e a DP automática (DPA). A DPCA (Figura 1- A) realiza-se durante o dia e requer a permanência da solução de diálise na cavidade peritoneal durante 4 a 8 h. No final deste período, o efluente é removido e a cavidade peritoneal é novamente preenchida com solução de diálise. Num dia, são realizadas entre três a cinco trocas de soluções (Gokal 2000). A DPA (Figura 1- B) é realizada à noite enquanto o paciente está a dormir.

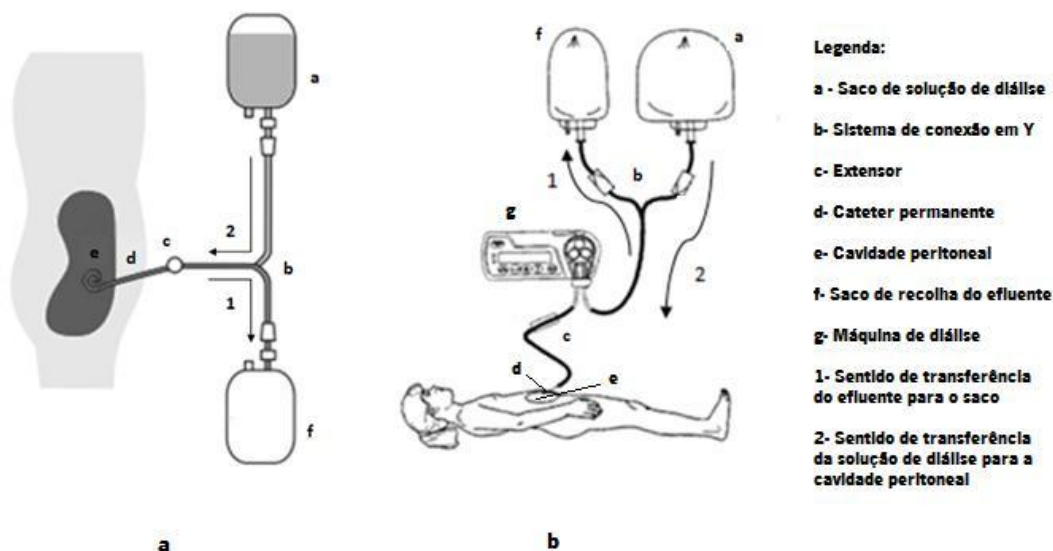


Figura 1- Diagrama representativo do sistema de **A)** DPCA (adaptado de Gokal 2000) e **B)** DPA [adaptado de <http://www.freepatentsonline.com/6558343.html> (acedido em 23-03-2012)].

Este procedimento tem uma duração média de 10 h, durante as quais são realizadas três a cinco trocas de soluções, e é suportado por uma máquina de diálise externa que efetua o preenchimento e o esvaziamento da cavidade peritoneal de forma automática. De manhã, a cavidade peritoneal é preenchida com solução de diálise (no caso da DPCA) ou deixada vazia (no caso da DPA) (Heimbürger e Blake 2006). Independentemente do procedimento, para as trocas de solução o extensor (Figura 1, *c*) ligado ao cateter (Figura 1, *d*) é conectado ao sistema Y descartável (Figura 1, *b*). Quando o extensor é desconectado do sistema em Y, o *clamp* situado na sua extremidade é fechado.

O cateter permanente de DP ideal deve permitir taxas de fluxo rápidas da solução de diálise/ efluente, sem dor ou vazamento e minimizar as infeções (Ash 1990, Gokal *et al.* 1998). Para tal, foram desenvolvidas diferentes configurações do cateter (Gokal *et al.* 1998). As principais diferenças entre os vários tipos de cateteres disponíveis consistem no número de *cuffs* (um ou dois), no desenho do trajeto subcutâneo (reto ou em forma de V) e da porção intraperitoneal (reto ou curvo) (Gokal *et al.* 1998). A grande maioria dos cateteres permanentes são de silicone e os *cuffs* de poliéster (Kathuria *et al.* 2009). Um dos cateteres permanentes mais usados na prática de DP é o cateter *Tenckhoff* curvo com duplo *cuff* (Johnson *et al.* 2006). Como se pode verificar na Figura 2, este cateter é constituído pelos seguintes elementos:

- segmento externo, localizado na parte externa do corpo e que conecta o cateter ao extensor;
- dois *cuffs*, que permitem a fixação do cateter na parede abdominal;
- segmento intraperitoneal, implantado na cavidade peritoneal e que contém uma extremidade enrolada e com furos laterais que facilitam o fluxo das soluções.

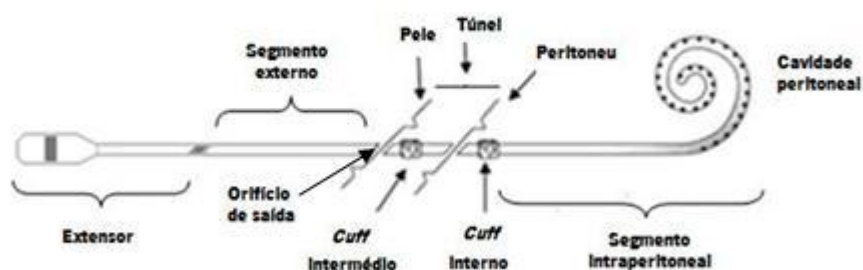


Figura 2 - Diagrama representativo de um cateter permanente *Tenckhoff* curvo com duplo *cuff* [adaptado de http://www.daviddarling.info/encyclopedia/R/renal_dialysis.html (acedido em 16-01-2012)].

1.1.2 Infecções associadas à diálise peritoneal

Apesar das vantagens da DP em relação à HD no tratamento de doentes com IR crónica, acima mencionadas, um dos principais problemas associados a esta modalidade dialítica é a elevada taxa de infeções. Os três tipos de infeções associadas à DP são a peritonite, a IOS e a infeção do túnel (IT). A título de exemplo, dados de um estudo prospetivo observacional (Luvira *et al.* 2011) revelaram que a incidência de peritonites, de IOS e de IT foi de 0,864, 0,213 e 0,034 episódios/paciente/ano, respetivamente. A falência da técnica, a hospitalização e, em casos mais graves, a morte do paciente representam os principais problemas associados às infeções em DP, caso estas não sejam devidamente tratadas (Li *et al.* 2010). Como tal, uma das principais preocupações da equipa clínica consiste na prevenção e no tratamento destas infeções.

1.1.2.1 Definições, sintomas e diagnóstico

A peritonite consiste na inflamação do peritoneu, em consequência de uma infeção. Na prática clínica, o diagnóstico deste tipo de infeção em pacientes em DP requer a combinação de pelo menos dois dos seguintes critérios: (1) sintomas de inflamação peritoneal, como dores abdominais, mal-estar, diarreia, náuseas, vômitos, calafrios, febre, problemas de drenagem e, em alguns casos, anorexia; (2) efluente turvo, com uma concentração de leucócitos no efluente superior a 100 células/ μL , sendo mais de 50% neutrófilos; (3) presença de microrganismos no efluente, demonstrada por análise microbiológica (Piraino *et al.* 2005). De notar que a turbidez do efluente está quase sempre presente em casos de peritonite, mesmo na ausência de dor abdominal, constituindo assim o principal indicador desta infeção (Gokal 2000, Fried e Piraino 2009). Para a classificação das peritonites, a *International Society for Peritoneal Dialysis* (ISPD) propôs a terminologia apresentada na Tabela 1 (Li *et al.* 2010).

Tabela 1 - Terminologia recomendada para as peritonites [adaptado de Li *et al.* (2010)]

Termo	Definição
Recorrente	Um episódio de peritonite que ocorre nas 4 semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, mas causado por um microrganismo diferente
Recidivante	Um episódio de peritonite que ocorre nas 4 semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, sendo causado pelo mesmo microrganismo ou por 1 episódio estéril
Repetitiva	Um episódio de peritonite que ocorre mais de 4 semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, sendo causado pelo mesmo microrganismo
Refratária	Um episódio de peritonite em que o efluente permanece turvo após 5 dias de tratamento com agentes antimicrobianos apropriados
- associada ao cateter	Um episódio de peritonite associado a infeção do orifício de saída ou do túnel, causado pelo mesmo microrganismo ou evidência de infeção em ambos os locais, apesar de um poder ser estéril

Na interface cateter-pele (Figura 2) podem ocorrer infeções que são, caracterizadas pela ocorrência de drenagem purulenta e que podem ser acompanhadas por eritema, endurecimento, dor e/ou formação de crosta (Twardowski e Prowant 1996). Com base na conjugação das diferentes características do orifício de saída, foi recomendada a classificação apresentada na Tabela 2 (Twardowski e Prowant 1996).

As IT induzem o endurecimento do tecido subcutâneo que envolve o cateter entre os dois *cuffs*, eritema, dor e sensibilidade, podendo ainda estar associadas a secreção purulenta ou de sangue. As IT ocorrem normalmente na presença de IOS (Li *et al.* 2010). Estas infeções são de difícil diagnóstico, podendo ser necessário recorrer a ultrassonografia, que em caso de infeção revela uma região hipoecóica (escura) em torno do cateter, resultante da diminuição da ecogenicidade (Vychytil *et al.* 1998, Fried e Piraino 2009).

Tabela 2 - Classificação recomendada para infeções do orifício de saída (adaptado de Twardowski e Prowant 1996)

Características	Classificação da IOS			
	Aguda	Crónica	Equívoca	Do cuff intermédio
Drenagem purulenta e/ou de sangue	Sim	Sim	Sim	Sim
Excesso de tecido de granulação	Sim	Sim	Não	Sim (no seio do orifício de saída)
Edema	Sim	Sim	Não	Não
Eritema	Sim; ≥ 13 mm	Sim	Sim; < 13 mm	Não
Dor	Sim	Sim	Não	Não
Sensibilidade	Sim	Sim	Não	Não
Crosta	Sim	Sim	Sim	Não
Duração da inflamação < 4 semanas	Sim	Não	-	-
Duração da inflamação > 4 semanas	Não	Sim	-	-
Drenagem de coágulos ou sangue seco	Não	Não	Não	Sim
Endurecimento do tecido em torno do cuff	-	-	-	Sim

IOS – Infeção do orifício de saída.

1.1.2.2 Vias de entrada dos microrganismos

Os microrganismos podem atingir o peritoneu através das vias transluminal, periluminal, transmural, hematogénica e transvaginal, podendo desta forma dar origem a infeções em pacientes em DP (Fried e Piraino 2009). A entrada de microrganismos externos pela via transluminal (Figura 3), isto é, ao longo do lúmen do cateter, representa a principal fonte de contaminação do peritoneu e ocorre, principalmente, durante as trocas de solução de diálise e através do toque no cateter (Fried e Piraino 2009). Por outro lado, os microrganismos podem migrar desde o orifício de saída até à cavidade peritoneal através da via periluminal (Figura 3), uma vez que o cateter permanente nunca forma uma união completamente selada com a pele e a parede abdominal, sendo esta a principal fonte de contaminação do orifício de saída e do túnel (Karahan *et al.* 2005, Chadha *et al.* 2010). A entrada de microrganismos através da via transmural (Figura 3), ou seja através da parede intestinal, representa a principal fonte de contaminação do peritoneu por microrganismos de origem entérica e pode resultar por exemplo

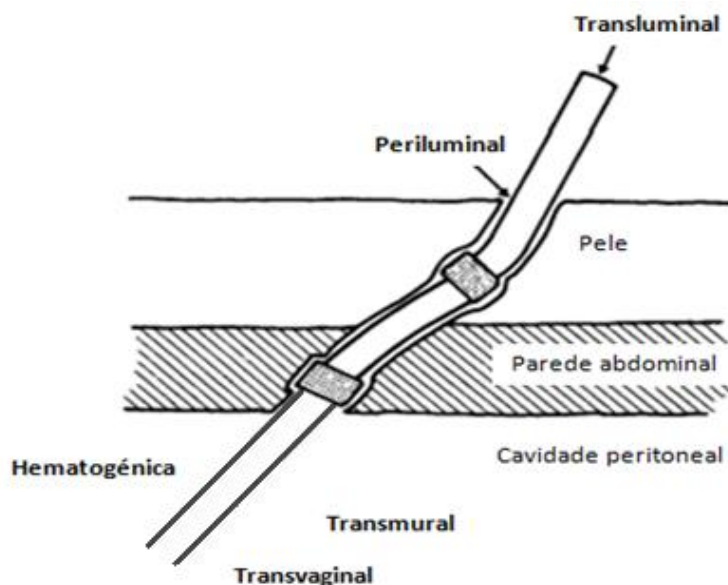


Figura 3 – Diagrama representativo das vias de entrada dos microrganismos para a cavidade peritoneal [adaptado de Spencer (1988)].

de perfuração intestinal, apendicite, colecistite gangrenosa, isquemia intestinal e doença diverticular do cólon (Li *et al.* 2010). Em casos mais raros, a entrada de microrganismos pode ocorrer pela via transvaginal (Figura 3), numa direção ascendente através dos órgãos sexuais internos, como resultado da realização de procedimentos ginecológicos ou do uso de dispositivos intrauterinos (Fried e Piraino 2009), ou pela via hematogénica (Figura 3), isto é, através da corrente sanguínea, estando em alguns casos associada a procedimentos invasivos e dentários (Fried e Piraino 2009).

1.1.2.3 Principais agentes patogénicos e terapêutica recomendada

Bactérias Gram-positivas

As bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas estão associadas a 30 - 45% das peritonites e a 5 - 14% das IOS (Luzar 1991, Vargemezis e Thodis 2001). De entre estas bactérias, a mais frequentemente isolada é a espécie *Staphylococcus epidermidis*, tendo sido no entanto identificadas outras bactérias, tais como *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. caprae*, *S. capitis* e *S. pasteurii* (Shin *et al.* 2011). Estas espécies pertencem à flora da pele e, como tal, as vias transluminal e periluminal (Figura 3) representam as suas principais vias de entrada (Li *et al.* 2010). As infeções causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativas são pouco severas e

facilmente tratadas com os agentes antimicrobianos comuns. De acordo com as recomendações da ISPD, o tratamento pode ser iniciado com vancomicina, de forma a incluir *Staphylococcus* resistentes à meticilina (terapia empírica). No entanto, outros agentes antimicrobianos, tais como as cefalosporinas de primeira geração, podem ser usados no tratamento das infeções (Li *et al.* 2010). Adicionalmente, as IOS raramente progridem para IT e para peritonite associada ao cateter, não sendo normalmente necessária a remoção do cateter (Ash 2004).

A bactéria *Staphylococcus aureus* é encontrada em 10 - 20% das peritonites, 25 - 85% das IOS e 35 - 65% das IT (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001). Estas infeções ocorrem principalmente em pacientes que têm ou já tiveram episódios de infeção associada ao cateter, sugerindo que esta espécie entra para a cavidade peritoneal pela via periluminal (Figura 3). Adicionalmente, a outra fonte de contaminação pode ocorrer pela via transluminal (Figura 3) (Li *et al.* 2010). Geralmente, as peritonites causadas por *S. aureus* são severas, sendo por vezes necessária a hospitalização do paciente. Com base no perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos agentes isolados, a ISPD recomenda para o tratamento de peritonites, a vancomicina, para os casos de estirpes resistentes à meticilina, teicoplanina ou rifampicina. Adicionalmente, para o tratamento de IOS e de IT é recomendado o uso de penicilina ou cefalexina, em combinação com a remoção do cateter, como forma de prevenir o agravamento da infeção e o dano permanente do peritoneu (Li *et al.* 2010).

As bactérias do género *Streptococcus*, tais como *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. salivarius* são responsáveis por 5 - 10% das peritonites (Vargemezis e Thodis 2001). A entrada destas bactérias para a cavidade peritoneal pode dar-se pela via transluminal (Figura 3), por contaminação do cateter com microrganismos da flora oral, ou pela via hematogénica (Figura 3) (Kiddy 1985, al-Wali *et al.* 1990). As infeções causadas por estes microrganismos tendem a ser mais severas comparativamente com as peritonites causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativas. Para o seu tratamento, a ISPD recomenda o uso de ampicilina (Li *et al.* 2010, Shukla *et al.* 2006).

Quanto às espécies do género *Enterococcus*, como as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium*, e do género *Corynebacterium*, estas estão associadas a uma percentagem inferior a 5% das peritonites (Vargemezis e Thodis 2001). Em relação às espécies de *Enterococcus*, a via transmural (Figura 3) constitui a principal via de acesso ao ambiente de DP (Edey *et al.* 2010, Yip *et al.* 2011); e as peritonites causadas por estas espécies tendem a ser severas. Para o seu tratamento, a ISPD recomenda o uso de ampicilina. No caso de se tratar de *Enterococcus* resistentes à vancomicina, é também recomendado o uso de linezolid ou de

quinupristina/dalfopristina (Li *et al.* 2010). Relativamente às espécies de *Corynebacterium*, estas espécies fazem parte da flora da pele, logo a via transluminal (Figura 3) parece representar a sua principal via de entrada; sendo as peritonites associadas a estas bactérias pouco severas. As estratégias de tratamento destas infeções ainda não se encontram definidas (Fried e Piraino 2009).

Bactérias Gram-negativas

As espécies da família *Enterobacteriaceae*, tais como as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são as principais bactérias Gram-negativas responsáveis pelas peritonites, estando associadas a 5 – 20% das peritonites, 7- 14% das IOS e aproximadamente 5% das IT (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001), sendo a via transmural a principal via de entrada destes microrganismos para a cavidade peritoneal (Figura 3) (Szeto e Chow 2007). No entanto, o acesso deste microrganismo também pode ocorrer pelas vias transluminal e periluminal (Figura 3), caso estas espécies estejam presentes na pele (von Graevenitz e Amsterdam 1992, Li *et al.* 2010). As infeções causadas por estas bactérias podem ser severas e, para o seu tratamento, a ISPD recomenda o uso de aminoglicosídeos, ceftazidima, cefepima ou carbapenema (Li *et al.* 2010).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por 3 – 8% das peritonites, 8 – 12% das IOS e aproximadamente 5% das IT (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001), sendo as vias transluminal e periluminal (Figura 3) as suas principais vias de entrada. As peritonites causadas por *P. aeruginosa* são severas e estão normalmente associadas ao cateter. Para o tratamento destas infeções, a ISPD recomenda a remoção do cateter em combinação com o uso de quinolonas ou de agentes antimicrobianos alternativos, tais como, ceftazidima, cefepima, tobramicina ou piperacilina (Li *et al.* 2010).

Micobactérias

As espécies de micobactérias, *Mycobacterium tuberculosis* e micobactérias não tuberculosas (*M. avium*, *M. abscessos*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*) são também responsáveis pelas infeções associadas à DP (Vargemezis e Thodis 2001), embora sejam menos frequentes, representando menos de 1% das peritonites, e em muitos casos difíceis de diagnosticar (Li *et al.* 2010). Em relação à *M. tuberculosis*, estas bactérias entram para a cavidade peritoneal pela via hematogénica (Figura 3). Para o tratamento das peritonites causadas por esta espécie, a ISPD

recomenda o uso de agentes antimicrobianos usados no tratamento da tuberculose (rifampicina, isoniazida, pirazinamida e ofloxacina) (Li *et al.* 2010). Relativamente às micobactérias não tuberculosas, a via periluminal (Figura 3) representa a sua principal via de entrada, estando frequentemente associadas a IOS e IT (Maeda *et al.* 2009). O tratamento das peritonites causadas por estas espécies é dificultado pela escassez de agentes antimicrobianos eficazes e pela resistência dos microrganismos às terapêuticas normalmente utilizadas (Akpolat 2009, Kleinpeter e Krane 2001). Como tal, a escolha dos agentes antimicrobianos e a duração da terapia ainda não estão definidas (Li *et al.* 2010). No entanto, Akpolat (2009) sugeriu a remoção do cateter em casos em que a infeção não é clinicamente resolvida.

Fungos

Os fungos são responsáveis por 3 – 8% das peritonites, 8 – 12% das IOS e aproximadamente 5% das IT (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001), sendo estas predominantemente causadas por espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*). Em menor número de casos, as infeções fúngicas também podem ser causadas por espécies dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Trichosporon*, *Acremonium*, *Rhodotorula* e *Cryptococcal*. As principais vias de entrada destes microrganismos para a cavidade peritoneal são a via transluminal, periluminal, transmural e transvaginal (Figura 3) (Vargemezis e Thodis 2001). Comparativamente com as peritonites bacterianas, as peritonites fúngicas são menos frequentes, mas estão associadas a altas taxas de morbilidade e de mortalidade, uma vez que são mais difíceis de se tratar, sendo por vezes necessário internamento hospitalar mais prolongado. A ISPD recomenda para o tratamento destas peritonites a remoção imediata do cateter aquando do diagnóstico e o uso de anfotericina B, equinocandinas, fluconazol, posaconazol ou voriconazol em combinação com flucitosina (Li *et al.* 2010). No entanto, até à data ainda não está definido um protocolo para o tratamento das IOS e das IT causadas por fungos (Li *et al.* 2010).

Consórcio de microrganismos

A combinação de microrganismos de espécies diferentes (bactérias e fungos) está na origem de infeções polimicrobianas. Estas representam menos de 25% dos episódios de peritonite e 16 - 35% dos episódios de IOS (Vargemezis e Thodis 2001, Luzar 1991). Para o tratamento das infeções polimicrobianas é recomendado o uso de agentes antimicrobianos, tais como metronidazole em conjugação com ampicilina, ceftazidima ou aminoglicosídeos e, eventualmente a remoção do cateter (Li *et al.* 2010).

Em conclusão, o prognóstico das infeções em pacientes em DP é fortemente influenciado pelo agente patogénico e pelos seus fatores de patogenicidade (Barretti *et al.* 2009). Entre esses fatores está a adesão microbiana às superfícies do cateter e tecidos circundantes e a consequente formação de biofilme microbiano (Troidle e Finkelstein 2006). Os biofilmes conferem aos microrganismos proteção contra as defesas do paciente e agentes antimicrobianos, podendo desta forma estar associados ao desenvolvimento de peritonites recorrentes, recidivantes e repetitivas (Barretti *et al.* 2009, von Graevenitz e Amsterdam 1992).

1.2 Biofilmes microbianos

1.2.1 Definição e estrutura do biofilme

Os biofilmes microbianos têm sido matéria de estudo ao longo dos últimos anos. Donlan e Costerton (2002) definiram biofilme como uma comunidade microbiana séssil caracterizada pela adesão irreversível de microrganismos a uma superfície (biológica ou não-biológica), a uma interface ou a outros microrganismos (por agregação) e incorporada numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). AS SPE consistem em proteínas, polissacarídeos, lípidos e ácidos nucleicos, que representam 50 a 90% da matéria orgânica dos biofilmes, produzidas pelos próprios microrganismos. A matriz corresponde a aproximadamente 85% do volume de um biofilme, sendo essencialmente constituída por água (97%) (Karatan e Watnick 2009, Donlan e Costerton 2002).

Relativamente à sua estrutura, os biofilmes formados *in vitro* podem apresentar a forma de “torre” ou de “cogumelo” e a sua morfologia pode ser lisa, rugosa, plana ou filamentosa. O interior dos biofilme pode apresentar canais de água através dos quais são transportados

nutrientes, oxigénio e produtos resultantes do metabolismo celular, criando-se gradientes de concentração destes componentes (Hall-Stoodley *et al.* 2004).

1.2.2 Formação do biofilme

A formação do biofilme numa superfície em contacto com um meio aquoso inclui diferentes etapas (Figura 4). Na primeira fase ocorre a formação do filme condicionador (Figura 4 – I), resultante da adsorção de moléculas orgânicas e inorgânicas provenientes do meio aquoso (Mahami e Adu-Gyamfi 2011, Donlan 2002). Os microrganismos presentes no meio aquoso são transportados para a superfície condicionada por combinação de mecanismos de transporte, tais como difusão, convecção, sedimentação ou motilidade (Bryers 2008). Quando próximos da superfície, os microrganismos podem aderir (Figura 4 – II), em resultado de forças de atração e de repulsão, como por exemplo, forças hidrofóbicas, electrostáticas e de Van der Waals, geradas entre a parede celular e as moléculas constituintes do filme condicionador (Dunne 2002). Como se trata de uma adesão reversível, os microrganismos podem desprender-se da superfície facilmente, regressando à suspensão- fase planctónica (Marcus *et al.* 2008). A produção de SPE e a presença de recetores específicos localizados na parede celular e em estruturas celulares externas, tais como *flagela* e *pili* de algumas espécies bacterianas,

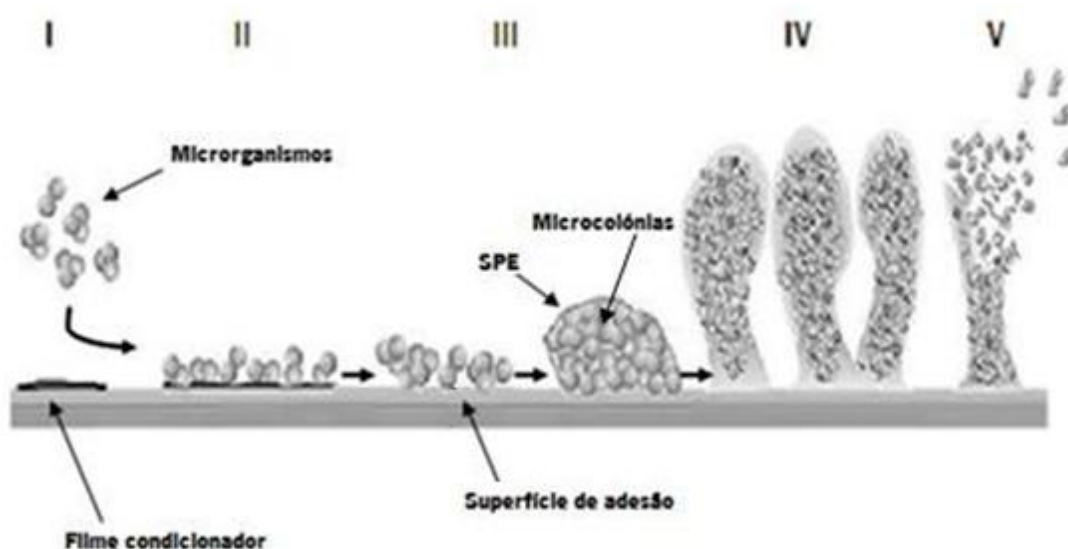


Figura 4 - Fases da formação de um biofilme numa superfície [adaptado de <http://www.bioscience.org/2004/v9/af/1295/figures.htm> (acedido em 30-01-2012)].

desempenham um papel fundamental na consolidação da adesão dos microrganismos à superfície, garantido o caráter irreversível da adesão (Figura 4 – III) (Karatan e Watnick 2009). De acordo com Flemming e Wingender (2010), para além da adesão, as SPE desempenham outras funções, tais como: (1) imobilização das células, mantendo-as próximas umas das outras (agregação celular); (2) manutenção da integridade estrutural do biofilme; (3) comunicação intercelular; (4) captação de nutrientes e de iões inorgânicos; (5) fornecimento de carbono, nitrogénio e fósforo para os microrganismos do biofilme; (6) armazenamento de carbono em excesso; (7) digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutrientes; (8) proteção dos microrganismos da dessecação, da oxidação, de alguns protozoários, das defesas imunitárias do organismo e dos agentes antimicrobianos.

Após a adesão irreversível, os microrganismos desenvolvem-se, originando microcolónias. Após a formação de microcolónias, inicia-se a maturação do biofilme (Figura 4 - IV). Nesta fase, a densidade celular e a complexidade do biofilme aumentam (Mahami e Adu-Gyamfi 2011). As células microbianas que se situam nas camadas superiores têm maior facilidade de acesso a nutrientes e oxigénio do que as células que se situam nas camadas mais próximas da superfície, podendo estas entrar num estado dormente (*células persisters*) (Fong 2008, Stewart e Franklin 2008). Portanto, o desenvolvimento do biofilme está dependente de vários fatores, tais como a quantidade de nutrientes disponível, a difusão de oxigénio, a presença de produtos tóxicos e o pH do meio.

A última fase de formação do biofilme é designada de destacamento (Figura 4 – V). Nesta fase os microrganismos desprendem-se do biofilme de forma individual ou em aglomerados celulares, que passam a estar disponíveis para colonizar outras superfícies, podendo causar infeção sistémica. Em geral, o destacamento pode ser induzido por mecanismos ativos e passivos (Kaplan 2010). Os mecanismos ativos são mediados pelas próprias células e incluem por exemplo a cessação da produção de componentes necessários para a manutenção da estrutura do biofilme, tais como as SPE, e a produção de enzimas extracelulares que degradam a matriz, por despolimerização de polissacarídeos (Otto 2008, Kaplan *et al.* 2004). A título de exemplo, Kaplan *et al.* (2004) mostraram que a enzima N-acetilglucosaminidase, denominada dispersina B, pode induzir o destacamento em biofilmes de *S. epidermidis*, por despolimerização do polissacárido N-acetoglicosamina. Por outro lado, o destacamento passivo é mediado por forças externas, por processos de abrasão (deslocamento devido à colisão de partículas em suspensão com o biofilme), de erosão (remoção contínua de pequenas porções do

biofilme como resultado das alterações de fluxo da fase aquosa) e de *sloughing off* (remoção rápida e maciça de porções de biofilme resultante da depleção de nutrientes e de oxigênio dentro da sua estrutura) (Brading *et al.* 1995).

1.2.3 Tolerância dos biofilmes a agentes antimicrobianos

A natureza do biofilme confere às suas populações microbianas uma tolerância inerente a agentes antimicrobianos. A realização de testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que os microrganismos em biofilme podem ser até 1000 vezes mais tolerantes a esses agentes, comparativamente com os microrganismos planctônicos (Smith e Hunter 2008, Parsek e Singh 2003). Apesar de os fatores envolvidos no aumento da tolerância dos biofilmes aos agentes antimicrobianos não serem totalmente compreendidos, têm sido propostos vários mecanismos, tais como: (1) a penetração lenta ou incompleta das moléculas de alguns agentes antimicrobianos, em resultado do efeito barreira e neutralizante das SPE; (2) a alteração do ambiente (diminuição do pH, diminuição da pO_2 e aumento da pCO_2) dentro do biofilme; (3) a presença de enzimas na matriz celular que inativam os agentes antimicrobianos; (4) a existência de subpopulações com fenótipo resistente, nomeadamente as *persisters*; (5) a expressão de genes de resistência específicos, como por exemplo, genes associados a bombas de efluxo, permitindo o bombeamento de agentes antimicrobianos para fora das células; e (6) a transferência horizontal de genes de resistência aos agentes antimicrobianos, que é facilitada dentro do biofilme (Davies 2003, Hall-Stoodley *et al.* 2004, del Pozo e Patel 2007).

O conhecimento dos fatores responsáveis pelo aumento da tolerância dos microrganismos em biofilme é a chave para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento de infeções associadas a biofilmes. No entanto, atualmente as terapias existentes para o tratamento das infeções não estão direcionadas para o biofilme (del Pozo e Patel 2007).

1.3 Biofilmes microbianos em diálise peritoneal

1.3.1 Metodologias de análise do biofilme de cateteres

1.3.1.1 Métodos microscópicos

Para a análise dos biofilmes formados em cateteres removidos de pacientes em DP e dos microrganismos que os compõem, vários autores têm recorrido à microscopia eletrónica. A Microscopia Eletrónica de Varrimento (MEV) foi o método maioritariamente utilizado, tendo permitido analisar a superfície dos cateteres e as características dos microrganismos aderidos (Marrie *et al.* 1983, Gorman *et al.* 1994, Gorman *et al.* 1993, Verger *et al.* 1987, Dasgupta *et al.* 1987, Dasgupta *et al.* 1986, Bayston *et al.* 1999, Guerra e Silva *et al.* 2011). Em combinação com a MEV, alguns autores recorreram à Microscopia Eletrónica de Transmissão (MET) para a observação de estruturas citoplasmáticas e da parede celular dos microrganismos recuperados diretamente dos cateteres (Marrie *et al.* 1983, Gorman *et al.* 1994, Dasgupta *et al.* 1987, Dasgupta *et al.* 1986). Alguns autores recorreram também à Microscopia Eletrónica de Varrimento a Laser (MCVL) para visualização da estrutura dos biofilmes e dos seus componentes (Gorman *et al.* 1994), para a análise da superfície dos cateteres (Gorman *et al.* 1993), para a análise da distribuição dos microrganismos e para a determinação da sua viabilidade através do uso de corantes específicos de viabilidade celular (Pihl *et al.* 2012).

1.3.1.2 Métodos de recuperação de microrganismos do biofilme

Nos estudos que avaliaram a composição microbiológica dos biofilmes, a raspagem foi o método de recuperação de microrganismos maioritariamente utilizado nos segmentos intraperitoneais dos cateteres de DP (Tabela 3). Especificamente, o biofilme é removido utilizando um bisturi, seguindo-se a sua ressuspensão numa solução estéril e desagregação com recurso ao vortex e à sonicação (Dasgupta *et al.* 1986, Dasgupta *et al.* 1987, Gorman *et al.* 1993, Gorman *et al.* 1994). A suspensão é então inoculada em meios de cultura com agar e incubada em condições aeróbias. No caso dos *cuffs* (Tabela 3), a recuperação de microrganismos é efetuada por *rolling* do segmento em meio de cultura com agar, tendo por base a metodologia descrita por Maki *et al.* (1977), procedendo-se de seguida à incubação em condições aeróbias (Marrie *et al.* 1983, Bayston *et al.* 1999). Pontualmente foram usadas outras metodologias para análise microbiológica dos cateteres de DP (Tabela 3). De notar que, de todos

os estudos mencionados (Tabela 3), somente o realizado por Verger *et al.* (1987) incluiu controlos de recuperação de biofilme *in vitro* para validação da metodologia utilizada.

Tabela 3 - Resultados da recuperação e da identificação microbiana realizados em cateteres removidos de pacientes em DP

Causas de remoção (nº de amostras)	Elementos analisados	Método de recuperação microbiana	Nº de amostras positivas/total	Microrganismos identificados	Referência
IOS (3) Peritonite (4) IOS + Peritonite (1) Ausência de infecção ¹ (2)	Cuff e segmento ip ²	Rolling	9/10	(Cuff) <i>S. aureus</i> e <i>Alcaligenes xylosoxidans</i> (Segmento ip) <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>A. xylosoxidans</i> e <i>C. albicans</i>	Marrie <i>et al.</i> (1983)
IOS (4) Peritonite (6) IOS+ Peritonite (5) Ausência de infecção ¹ (5)	Segmentos externo e ip ^{2,3}	Raspagem	15/20	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i>	Dasgupta <i>et al.</i> (1986)
Peritonite (13) Ausência de infecção ¹ (12)	Segmentos externo e ip ^{2,3}	Raspagem	20/25	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Pseudomonas</i> e <i>Streptococcus</i>	Dasgupta <i>et al.</i> (1987)
Peritonite (7) Ausência de infecção ¹ (10)	Extensor e segmentos externo e ip ³	(Extensor) Passagem da zaragatoa (Segmento externo) Raspagem (Segmento ip) Escovagem e aspiração	0/17	–	Verger <i>et al.</i> (1987)
Peritonite (n.d.) Ausência de infecção ¹ (n.d.)	Segmento ip ³	Raspagem	6/6	<i>S. epidermidis</i>	Gorman <i>et al.</i> (1993)

¹ cateter removido por outras causas: transplante renal, mudança de modalidade dialítica, obstrução do cateter e/ou perfuração intestinal; ² extraluminal; ³ intraluminal; ip – intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

Tabela 3 - Resultados da recuperação e da identificação microbiana realizados em cateteres removidos de pacientes em DP (continuação)

Causas de remoção (nº de amostras)	Secções analisadas	Metodologia de recuperação	Nº de amostras positivas/total	Microrganismos detetados	Referência
Peritonite (4) Ausência de infeção ¹ (28)	Segmento ip ³	Raspagem	26/32	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas, <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>E. faecalis</i> e <i>E. cloacea</i>	Gorman <i>et al.</i> (1994)
IOS (11) Peritonite (7) IOS + Peritonite (8) Ausência de infeção ¹ (19)	<i>Cuff</i> interno segmentos externo e ip ³	(<i>Cuff</i>) <i>Rolling</i> (Segmentos) Aspiração	27/45	(<i>Cuff</i>) <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. striatum</i> , <i>Aspergillus niger</i> e <i>C. albicans</i> (Segmentos externo e ip) <i>S. aureus</i> , <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> , <i>C. striatum</i> ., <i>Streptococcus</i> viridans, <i>C. albicans</i>	Bayston <i>et al.</i> (1999)
IOS (29) Peritonite (36) Ausência de infeção ¹ (22)	<i>Cuffs</i> interno e intermédio e a extremidade do cateter	Incubação	n.d./ 87	<i>S. aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas, <i>Streptococcus</i> spp., bactérias Gram-negativas (n.d.), <i>Candida</i> spp.	Rodríguez- Carmona <i>et al.</i> (2000)
IOS + Peritonite (2) Ausência de infeção ¹ (15)	Segmentos externo e ip	Incubação	11/17	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas, <i>Micrococcus</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Rothia mucilaginosa</i>	Pihl <i>et al.</i> (2012)

¹ cateter removido por outras causas: transplante renal, mudança de modalidade dialítica, obstrução do cateter e/ou perfuração intestinal; ² extraluminal; ³ intraluminal; ip – intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

1.3.1.3 Métodos de identificação dos microrganismos recuperados

Os isolados obtidos dos cateteres (Tabela 3) foram identificados com recurso a métodos de identificação convencionais baseados nas características fenotípicas das colónias, tais como tamanho, cor, forma, elevação, margem, aspeto da superfície, transparência e tipo de reação hemolítica (no caso das colónias crescidas em meio agar sangue); em reações bioquímicas, como por exemplo, os testes da catalase, da oxidase, teste *Analytical Profile Index* – API - e meios de cultura seletivos e diferenciais (Marrie *et al.* 1983, Dasgupta *et al.* 1986, Dasgupta *et al.* 1987, Gorman *et al.* 1993, Gorman *et al.* 1994, Bayston *et al.* 1999, Pihl *et al.* 2012). Contudo, a identificação com base nestes métodos geralmente demora um ou mais dias. Além disso, são testes caros e, por vezes, os resultados podem ser difíceis de interpretar ou inconclusivos (Croxatto *et al.* 2011).

Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos de biologia molecular para a identificação dos microrganismos tendo por base a informação primária contida no DNA e no RNA, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e as suas variantes, tais como *Inverse* PCR, *Multiplex* PCR, *Nested* PCR, *Real-Time* PCR; a sequenciação; a hibridação com sondas; ou a análise de perfis de restrição. Dos estudos efetuados nos cateteres de DP (Tabela 3), apenas um (Pihl *et al.* 2012) utilizou métodos moleculares (sequenciação do gene 16S rRNA) para a identificação definitiva dos microrganismos, após a avaliação dos diferentes tipos de colónias através de métodos convencionais anteriormente mencionados. Apesar de os métodos moleculares permitirem a identificação mais célere de microrganismos, comparativamente com os métodos convencionais, a sua realização exige uma equipa altamente especializada e o uso de equipamentos mais caros (Pfaller 2001).

Anhalt e Fenselau *et al.* (1975) propuseram pela primeira vez a identificação microbiana com base em perfis de proteínas ribossomais obtidos por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Sumariamente, este método recorre à ionização e à vaporização de moléculas da amostra, por bombardeamento de fotões. As moléculas ionizadas são aceleradas e separadas de acordo com a massa/carga, até chegarem ao detetor, onde são detetadas e o seu tempo de deslocamento é registado. Num processador de dados são gerados espectros de massa únicos para cada espécie, que são comparados com espectros de espécies conhecidas, possibilitando a identificação dos microrganismos (Carbonnelle *et al.* 2011, Croxatto *et al.* 2011). Por exemplo, Seng *et al.* (2009) e van Veen *et al.* (2010) descreveram a aplicação de MALDI-TOF MS em microbiologia clínica,

tendo identificando 1660 e 980 isolados clínicos, respetivamente. Estes estudos mostraram excelentes resultados, tendo sido identificados mais de 95,4% dos isolados (mais de 84,1% a nível da espécie e de 5% a nível do género). A maior parte dos grupos de bactérias, incluindo *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* hemolítico e bactérias Gram-negativas não fermentadoras, foram corretamente identificados a nível da espécie. No entanto, foram descritas dificuldades na identificação ao nível da espécie de *Streptococcus* e bactérias anaeróbias. Adicionalmente, a ausência e a incorreta identificação dos restantes isolados foram atribuídas sobretudo à ausência de espetros de estirpes de referência adequados na base de dados (Seng *et al.* 2009, van Veen *et al.* 2010). A viabilidade da utilização de MALDI-TOF MS também foi demonstrada para identificação de fungos, tendo Marklein *et al.* (2009) e Stevenson *et al.* (2010) identificado mais de 92,5% de espécies de leveduras, entre elas *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces spp.*; Hettick *et al.* (2008a, 2008b) identificado 100% de 12 espécies de *Aspergillus* e de *Penicillium*; e Marinach-Patrice *et al.* (2009) identificado 92% de 5 espécies de *Fusarium*.

Uma das principais vantagens da aplicação da MALDI-TOF MS consiste na utilização de células intactas, não sendo normalmente necessário um pré-tratamento da amostra, uma vez que a presença de água e de solventes orgânicos na matriz promove a lise celular (Croxatto *et al.* 2011, Holland *et al.* 1996). Contudo, alguns estudos demonstraram fragilidades do método quando aplicado diretamente em amostras de sangue, nomeadamente no que diz respeito à identificação de *S. viridans* e das espécies bacterianas de culturas polimicrobianas (La Scola e Raoult 2009, Szabados *et al.* 2011). Apesar destas dificuldades, este método tem ganho cada vez mais aceitação a nível da identificação microbiana clínica graças à sua capacidade de identificar uma grande variedade de microrganismos num curto espaço de tempo, com custos inferiores e maior facilidade de execução, comparativamente com os métodos convencionais e moleculares (Giebel *et al.* 2010, Croxatto *et al.* 2011, Carbonnelle *et al.* 2011). No entanto, até à data esta metodologia não foi ainda aplicada na identificação de microrganismos recuperados de cateteres de DP.

1.3.2 Evidência do biofilme associado ao cateter de diálise peritoneal

Com recurso à microscopia eletrónica, as análises efetuadas em cateteres não implantados (Gorman *et al.* 1993, Guerra e Silva *et al.* 2011) permitiram mostrar que a sua superfície apresenta rugosidades e poros. Estas características da superfície podem representar

locais de proteção dos microrganismos contra forças de cisalhamento exercidas durante as trocas de soluções (Gorman *et al.* 1993, Guerra e Silva *et al.* 2011).

No entanto, após a implantação do cateter, as características da superfície são alteradas. Os estudos de Flessner *et al.* (2010) e de Peters *et al.* (2011) mostraram a presença de células inflamatórias (macrófagos, células mesoteliais, células T, fibroblastos e células dendríticas) aderidas à superfície do material de silicone implantado na cavidade peritoneal de ratinhos. Estes resultados sugerem que a implantação do cateter na cavidade peritoneal resulta numa resposta inflamatória, mesmo antes do início do processo dialítico. Adicionalmente, após a implantação ocorre a deposição instantânea de proteínas sobre a superfície do cateter (Pihl 2011), possivelmente derivadas do fluido peritoneal (fluido de lubrificação da cavidade peritoneal). As observações efetuadas por Guerra e Silva *et al.* (2011) e por Pihl *et al.* (2012) a cateteres removidos de pacientes em DP sugerem que, após o início do processo dialítico, as proteínas derivadas do efluente também contribuem para o revestimento da superfície do cateter. De acordo com alguns estudos *in vitro* (Gorman *et al.* 1997, Yanagisawa *et al.* 2004), o filme condicionador parece ter influência na adesão de microrganismos à superfície do cateter e consequentemente na formação do biofilme microbiano.

Adicionalmente, os resultados das análises dos cateteres removidos de pacientes em DP sugerem que os biofilmes presentes nos cateteres não são homogêneos ao longo da superfície e que estes se podem formar nos diferentes elementos e em ambas as superfícies - extra e intraluminal (Marrie *et al.* 1983, Gorman *et al.* 1994, Dasgupta *et al.* 1987, Dasgupta *et al.* 1986). Em relação à morfologia e à espessura dos biofilmes, as observações revelaram que estas podem variar de amostra para amostra (Guerra e Silva *et al.* 2011). Adicionalmente, comparando a extensão de superfície coberta por biofilme em cateteres removidos de pacientes com e sem infeção, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas (Dasgupta *et al.* 1986, Dasgupta *et al.* 1987, Pihl *et al.* 2012). Por outro lado, Verger *et al.* (1987) e Pihl *et al.* (2012), através de MEV e MCVL, respetivamente, verificaram a presença de microrganismos aderidos à superfície de cateteres com cultura microbiológica negativa. Estes resultados sugerem a existência de espécies não cultiváveis ou não viáveis aderidas ao cateter e, portanto as análises microbiológica e microscópica são complementares.

1.3.3 Composição microbiológica do biofilme associado ao cateter de diálise peritoneal

Em paralelo com a análise microscópica, alguns autores investigaram a componente microbiológica dos cateteres de DP (Tabela 3).

Estes estudos (nove na totalidade) (Tabela 3) demonstraram a presença de microrganismos em 0% (Verger *et al.* 1987) a 100% (Gorman *et al.* 1993) dos cateteres de DP (removidos de pacientes com e sem sinais clínicos de infeção). Apesar de se terem observado maioritariamente culturas mono-microbianas, foram identificadas populações polimicrobianas, isto é, culturas constituídas por duas ou mais espécies microbianas (Brogden 2002), em 6,8% (Dasgupta *et al.* 1986), 22% (Gorman *et al.* 1994) e 36% (Pihl *et al.* 2012) dos cateteres analisados.

Como evidenciado na Tabela 3, as bactérias Gram-positivas foram o grupo de microrganismos predominantemente detetado, seguindo-se as bactérias Gram-negativas e, por fim, os fungos. Das análises efetuadas aos cateteres, as principais espécies bacterianas isoladas foram *S. epidermidis*, em 10% (Marrie *et al.* 1983) a 100% das amostras (Gorman *et al.* 1993) e *S. aureus*, em 6% (Pihl *et al.* 2012) a 25% das amostras (Dasgupta *et al.* 1986). Outras bactérias Gram-positivas foram isoladas, como por exemplo, espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas (*S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophytus*, *S. simulans* e *S. warneri*) e de *Streptococcus* em cateteres removidos de pacientes com e sem sinais clínicos de infeção, e espécies de *Corynebacterium* e *E. faecalis* em cateteres removidos de pacientes sem sinais clínicos infeção. Em relação às bactérias Gram-negativas, os principais microrganismos isolados foram espécies de *Pseudomonas*, em 4% (Dasgupta *et al.* 1987) a 7% das amostras (Bayston *et al.* 1999) e espécies da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente dos géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia*, em 5% (Dasgupta *et al.* 1986) a 10% das amostras (Marrie *et al.* 1983). No entanto, outras bactérias Gram-negativas como por exemplo *Alcaligenes xylosoxidans* e *Proteus mirabilis*, foram recuperadas de segmentos de cateteres, mas apenas dos removidos de pacientes com infeção. Em relação aos fungos, como se pode constatar na Tabela 3, as espécies isoladas foram *C. albicans*, em 2% (Bayston *et al.* 1999) a 10% das amostras (Marrie *et al.* 1983) e *Aspergillus niger* em 2% das amostras (Bayston *et al.* 1999), tendo sido isolados tanto de cateteres removidos de pacientes com e sem sinais clínicos infeção.

Nos estudos em que foi efetuada a análise aos *cuffs* dos cateteres (Tabela 3), as espécies maioritariamente isoladas foram *S. aureus*, em 10% (Marrie *et al.* 1983) e 24% das

amostras (Bayston *et al.* 1999) e *P. aeruginosa*, em 9% das amostras (Bayston *et al.* 1999), todas de cateteres removidos de pacientes com infecção.

1.3.4 Relação entre biofilme associado ao cateter e as infecções em diálise peritoneal

Os estudos realizados (Tabela 3) mostram que não é possível estabelecer uma relação entre a presença do biofilme nos cateteres e a infecção (peritonite e/ou IOS), uma vez que o biofilme é observado em pacientes com e sem infecção e nem sempre foi observado biofilme em cateteres removidos por infecção. No entanto, é de notar que estes mesmos estudos comportam falhas que podem representar um entrave na determinação desta associação. A saber, (1) o número de estudos é limitado, assim como o número de amostras analisadas; (2) as populações em estudo são heterogêneas relativamente ao período de permanência em DP, ao tipo de infecção manifestada (peritonite e IOS) e às taxas de infecção; e (3) a caracterização detalhada da população é escassa, não incluindo dados tais como o protocolo de prevenção de infecção adotado, o tipo de solução de diálise utilizada e a descrição detalhada da terapia com agentes antimicrobianos (agente, dose, frequência, duração) (Dasgupta 2002, Li *et al.* 2010). Devido a estas limitações, é necessário realizar estudos mais aprofundados para determinar as causas das infecções associadas à DP.

1.3.5 Estratégias de prevenção da formação de biofilmes em cateteres de diálise peritoneal

Para o uso da DP foram desenvolvidas recomendações técnicas no sentido de prevenir infecções. Estas incluem, por exemplo, técnicas de implantação e de manuseamento dos componentes do sistema de diálise, o treino do paciente e os cuidados do orifício de saída (Dasgupta 2002, Li *et al.* 2010, Brum *et al.* 2010). No entanto, estas recomendações não surgiram especificamente para prevenir a formação de biofilme.

Contudo, têm sido efetuados alguns estudos no sentido de desenvolver estratégias de prevenção da formação de biofilme em cateteres de DP e que se debruçam sobretudo na modificação do cateter, testando as suas superfícies com revestimentos que visam reduzir a adesão microbiana.

Um dos revestimentos estudado é a prata. Kubey *et al.* (1995) mostraram que segmentos externos de cateteres revestidos com prata retêm atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. aureus*, limitando a formação de biofilme por um período de aproximadamente 10 meses. Adicionalmente, Dasgupta (1994) usando um modelo animal verificou que o revestimento com prata reduz significativamente a colonização por *S. aureus*, comparativamente com os cateteres não modificados, após 6 dias de diálise. Por outro lado, num estudo *in vivo* Fung *et al.* (1996) mostraram que o revestimento de prata apresenta características de biocompatibilidade aceitáveis. Porém, apesar de estes estudos sugerirem a capacidade da prata em prevenir a formação do biofilme, num estudo em pacientes em DP realizado por Crabtree *et al.* (2003) foi mostrado que o revestimento do cateter com prata não reduz as infecções associadas DP, em comparação com cateteres não modificados.

Outros dos revestimentos são os agentes antimicrobianos. Finelli *et al.* (2002) num estudo *in vivo*, verificaram uma redução na formação de biofilme de *P. aeruginosa* em cupões de silicone revestidos com hidrogel de ciprofloxacina lipossomal introduzidos na cavidade peritoneal de ratinhos *vs.* cupões de silicone não revestidos, por um período de 7 dias. Por outro lado, em testes realizados *in vitro*, Kim *et al.* (2002) mostraram que os segmentos de cateteres de DP revestidos com uma combinação de clorexidina/triclosano inibem o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *C. albicans* por mais de 5 dias e de *P. aeruginosa* por 1 dia, em comparação com cateteres não revestidos. Adicionalmente, cuffs revestidos com uma combinação de clorexidina/triclosano/sulfadiazina de prata inibiram o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis* por mais de 10 dias e o de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* por mais de 5 dias. No mesmo estudo, foram efetuados testes *in vivo* usando cateteres implantados em ratos contaminados pela via periluminal com *S. aureus*. Os resultados mostraram que, ao fim de 7 dias, nenhum dos cateteres revestidos apresentaram a superfície intraluminal colonizada, ao contrário do que se verificou nos cateteres não revestidos. Por outro lado, Bayston *et al.* (2009) mostraram num estudo *in vitro* que cateteres de DP revestidos com uma combinação de rifampicina/trimetropim/triclosano exibem atividade antimicrobiana por mais de 280 dias, reduzindo em 99% a viabilidade das bactérias *S. epidermidis*, *S. aureus* suscetível à meticilina, *S. aureus* resistente à meticilina e *E. coli*, comparativamente com os cateteres não modificados. Adicionalmente, através de testes de toxicidade realizados em ratos (Kim *et al.* 2002) e ratinhos (Bayston *et al.* 2009) foi observado que os respetivos revestimentos antimicrobianos não agravam a resposta inflamatória do peritoneu. Portanto, os resultados destes estudos (Finelli *et*

al. 2002, Kim *et al.* 2002, Bayston *et al.* 2009) sugerem a aplicabilidade promissora do revestimento de cateteres com agentes antimicrobianos na prevenção da formação do biofilme. A fase seguinte será testar a formação de biofilme em cateteres com agentes antimicrobianos em humanos.

1.4 Objetivos

O principal objetivo do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação consistiu na avaliação dos biofilmes microbianos em cateteres de DP removidos de pacientes do Serviço de Nefrologia, do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António e do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia. Os objetivos específicos incluíram: (1) a validação de metodologias de recuperação de microrganismos, (2) o isolamento e a (semi-) quantificação dos microrganismos envolvidos nas infeções associadas à DP (peritonites e IOS), (3) o isolamento e a semi-quantificação de microrganismos associados a extensores e cateteres permanentes de DP, e (4) a identificação dos microrganismos.

2 Materiais e Métodos

2.1 Meios de cultura e soluções

2.1.1 *Tryptic Soy Broth*

O *Tryptic Soy Broth* (TSB) é um meio nutritivo usado como suporte de crescimento de uma grande variedade de microrganismos como bactérias aeróbias, anaeróbias e anaeróbias facultativas (Diedrich 2007). Adicionalmente, quando enriquecido com sangue (TSB sangue), este meio permite também o crescimento de microrganismos fastidiosos.

Neste trabalho, o TSB (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 30 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min. O TSB sangue foi preparado a partir de TSB esterilizado ao qual foi adicionado 7% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro (Probiologica) em condições asséticas. O TSB glucose foi preparado a partir de TSB esterilizado ao qual foi adicionado glucose (Applichem) a uma concentração final de 0,25% (v/v) em condições asséticas. O TSB glicerol foi preparado a partir de TSB esterilizado suplementado com 15% (v/v) de glicerol (Sigma). O meio não suplementado foi armazenado à temperatura ambiente e os restantes preparados antes de cada utilização.

2.1.2 *Tryptic Soy Agar*

O *Tryptic Soy Agar* (TSA) é um meio sólido usado para o cultivo e isolamento de uma grande variedade de microrganismos não fastidiosos (Chaves 2004). Adicionalmente, quando enriquecido com sangue (TSA sangue) propicia o crescimento de microrganismos fastidiosos e permite a visualização de reações hemolíticas.

Neste trabalho, o TSA (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 40 g/L e esterilizado a 121°C durante 20 min. Para a preparação de TSA sangue, foi utilizado meio *Tryptose Blood Agar Base* (Oxoid) a uma concentração de 30 g/L. Após a esterilização (121°C durante 20 min) e arrefecimento até 45 - 50°C foi adicionado 7% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro ao meio de cultura, em condições asséticas. Após a preparação, estes meios foram armazenados a 4°C.

2.1.3 Mannitol Salt Agar

O *Mannitol Salt Agar* (MSA) é um meio seletivo e diferencial usado para o isolamento e diferenciação de bactérias Gram-positivas do género *Staphylococcus* (Winn *et al.* 2006). Este meio apresenta uma elevada concentração de NaCl, que resulta na inibição parcial ou completa de bactérias não *Staphylococcus*, e um indicador de pH, o vermelho de fenol, que permite a diferenciação entre bactérias fermentadoras de manitol (*Staphylococcus* coagulase positivas) e não fermentadoras de manitol (*Staphylococcus* coagulase negativas) (Winn *et al.* 2006).

O MSA (Liofilchem®) foi preparado com uma concentração de 111 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.1.4 Eosin Methylene Blue Levine Agar

O *Eosin Methylene Blue Levine Agar* (EMBA) é um meio ligeiramente seletivo e diferencial usado para o isolamento e diferenciação de bactérias Gram-negativas. Este meio apresenta na sua composição os corantes eosina Y e azul de metileno que atuam como inibidores de crescimento de bactérias Gram-positivas e como indicadores de pH, permitindo a diferenciação entre bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras de lactose (Winn *et al.* 2006).

O EMBA (Liofilchem®) foi preparado a uma concentração de 37,5 g/L, esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.1.5 Luria– Bertani Agar

O *Luria-Bertani Agar* (LBA) é um meio nutritivo comumente utilizado no cultivo e manutenção de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como é o caso da *Escherichia coli* (Conway *et al.* 2001).

Neste trabalho, o LB Agar (Liofilchem®) foi preparado a uma concentração de 35 g/L, esterilizado durante 20 min e armazenado a 4°C.

2.1.6 Efluente artificial de diálise peritoneal

O efluente artificial de DP (EADP) foi preparado como descrito por Holmes *et al.* (1989) tendo a seguinte composição (g/L): 0,133 de CaCl₂·2H₂O (Riedel de Haën); 0,081 de MgCl₂·6H₂O (Merck); 8 de NaCl (Applichem); 0,128 de KH₂PO₄ (Applichem); 0,197 de KCl

(Pronalab®); 1,32 de ureia (National Diagnostics); 0,083 de creatinina (Sigma); 4,63 de glucose monohidratada (Liofilchem®). O EADP foi armazenado à temperatura ambiente. Aquando da sua utilização, 1% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco) foi adicionado em condições assépticas.

2.1.7 Phosphate Buffered Saline

O *Phosphate Buffered Saline* (PBS) foi preparado de acordo com a seguinte composição (g/L): 8 de NaCl; 0,2 de KCl; 0,2 de KH₂PO₄; 1,15 de NaH₂PO₄ (Pronalab). O PBS foi esterilizado a 121°C durante 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

2.1.8 NaCl 0,9%

A solução de NaCl foi preparada a uma concentração de 0,9% (p/v), foi esterilizada a 121°C durante 20 min e armazenada à temperatura ambiente.

2.1.9 Solução matriz 2,5 – ácido dihidroxidobenzoico

A solução matriz 2,5-ácido dihidroxidobenzoico (DHB) foi preparada com uma concentração de 75 g/L de 2,5-ácido dihidroxidobenzoico (Sigma) em etanol (Sigma)/água/acetoneitrilo (Sigma) [1:1:1] e 0,03% (v/v) de ácido trifluoroacético (Sigma).

2.2 Microrganismos

2.2.1 Estirpes de referência e isolados clínicos

As estirpes de referência *S. aureus* JKD6008, *S. epidermidis* 9142 e *P. aeruginosa* PA14 cedidas pelo Grupo de Biofilmes, IBB- *Institute for Biotechnology and Bioengineering*, CEB - *Centre of Biological Engineering - University of Minho* foram usadas para avaliação da metodologia de recuperação de microrganismos em extensores de cateteres de DP (item 2.3.5.1.2). A escolha destas espécies prendeu-se com o facto de se tratar dos três principais agentes patogénicos envolvidos em infeções associadas a cateteres de DP (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001, Fried e Piraino 2009) e serem formadoras de biofilme (Mack *et al.* 1996, Friedman e Kolter 2004, Archer *et al.* 2011). Adicionalmente, estas estirpes e a estirpe de referência *E. coli* K12, cedida pela Micoteca da Universidade do Minho, IBB-*Institute for Biotechnology and Bioengineering*, *Centre of Biological* Universidade do Minho

Engineering, foram usadas como controlos nos procedimentos de identificação microbiana (item 2.3.7).

A estirpe de referência *E. coli* DH-5- α , cedida pela Micoteca da Universidade do Minho, IBB-*Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering*, foi usada para a calibração externa do MALDI-TOF MS.

Os isolados clínicos obtidos no processamento das várias amostras (item 2.3.2) foram usados para a identificação microbiana (item 2.3.7).

2.2.2 Manutenção e armazenamento

As estirpes de referência e os isolados clínicos foram mantidos a 4°C, em TSA, durante um período de tempo não superior a um mês.

Para o armazenamento, os microrganismos foram incubados em TSA, a 37°C durante 24 h. De seguida, as colónias foram ressuspensas em TSB glicerol e armazenadas a - 80°C (Perry 1998).

2.3 Pesquisa de microrganismos aeróbios em amostras de diálise peritoneal

2.3.1 Colheita e transporte de amostras

As amostras de DP (6 efluentes, 3 zaragatoas do orifício de saída, 55 extensores e 10 cateteres permanentes) e de HD (13 cateteres venosos centrais) foram obtidas no Serviço de Nefrologia, do Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António e no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia. A colheita foi realizada de Setembro de 2011 a Março de 2012 pela equipa de enfermagem, no caso dos efluentes, zaragatoas do orifício de saída e extensores, e pela equipa médica, no caso dos cateteres. O nome e as informações pessoais dos pacientes foram ocultados a fim de manter o anonimato.

Os efluentes de DP foram recolhidos de pacientes com peritonite e transportados para o laboratório em frascos de 100 mL estéreis ou em frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F (BD, Becton Dickinson).

As zaragatoas (Copan) foram obtidas de pacientes com IOS e transportadas para o laboratório no respetivo dispositivo de transporte.

Os extensores foram recolhidos por rotina, os cateteres permanentes de DP e os cateteres de HD foram recolhidos por indicação clínica. Estas amostras foram transportadas para o laboratório em sacos estéreis selados.

O transporte de todas as amostras foi realizado em condições de refrigeração.

2.3.2 Recuperação dos microrganismos dos diferentes tipos de amostras

A recuperação dos microrganismos foi realizada em condições assépticas, nas primeiras 24 h após a colheita das amostras.

2.3.2.1 Efluentes de diálise peritoneal

As amostras de efluente de DP recolhidas em frascos foram processadas tendo por base a metodologia descrita por Li *et al.* (2010), que tem como objetivos aumentar a taxa de isolamento microbiano e diminuir a presença de possíveis agentes antimicrobianos na amostra. A recuperação consistiu na centrifugação das amostras durante 10 min a 5372 rpm [centrífuga Sigma 3-16k (rotor: 19776-H)]. O sobrenadante foi decantado asseticamente, o sedimento foi ressuspensão em NaCl 0,9% e novamente centrifugado. Este processo foi repetido duas vezes. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensão num volume de TSB igual a 10% do volume inicial da amostra. De seguida, a suspensão celular foi sonicada e processada para análise quantitativa e qualitativa como descrito no item 2.3.3.

As amostras em frascos de cultura BACTEC™ plus aerobic/F foram processadas diretamente para a análise qualitativa, uma vez que, após a colheita, os frascos foram diretamente incubados, de acordo com o descrito no item 2.3.3. Estes frascos contêm meio de cultura e resinas que neutralizam o efeito de agentes antimicrobianos, aumentando desta forma a taxa de recuperação microbiana (Appelbaum 1983).

2.3.2.2 Zaragoas do orifício de saída

As zaragoas do orifício de saída foram lavadas em 500 µL de PBS e a suspensão celular resultante foi sonicada, vortexada e processada para análise semi-quantitativa e qualitativa de acordo com o descrito no item 2.3.3.

2.3.2.3 Extensores de cateter de diálise peritoneal

No decorrer da DP, a superfície extraluminal dos extensores está em contacto com a flora da pele do paciente. Desta forma, o primeiro passo no processamento consistiu na descontaminação da superfície extraluminal por submersão do extensor em etanol 70% durante 10 min. Para a remoção do etanol foi efetuada uma passagem em água esterilizada e uma lavagem em água esterilizada durante 5 min.

Após a descontaminação, cada extensor foi cortado longitudinalmente. Um dos segmentos foi utilizado para análise microbiológica. Esta consistiu na recuperação dos microrganismos aderidos à superfície intraluminal através da raspagem da matéria visível com um bisturi. O raspado foi ressuspenso em 500 µL de PBS e a suspensão resultante foi sonicada, vortexada e processada para análise semi-quantitativa e qualitativa de acordo com o descrito no item 2.3.3. O outro segmento foi reservado para posteriores análises complementares.

2.3.2.4 Cateteres permanentes de diálise peritoneal

O processamento dos cateteres permanentes consistiu na análise de quatro elementos distintos: segmento externo, *cuff* intermédio, *cuff* interno e segmento intraperitoneal (Figura 3), sempre que aplicável.

2.3.2.4.1 Segmento externo

O segmento externo foi processado utilizando a metodologia descrita previamente para os extensores (item 2.3.2.3).

2.3.2.4.2 Cuffs

O isolamento de microrganismos aderidos aos *cuffs* foi realizado tendo por base a metodologia descrita por Maki *et al.* (1977). Esta consistiu no *rolling* do *cuff* para frente e para trás em TSA sangue, pelo menos 16 vezes, permitindo a análise semi-quantitativa. Adicionalmente, foi levada a cabo outra abordagem semi-quantitativa que consistiu na sonicação, *pós-rolling*, do *cuff* em 5 mL de TSB sangue, seguida da análise qualitativa como descrito no item 2.3.3.

2.3.2.4.3 Segmento intraperitoneal

O segmento intraperitoneal dos cateteres foi cortado longitudinalmente. Um dos segmentos foi utilizado para análise microbiológica. Esta consistiu na recuperação dos microrganismos aderidos às superfícies intra e extraluminal, através da sonicação do segmento em 5 mL de TSB sangue, como descrito no item 2.3.3. A suspensão resultante foi processada para análise semi-quantitativa e qualitativa de acordo com o descrito no item 2.3.3. O outro segmento foi reservado para posteriores análises complementares.

2.3.3 Isolamento e (semi-) quantificação dos microrganismos

De uma forma geral, após a recuperação, o isolamento e a (semi-) quantificação dos microrganismos envolveram a realização de três passos: a sonicação, a análise (semi-) quantitativa e a análise qualitativa.

Sonicação

Com o objetivo de desagregar o biofilme e homogeneizar as suspensões resultantes do processamento das várias amostras (itens 2.3.2.1 - 4), foi realizada a sonicação. Esta foi efetuada num banho de ultra-sons (Sonicor) durante 5 min.

O protocolo de sonicação foi avaliado no sentido de averiguar se este método afeta a viabilidade celular dos microrganismos (item 2.3.6).

Análise quantitativa

Para a quantificação das unidades formadoras de colónias (UFC) presentes nos efluentes recolhidos em frascos estéreis (item 2.3.2.1), 100 µL da suspensão, ou das diluições apropriadas em PBS, foram espalhados em TSA sangue.

Análise semi-quantitativa

Para a avaliação do número de UFC recuperadas das zaragoas (item 2.3.2.2), dos extensores (item 2.3.2.3) e dos cateteres permanentes de DP (item 2.3.2.4), após a sonicação foram espalhados 100 µL da suspensão em TSA sangue e sempre que necessário foram realizadas diluições apropriadas em PBS.

Análise qualitativa

Para as zaragoas (item 2.3.2.2), extensores (item 2.3.2.3) e segmento externo dos cateteres de DP (item 2.3.2.4.1), o volume restante (após a análise semi-quantitativa) foi transferido para 5 mL de TSB. Nestas amostras e nas restantes [efluentes em frascos estéreis (item 2.3.2.1), *cuffs* (item 2.3.2.4.2) e segmento intraperitoneal dos cateteres de DP (item 2.3.2.4.3)] foi adicionado 7% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro à suspensão em TSB. Estas suspensões, bem como as amostras de efluente em frascos de cultura BACTEC™ Plus Aerobic/F (item 2.3.2.1), foram incubadas a 37°C durante 24 h, numa incubadora orbital (N-BIOTEK) a 120 rpm. Após o período de incubação, foram espalhados 100 µL de suspensão em TSA sangue.

Condições de incubação e análise das colónias crescidas no meio de cultura

Todas as placas resultantes das diferentes análises acima descritas foram incubadas a 37°C durante 24 a 72 h. Após o período de incubação foi realizada a quantificação das UFC e analisadas as características morfológicas e o tipo de reação hemolítica produzida pelos microrganismos, sempre que apropriado.

O limite de deteção do método de análise microbiológica efetuado é de 1 UFC por 1 mL de efluente, 5 UFC por zaragatoa, 10 UFC por extensor/segmento externo, 1 UFC e 50 UFC por *cuff*, para o *rolling* e para a sonicação pós-*rolling*, respetivamente, e de 100 UFC por segmento intraperitoneal.

2.3.4 Avaliação de metodologia para a recuperação de microrganismos em zaragoas do orifício de saída

Relativamente às zaragoas do orifício de saída foi realizada a avaliação da metodologia de recuperação (item 2.3.2.2), com o objetivo de verificar se a lavagem em PBS permite a recuperação da maior parte dos microrganismos. Para tal, após a lavagem, foi realizada a passagem da zaragatoa em TSA sangue. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 72 h. Após o período de incubação foi realizada a quantificação das UFC.

2.3.5 Avaliação da metodologia para a recuperação de microrganismos em cateteres de diálise peritoneal

2.3.5.1 Extensor/ segmento externo

Com o objetivo de verificar se a descontaminação da superfície extraluminal (item 2.3.2.3) permite a eliminação dos microrganismos aderidos e que a raspagem (item 2.3.2.3) permite a recuperação de microrganismos de biofilmes formados na superfície intraluminal, foram realizados dois tipos de ensaios.

2.3.5.1.1 Descontaminação da superfície extraluminal

Primeiramente foi executada a descontaminação da superfície extraluminal do extensor como descrito no item 2.3.2.3. De seguida, foi efetuado o *rolling* da superfície extraluminal em TSA tendo por base a metodologia descrita por Maki *et al.* (1977). As placas foram incubadas a 37°C, durante 24 h a 72 h. Após o período de incubação foi realizada a quantificação das UFC.

2.3.5.1.2 Recuperação de microrganismos da superfície intraluminal

Ensaios *in vitro*

Os ensaios de recuperação de microrganismos de biofilmes formados *in vitro* na superfície intraluminal dos extensores envolveram quatro etapas: preparação das culturas, condicionamento dos extensores com EADP, contaminação *in vitro* e recuperação de microrganismos intraluminais. Para estes ensaios foram utilizadas as estirpes de referência *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Preparação das culturas

Inicialmente, cada uma das estirpes foi repicada em TSA e incubada a 37°C durante 24 h. De seguida, foi preparado um pré-inóculo em TSB que foi incubado a 37°C durante 18 h, numa incubadora orbital a 120 rpm. Após o período de incubação, a suspensão celular foi centrifugada durante 10 min a 9000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi decantado, o sedimento foi ressuspenso em NaCl 0,9% e novamente centrifugado. Este processo foi repetido duas vezes. Após a última centrifugação, o sedimento resultante foi ressuspenso em TSB glucose. Desta suspensão, foram preparadas diluições em TSB glucose, a fim de se obter

concentrações celulares dentro do intervalo das observadas em biofilmes formados em cateteres DP *ex vivo*: 0 a 10^9 UFC/mL (Bayston *et al.* 1999) e, portanto, as concentrações celulares utilizadas foram 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC/mL.

Condicionamento dos extensores com EADP

Com o objetivo de se obter um filme condicionador semelhante ao que se forma durante a DP, os extensores foram condicionados com EADP. Os extensores estéreis foram cortados em porções de 4,5 cm de comprimento e as extremidades foram seladas com seringas de 1 mL (BD, Becton Dickinson). De seguida, 500 μ L de EADP foram introduzidos em cada porção. Para garantir a máxima adsorção de proteínas à superfície intraluminal, as porções foram incubadas a 37°C, *overnight* e sem agitação, como descrito por Yanagisawa *et al.* (2004). Após o período de condicionamento, o EADP foi removido com o auxílio das seringas. Com o objetivo de remover as proteínas que não ficaram adsorvidas à superfície intraluminal, o interior dos extensores foi lavado uma vez com água esterilizada.

Contaminação *in vitro* dos extensores

Para a contaminação *in vitro* dos extensores, foram introduzidos 500 μ L das suspensões microbianas preparadas nos segmentos condicionados. De seguida, os segmentos foram incubados a 37°C durante 24 h. Paralelamente foi efetuado um branco com 500 μ L de TSB glucose.

Estes ensaios foram realizados em duas ocasiões com uma réplica para cada concentração celular.

Recuperação do biofilme

Após o período de incubação, os sobrenadantes foram removidos com o auxílio das seringas. Com o objetivo de remover os microrganismos que não ficaram aderidos à superfície intraluminal, o interior das porções foi lavado uma vez com NaCl 0,9%. De seguida, cada porção foi processada de acordo com o descrito no item 2.3.2.3 e 2.3.3. De notar que a avaliação do número de UFC recuperadas neste conjunto de experiências controlo foi efetuado pelo método da gota, adaptado de Herigstad *et al.* (2001). Este consistiu na distribuição de 5 gotas de 10 μ L de suspensão celular em TSA e escorrência até à sua completa secagem.

Os ensaios de recuperação do biofilme formado na superfície intraluminal foram realizados com uma réplica para cada concentração, em duas ocasiões diferentes.

Testes de controlo adicionais

Em paralelo com os ensaios de recuperação do biofilme formado na superfície intraluminal, foram executados dois testes de controlo que permitiram avaliar o crescimento dos microrganismos nas porções dos extensores condicionados e a eficácia da raspagem.

Primeiro, para averiguar se a incubação afetou a viabilidade microbiana foi realizada a contagem de UFC nos sobrenadantes removidos, depois de efetuadas as diluições apropriadas em PBS. Estes ensaios foram realizados com uma réplica para cada concentração, em duas ocasiões diferentes.

Segundo, para a avaliação da eficácia do método de raspagem (item 2.3.2.3) da superfície, foi efetuada a sonicação dos segmentos raspados em 5 mL de TSB, como descrito no item 2.3.3. Após a sonicação foram removidos 100 µL da suspensão celular e efetuadas as diluições apropriadas em PBS e respetiva avaliação do número de UFC. O número de UFC obtidos por raspagem e por sonicação pós-raspagem foi comparado. Estes ensaios foram realizados com uma réplica para cada concentração celular, numa única ocasião.

Ensaio *ex-vivo*

Adicionalmente, foram realizados ensaios de recuperação de biofilme em segmentos externos de cateteres HD para a validação do método utilizado nos extensores e nos segmentos externos nos cateteres DP. As amostras foram processadas como descrito nos itens 2.3.2.3 e 2.3.3.

2.3.5.2 Cuff

A validação do método de recuperação de microrganismos dos *cuffs* dos cateteres de DP foi efetuada com *cuffs* de cateteres de HD. As amostras foram processadas de acordo com o descrito nos itens 2.3.2.4.2 e 2.3.3.

2.3.5.3 Segmento intraperitoneal

A validação do método de recuperação de microrganismos do biofilme formado nos segmentos intraperitoneais dos cateteres de DP foi efetuada com segmentos internos de cateteres de HD. As amostras foram processadas de acordo com o descrito nos itens 2.3.2.4.3 e 2.3.3.

2.3.6 Avaliação do efeito da sonicação na viabilidade celular dos microrganismos recuperados

Com o objetivo de averiguar se a sonicação afeta a viabilidade celular dos microrganismos recuperados a partir das amostras de DP, foi efetuada a comparação do número de UFC recuperadas antes e depois da sonicação. Estes ensaios foram realizados em efluentes de DP recolhidos em frasco estéril e em extensores contaminados *in vitro*.

Em relação aos efluentes de DP ($n= 2$), foi realizada a recuperação microbiana de acordo com o método descrito no item 2.3.2.1. Antes e depois da sonicação (item 2.3.3) foram espalhados 100 μL da suspensão celular resultante em TSA sangue. O restante procedimento foi efetuado de acordo com o descrito no item 2.3.3.

Relativamente aos extensores contaminados *in vitro*, foi removida uma alíquota de 100 μL antes e depois da sonicação da suspensão de bactérias recuperadas dos extensores contaminados *in vitro* (item 2.3.5.1). A partir dessas alíquotas foram efetuadas as diluições apropriadas em PBS e o número de UFC foi avaliado. Estes ensaios foram realizados com uma réplica para cada concentração, numa única ocasião.

2.3.7 Identificação dos microrganismos

2.3.7.1 Identificação com base em meios seletivos e diferenciais

Para a identificação presuntiva dos microrganismos recuperados, em cada placa foi repicada uma colónia representativa de cada um dos diferentes tipos de morfologia e de reacção hemolítica para os meios seletivos e diferenciais (MSA e EMBA) e incubada a 37°C durante 24 a 48 h. Após o período de incubação, foram observados e registados os seguintes parâmetros: crescimento, morfologia e capacidade em fermentar manitol ou lactose. Paralelamente as estirpes de referência mencionadas no item 2.2.1 foram usadas como controlos.

2.3.7.2 Identificação por MALDI-TOF MS

A partir dos microrganismos isolados das amostras, foi efetuada a repicagem de uma colónia para TSA sangue. Para a calibração do MALDI-TOF MS foi usada a estirpe *E.coli* DH-5- α repicada em LBA. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h. Após o período de incubação, uma colónia foi diretamente transferida para uma das posições da placa de MALDI-TOF MS. De seguida, 0,5 μ L de solução matriz DHB foi adicionada e gentilmente misturada com cada uma das colónias. As amostras foram deixadas a secar à temperatura ambiente, de forma a cristalizar.

A análise das amostras foi realizada num sistema Axima LNR (Kratos Analytical, Shimadzu) equipado com um laser de nitrogénio (337 nm). O intervalo de massa de 2000 a 20000 Da foi registado em modo linear (*power* 110, *laser repetition rate* 20 Hz, 50 *profile/20 shot*). A identificação dos isolados clínicos foi efetuada no software SARAMIS™ (AnagnosTec mbH).

Para cada isolado e para a *E. coli* DH-5- α foram efetuadas duas réplicas. Paralelamente as estirpes de referência mencionadas no item 2.2.1 foram usadas como controlos.

2.4 Microscopia

Para avaliar o filme formado na superfície intraluminal dos extensores de DP, foram efetuadas análises por MEV e por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X (EDS) em amostras nas quais não foram detetados microrganismos pelos métodos microbiológicos. De cada amostra, foi usado um segmento que foi deixado a secar à temperatura ambiente. Desse segmento foram cortadas pequenas porções que foram revestidas com ouro por *sputtering*. Cada porção foi observada usando um microscópio eletrónico de varrimento (Cambridge Scientific Instruments, Ltd.) e nas secções de interesse foi realizada a análise da composição elementar da superfície por EDS (Link eXL II, Oxford Instruments). Dois controlos foram efetuados e consistiram em extensores estéreis de marcas diferentes (A e B).

2.5 Análise estatística

Para a avaliação da eficácia da raspagem e do efeito da sonicação na viabilidade celular foi efetuado o teste estatístico *t* de *Student*. Este teste foi realizado com um nível de confiança de

95% (*two-tailed*, $p < 0,05$). A análise estatística foi efetuada com recurso ao software GraphPad Prism® para Windows Vista.

3 Resultados

3.1 Efeito da sonicação na viabilidade celular dos microrganismos

O processo de sonicação foi recorrentemente utilizado para a dispersão de biofilmes e de suspensões durante este trabalho. Neste sentido, foi inicialmente efetuada a avaliação do efeito das condições experimentais utilizadas na viabilidade celular dos microrganismos (item 2.3.6). Primeiro, foi efetuada a comparação do número de UFC obtidas antes e depois da sonicação utilizando células de biofilmes de *S. aureus*, de *S. epidermidis* e de *P. aeruginosa*, obtidas após a raspagem da superfície intraluminal dos extensores contaminados *in vitro* (item 2.3.5.1.2). Os resultados indicaram que não existem diferenças significativas no número de UFC obtidas antes e depois da sonicação para as três espécies ($P > 0,05$). Segundo, foi comparado o número de UFC recuperadas antes e depois da sonicação recorrendo a amostras de efluentes em frasco estéril ($n=2$). Neste caso verificou-se que o número de UFC quantificadas depois da sonicação foi sempre superior ao número de UFC quantificadas antes da sonicação. Globalmente, estes resultados sugerem que o protocolo utilizado não afeta negativamente a viabilidade celular dos microrganismos recuperados e poderá favorecer a dispersão de agregados celulares.

3.2 Validação das metodologias de recuperação de microrganismos das amostras de diálise peritoneal

3.2.1 Zaragatoas do orifício de saída

Para a avaliação da metodologia de recuperação dos microrganismos nas zaragatoas do orifício de saída foram utilizadas duas das amostras previamente analisadas, como descrito em 2.3.2.2. Após a recuperação de microrganismos, a passagem da zaragatoa em meio TSA sangue indicou a presença de crescimento microbiano (89 UFC e >300 UFC). Isto sugere que a metodologia usada não permite recuperar a totalidade dos microrganismos da zaragatoa. Por esta razão, e pelo facto de a zaragatoa só permitir a amostragem da superfície do orifício de saída, esta metodologia de recuperação permite efetuar apenas uma análise semi-quantitativa.

3.2.2 Extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal

3.2.2.1 Extensor/ Segmento externo

Para a avaliação da eficácia da descontaminação da superfície extraluminal dos extensores/ segmentos externos foram utilizados 33 extensores removidos de pacientes em DP, como descrito em 2.3.5.1.1. Após a descontaminação e passagem da superfície externa do extensor em TSA sangue, apenas foram detetados microrganismos (entre 1 a 10 UFC) em 13 amostras. No entanto, em cinco destas amostras foi observada, em paralelo, uma cultura intraluminal positiva. Nestes casos, as características fenotípicas das colónias recuperadas da superfície intra e extraluminal diferiram. Deste modo, estes dados sugerem que mesmo quando a descontaminação da superfície extraluminal não é totalmente eficaz, durante o procedimento de recuperação do biofilme intraluminal por raspagem não ocorre contaminação cruzada.

Para a avaliação da metodologia de recuperação de microrganismos da superfície intraluminal (item 2.3.5.1.2) foram utilizados dois procedimentos – recuperação de biofilme em extensores contaminados *in vitro* e recuperação de biofilme em segmentos externos de cateteres HD.

No primeiro conjunto de ensaios os extensores foram contaminados *in vitro* com suspensões celulares contendo o número de UFC indicado na Tabela 4. Comparando o número de UFC introduzido nos extensores com o número de UFC presente nos sobrenadantes após 24 h (Tabela 4) verifica-se que houve crescimento celular, independentemente da densidade celular inicial.

Tabela 4 – Número de UFC do inóculo inicial e presente nos sobrenadantes após incubação relativo aos ensaios de recuperação de biofilme em extensores contaminados *in vitro* com *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*

Espécie	Nº de UFC inicial do inóculo (Média UFC)	Nº de UFC presentes no sobrenadante (Média UFC)
<i>S. aureus</i>	$1,49 \times 10^5$	$2,41 \times 10^8$
	$1,44 \times 10^7$	$2,59 \times 10^8$
<i>S. epidermidis</i>	$6,44 \times 10^2$	$8,78 \times 10^8$
	$5,99 \times 10^4$	$1,71 \times 10^8$
	$7,45 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$
<i>P. aeruginosa</i>	$5,88 \times 10^3$	$1,73 \times 10^9$
	$1,7 \times 10^5$	$4,16 \times 10^8$
	$1,76 \times 10^7$	$5,87 \times 10^8$

Após a remoção dos sobrenadantes do interior dos extensores, foi efetuada a recuperação das bactérias aderidas à superfície intraluminal por raspagem. Como se pode verificar no gráfico da Figura 5 foi possível recuperar microrganismos do biofilme formado na superfície intraluminal dos extensores, independentemente da espécie e da densidade celular inicial (Figura 5, colunas brancas). Contudo, o número de UFC recuperadas por sonicação do extensor após a raspagem (controlo da raspagem) foi semelhante ao observado para a recuperação por raspagem (Figura 5, colunas cinzentas *vs.* colunas brancas) ($P > 0,05$), logo isto indica que a raspagem não permite a recuperação completa das bactérias aderidas.

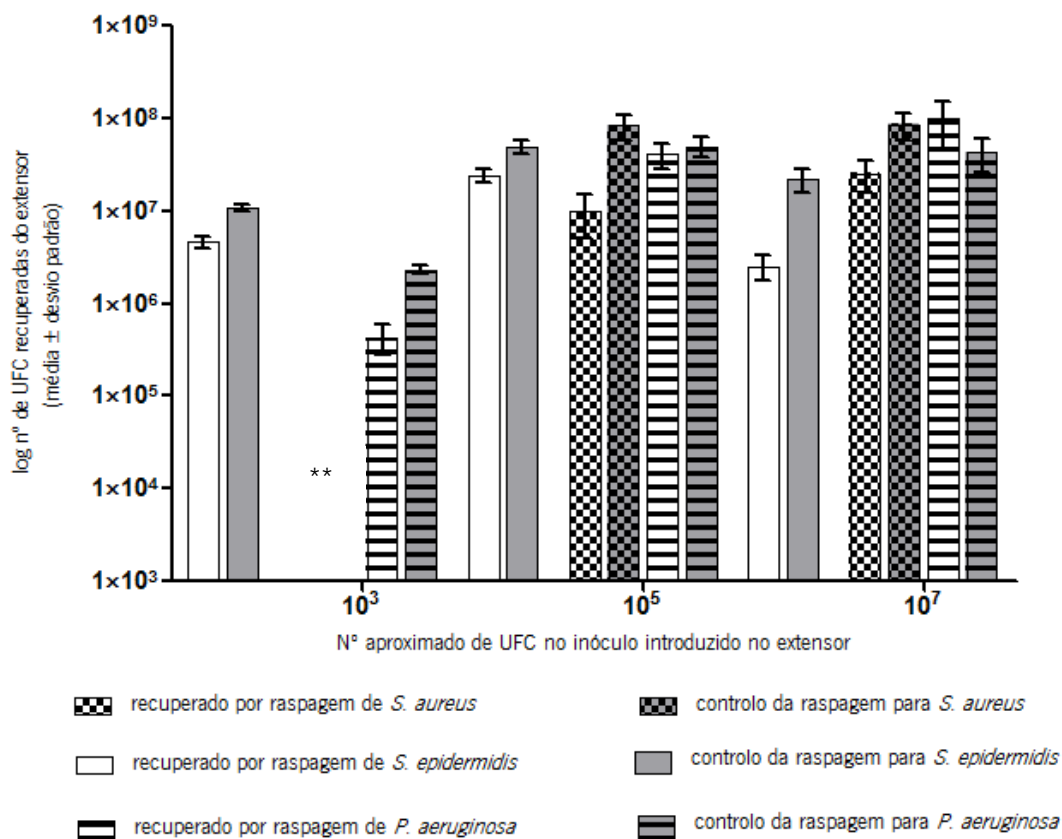


Figura 5 - Número de UFC recuperado por raspagem e por sonicação pós-raspagem (controlo da raspagem) dos extensores contaminados *in vitro* com *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Os valores exatos do número de UFC introduzido encontram-se na Tabela 4. ** Para o extensor contaminado com $\approx 10^3$ UFC de *S. aureus* não são apresentados resultados devido à ocorrência de um erro experimental na raspagem.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de recuperação microbiana nos segmentos externos de cateteres de HD removidos de pacientes. Dos 8 segmentos externos disponíveis, foram recuperados microrganismos em 63% através da análise qualitativa e em 38% através da análise semi-quantitativa.

Deste modo, estas abordagens permitem concluir que a metodologia usada para a recuperação microbiana intraluminal nos extensores e nos segmentos externos de DP é válida.

3.2.2.2 Cuff

Para a validação da metodologia de recuperação de microrganismos nos cuffs dos cateteres de DP foram realizados ensaios em cuffs de cateteres HD. Utilizando as duas

abordagens descritas no item 2.3.2.4.2, foram isolados microrganismos em 82% dos 11 *cuffs* de HD analisados através da análise qualitativa e em 73% através da análise semi-quantitativa (*rolling* e sonicação pós-*rolling*). Para comparação dos dois métodos de análise semi-quantitativa utilizados foi construída a Tabela 5. Como se pode verificar, o *rolling* permitiu a deteção de microrganismos em 73% dos *cuffs*, ao passo que sonicação pós-*rolling* permitiu detetar microrganismos em apenas 54%. Os resultados obtidos pelos dois métodos foram concordantes em 82% das amostras.

Tendo em conta que foram recuperados microrganismos, tal indica que as metodologias utilizadas nos *cuffs* de cateteres de DP são válidas.

Tabela 5 – Deteção de microrganismos nos *cuffs* de cateteres de HD através de dois métodos de análise semi-quantitativa (*rolling* e sonicação pós-*rolling*)

		Rolling		
		(Nº total de <i>cuffs</i>)		
		> LD	< LD	
Sonicação pós-<i>rolling</i>	> LD	6	0	6
	< LD	2	3	5
		8	3	11

LD – Limite de deteção.

3.2.2.3 Segmento intraperitoneal

Para a validação da metodologia de recuperação dos microrganismos dos segmentos intraperitoneais dos cateteres de DP, foram efetuados ensaios em segmentos internos de cateteres de HD utilizando o mesmo procedimento (item 2.3.5.3). Dos 13 segmentos analisados foram detetados microrganismos em 69% pela análise qualitativa e 31% através da análise semi-quantitativa. Estes resultados indicam que a metodologia usada nos segmentos intraperitoneais de cateteres de DP é válida.

3.3 Recuperação de microrganismos das amostras de diálise peritoneal

3.3.1 Efluentes

Nos efluentes processados neste trabalho foram detetados microrganismos através da análise quantitativa (apenas no caso dos efluentes recolhidos em frascos estéreis) e da análise qualitativa (para efluentes recolhidos em frascos estéreis e em frascos BACTEC plus aerobic/F). O tipo de análise, os resultados da recuperação microbiana e as espécies identificadas encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Como se pode verificar (Tabela 6), através do método quantitativo obtiveram-se 1 UFC/mL para a amostra 53 e 14 UFC/mL para a amostra 111. Contudo, em todos os efluentes foram isoladas bactérias, com predominio das Gram-positivas (71%), tendo sido a bactéria *S. aureus* a espécie mais comumente identificada (60% das bactérias Gram-positivas). De notar que em uma das amostras foi identificada uma cultura polimicrobiana constituída por *S. aureus* e *P. aeruginosa* (amostra 48, Tabela 6).

O método de identificação com base nos meios seletivos e diferenciais não determina qual a espécie microbiana, mas fornece uma indicação sobre a identidade, não sendo no entanto definitiva dos microrganismos. Assim, neste conjunto de amostras, espécies de *S. aureus* foram presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* coagulase-positiva e *P. aeruginosa* e *Providencia rettgeri* como bactérias Gram-negativas. Contudo, verificou-se que a bactéria *E. faecalis*, isolada na amostra 26 (Tabela 6) apresenta características fenotípicas semelhantes às *Staphylococcus* coagulase-positivas em meio MSA; e que o crescimento da bactéria *S. salivarius*, isolada na amostra 53 (Tabela 6) foi inibido em ambos os meios utilizados (MSA e EMBA).

Tabela 6 – Resultados da recuperação microbiana efetuada nos efluentes de DP

ID	Frasco usado para colheita	Análise quantitativa (UFC/mL)	Análise qualitativa ^a	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS
9	Bactec plus aerobic/F	n.e.	1	<i>P. rettgeri</i>
26	Bactec plus aerobic/F	n.e.	1	<i>E. faecalis</i>
41	Bactec plus aerobic/F	n.e.	1	<i>S. aureus</i>
48	Bactec plus aerobic/F	n.e.	1	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>
53	Frasco estéril	1	1	<i>S. salivarius</i>
111	Frasco estéril	14	1	<i>S. aureus</i>

ID - Identificação da amostra; n.e.- não efetuada; ^a 1: deteção de microrganismos.

3.3.2 Zaragatoas do orifício de saída

Em todas as zaragatoas recolhidas de pacientes com IOS foram recuperados microrganismos (Tabela 7). Como se pode constatar, em todas as amostras a densidade celular foi superior a 1500 UFC/zaragatoa, tendo no entanto variado consoante a amostra entre $1500 < \text{UFC/zaragatoa} \leq 15000$ (amostra 14, Tabela 7) e $> 15000 \text{ UFC/zaragatoa}$ (amostras 8 e 75, Tabela 7).

No conjunto de espécies identificadas por MALDI-TOF MS, as bactérias Gram-positivas foram o grupo maioritariamente identificado (67%). Adicionalmente, na amostra 75 (Tabela 7) foi identificada uma cultura polimicrobiana constituída por *E. coli* e por uma espécie não identificada por MALDI-TOF MS. No entanto, de acordo com os resultados da identificação com base nos meios seletivos, esta poderá ser uma bactéria *Staphylococcus* coagulase-negativa. De notar que a identificação presuntiva das restantes espécies deste grupo, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, sugeriu tratar-se de *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Staphylococcus* coagulase-negativa e bactérias Gram-negativa, respetivamente.

Tabela 7 – Resultados da recuperação microbiana efetuada nas zaragoas do orifício de saída

ID	Análise semi-quantitativa	Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS
	(UFC/zaragatoa) ^a		
8	+++	1	<i>S. aureus</i>
14	++	1	<i>S. epidermidis</i>
75	+++	1	<i>E. coli</i>
	+++		n.i.

ID - Identificação da amostra. n.i. – não identificado; ^a ++: 1500 < UFC/zaragatoa ≤ 15000, +++: 15000 < UFC/zaragatoa ≤ 150000; ^b 1: deteção de microrganismos.

3.3.3 Extensores

Neste trabalho foram analisados 55 extensores, tendo sido detetados microrganismos através da análise semi-quantitativa e/ou qualitativa em 34% das amostras. Os resultados relativos às amostras em que foram detetados microrganismos pelos métodos microbiológicos podem ser encontrados na Tabela 8. De acordo com estes resultados, a raspagem (análise semi-quantitativa) permitiu detetar mais de 10 UFC/ extensor em 20% das amostras. A contagem de UFC foi entre 10 e 300 para a maior parte destas amostras, embora em duas tenha sido superior a 300 (amostras 49 e 105). Por outro lado, a análise qualitativa foi importante para a deteção de microrganismos em 14% das amostras, cuja análise semi-quantitativa se encontrou abaixo do limite de deteção. De salientar que dentro deste grupo de amostras estão incluídas as amostras 104 e 105 (Tabela 8), onde uma das espécies co-isoladas só foi detetada pela análise qualitativa.

Como se pode constatar na Tabela 8, do total de microrganismos isolados todas as espécies identificadas por MALDI-TOF MS (58%) foram bactérias, das quais 33% são Gram-positivas. Dentro das bactérias Gram-positivas identificadas, a *S. epidermidis* foi a espécie mais comumente isolada (50%). Por outro lado, no grupo das bactérias Gram-negativas identificadas por MALDI-TOF MS (correspondente a 25% do total), as mais comuns foram a bactéria *P. aeruginosa* e as espécies de *Sphingomonas* (33% cada). Adicionalmente, em duas amostras foi identificada mais de uma espécie microbiana: duas bactérias Gram-positivas (amostra 95) e duas Gram-negativas (amostra 105) (Tabela 8). Contudo, em três amostras adicionais (49, 85 e 104) foram observadas colónias com morfotipos distintos, mas apenas um dos tipos foi identificado por MALDI-TOF MS (Tabela 8).

Os isolados de *S. epidermidis* (amostras 54, 55 e 95), *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Sphingomonas*, *Delftia acidovorans* e *Herbaspirillum huttiense* apresentaram a resposta típica nos meios seletivos e diferenciais. No entanto, os microrganismos identificados por MALDI TOF MS como *M. luteus* (amostra 42), *S. capitis* (amostras 85 e 95) e *S. epidermidis* (amostra 49) foram presuntivamente identificados como *Staphylococcus* coagulase-negativa, *Staphylococcus* coagulase-positiva e bactéria Gram-negativa, respetivamente.

Tabela 8 - Resultados da recuperação microbiana em extensores de cateteres de DP em que foram detetados microrganismos pelos métodos microbiológicos

ID	Análise semi-quantitativa	Análise qualitativa	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS
	(UFC/extensor) ^a	b	
42	+	1	<i>M. luteus</i>
45	-	1	n.i.
49	+	1	<i>S. epidermidis</i>
	++	1	n.i.
50	+	1	<i>S. aureus</i>
54	-	1	<i>S. epidermidis</i>
55	-	1	<i>S. epidermidis</i>
59	+	1	<i>D. acidovorans</i>
61	+	1	n.i.
64	-	1	<i>H. huttiense</i>
65	-	1	n.i.
76	+	1	n.i.
85	-	1	<i>S. capitis</i>
			n.i.
95	-	1	<i>S. epidermidis</i>
			<i>S. capitis</i>

ID - Identificação da amostra. n.i. – não identificado; ^a -: UFC/extensor < 10, +: 10 ≤UFC/extensor ≤ 300, ++: UFC/extensor > 300, ^b 1: deteção de microrganismos.

Tabela 8 - Resultados da recuperação microbiana em extensores de cateteres de DP em que foram detetados microrganismos pelos métodos microbiológicos (continuação)

ID	Análise semi-quantitativa	Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS
	(UFC/extensor) ^a		
98	+	1	<i>Sphingomonas</i> spp.
103	-	1	n.i.
104	+	1	n.i.
	-	1	<i>P. aeruginosa</i>
105	++	1	<i>Sphingomonas</i> spp.
	-	1	<i>P. aeruginosa</i>
110	+	1	n.i.
116	+	1	n.i.

ID - Identificação da amostra. n.i. – não identificado; ^a -: UFC/extensor < 10, +: 10 ≤UFC/extensor ≤ 300, ++: UFC/extensor > 300, ^b 1: deteção de microrganismos.

Como se pode verificar na Tabela 8, 10 dos microrganismos isolados dos extensores não foram identificados por MALDI-TOF MS. Os resultados da identificação presuntiva destes microrganismos estão apresentados na Tabela 9. Tendo por base os meios seletivos e diferenciais utilizados (MSA e EMBA), em duas amostras (49 e 61) não foi possível obter a identificação presuntiva e nas restantes foram presuntivamente identificadas em igual número bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. De notar que as espécies co-isoladas nas amostras 85 e 104 e não identificadas por MALDI-TOF MS foram presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* e bactéria Gram-negativa, respetivamente. No caso do co-isolado da amostra 49, o seu crescimento do isolado não identificado foi inibido em ambos os meios utilizados.

Tabela 9 – Resultados da identificação presuntiva dos microrganismos recuperados a partir dos extensores de DP e não identificados por MALDI- TOF MS

ID	Reação hemolítica ^a	Crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia		Identificação Presuntiva
		MSA ^b	EMBA ^c	
45	Γ	bom/ amarela/ amarelo	inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva
49	Γ	inibido/ n.a./ n.a.	inibido/ n.a./ n.a.	n.i.
61	A	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	n.i.
65	Γ	bom/ rosa/ rosa	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
76	Γ	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	bom/ púrpura/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
85	Γ	bom/ amarela/ rosa	inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i>
103	Γ	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	bom/ púrpura/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
104	Γ	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	bom/ púrpura/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
110	A	inibido/ n.a./ n.a.	bom/ púrpura/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
116	A	bom/ amarela/rosa	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i>

ID - Identificação da amostra; n.i. - não identificado; n.a. - não aplicável; para as estirpes de referência: ^a resposta de reação hemolítica: *S. aureus* - β; *S. epidermidis* - γ; *P. aeruginosa* - β.; *E. coli* - α; ^b resposta em MSA (crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia): *S. aureus* - bom/ amarela/ amarelo; *S. epidermidis* - bom/ rosa/ rosa; *P. aeruginosa* - inibido/ n.a. / n.a.; *E. coli* - inibido/ n.a./ n.a.; ^c resposta em EMBA (crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia): *S. aureus* - parcialmente inibido/ n.a./ n.a.; *S. epidermidis* - parcialmente inibido/ n.a./ n.a.; *P. aeruginosa* - bom/ púrpura / n.a.; *E. coli* - bom/ verde metálico/ n.a.

3.3.4 Cateteres permanentes

Em todos os cateteres permanentes de DP analisados foram recuperados microrganismos em pelo menos um dos segmentos analisados (Tabela 10). Na Tabela 10 estão apresentados, para cada um dos elementos do cateter, os resultados da recuperação microbiana e a identificação das espécies isoladas.

Relativamente aos segmentos externos em que foi efetuada a análise semi-quantitativa, por raspagem, obtiveram-se em 28% entre 10 a 300 UFC/segmento, em 28% entre 300 a 3000 UFC/segmento e em 14% mais de 3000 UFC/segmento. Por outro lado, o método qualitativo permitiu a observação de culturas positivas em 86% destas amostras. Nos *cuffs* intermédios e

internos, através de pelo menos um dos métodos semi-quantitativos utilizados (*rolling* e/ou sonicação *pós-rolling*) foram observadas culturas acima do limite de deteção em 58% dos *cuffs*. Especificamente, através do método de *rolling* observou-se uma densidade celular entre $1 \leq \text{UFC}/\text{cuff} \leq 300$ em 43% das amostras e mais de 300 em 28%. Por outro lado, utilizando a sonicação *pós-rolling* obtiveram-se $50 \leq \text{UFC}/\text{cuff} \leq 15000$ em 29% das amostras e mais de 15000 em 14% das amostras. O método qualitativo permitiu a deteção de microrganismos em 63% da totalidade das amostras (Tabela 10). Finalmente, em 28% dos segmentos intraperitoneais foram detetadas UFC por segmento no intervalo entre 100 a 30000. A análise qualitativa permitiu a deteção de microrganismos em 70% destas amostras. De salientar que, para as amostras analisadas pelos métodos semi-quantitativo e qualitativo, a análise qualitativa permitiu a deteção de microrganismos em 28% dos segmentos externos, 10% dos *cuffs* e 85% dos segmentos intraperitoneais cuja análise semi-quantitativa se encontrava abaixo do limite de deteção. Neste grupo estão incluídas a amostra 105 (segmento externo), amostra 116 (*cuff* intermédio) e amostra 57 (segmento intraperitoneal) nas quais uma das espécies co-isolada não foi isolada pelos métodos semi-quantitativos.

Como se pode verificar na Tabela 10, todos os isolados identificados por MALDI-TOF MS foram bactérias, dos quais 75% correspondem a Gram-positivas. Dentro das bactérias Gram-positivas identificadas, *S. epidermidis* foi a espécie maioritariamente detetada (57%), seguida das espécies de *Corynebacterium* (14%), *S. haemolyticus* e *S. caprae/S. capitis* (9% cada espécie) e das bactérias *M. luteus* e *S. hominis* (5% cada espécie). De notar que em todos os elementos a bactéria *S. epidermidis* foi a espécie predominantemente identificada (40% dos segmentos externos, 33% dos *cuffs* intermédios, 20% dos *cuffs* internos e 30% dos segmentos intraperitoneais). Dentro das bactérias Gram-negativas identificadas por MALDI-TOF MS (que representam 25% dos isolados identificados), foram detetadas 71% de bactérias da espécie *P. aeruginosa* e 29% de *Sphingomonas*. Analisando cada elemento, *P. aeruginosa* foi a bactéria Gram-negativa maioritariamente identificada (20% dos segmentos externos, 22% dos *cuffs* intermédios e 10% dos *cuffs* internos).

Os isolados de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* (amostra 39), *S. caprae/S. capitis* (amostra 57), *S. hominis*, *P. aeruginosa* e *Sphingomonas* apresentaram a resposta típica nos meios seletivos e diferenciais. No entanto, a bactéria *M. luteus* (amostra 29) foi presuntivamente identificada como *Staphylococcus* e as bactérias *S. haemolyticus* (amostra 57), *Corynebacterium* (amostra 58) e *S. caprae/S. capitis* (amostra 105) como *Staphylococcus* coagulase-positivas.

Tabela 10 - Resultados da recuperação microbiana efetuada em cateteres permanentes de DP

ID	Segmento externo			Cuff intermédio			Cuff interno			Segmento intraperitoneal				
	Análise semi-quantitativa (UFC/seg.) ^a	Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS	Análise semi-quantitativa		Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS	Análise semi-quantitativa		Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS	Análise semi-quantitativa (UFC/seg.) ^e	Análise qualitativa ^b	Identificação microbiana por MALDI-TOF MS
				Rolling (UFC/cuff) ^c	Sonicação pós-rolling (UFC/cuff) ^d			Rolling (UFC/cuff) ^c	Sonicação pós-rolling (UFC/cuff) ^d					
20 ^f	n.e.	1	n.i.	++	n.e.	1	<i>S. epidermidis</i>	-	n.e.	0	n.e.	n.e.	0	n.e.
21 ^f	n.e.	1	<i>S. epidermidis</i>	-	n.e.	0	n.e.	-	n.e.	0	n.e.	n.e.	0	n.e.
29 ^f	n.e.	0	n.e.	a.c.	a.c.	n.e.	n.e.	-	n.e.	1	<i>M. luteus</i>	n.e.	0	n.e.
39	+++	1	<i>S. haemolyticus</i>	-	-	0	n.e.	-	-	0	n.e.	-	1	<i>S. epidermidis</i>
40 ^f	++	1	<i>S. epidermidis</i>	++	n.e.	1	<i>S. epidermidis</i>	++	n.e.	1	<i>S. epidermidis</i>	-	1	<i>S. epidermidis</i>
57	-	1	<i>S. epidermidis</i>	++	+	1	<i>P. aeruginosa</i>	++	-	1	<i>S. caprae/ S. capitis</i>	+	1	n.i.
					+		<i>S. epidermidis</i>	+	<i>S. epidermidis</i>		-	1	n.i.	
					+		<i>S. haemolyticus</i>	+	<i>S. epidermidis</i>		-	1	n.i.	
58	++	1	<i>Sphingomonas</i> spp.	+	+	1	<i>Corynebacterium</i> spp.	+	-	1	n.i.	-	1	<i>Corynebacterium</i> spp.
	+		n.i.	+	+		<i>Corynebacterium</i> spp.	-	1		<i>Corynebacterium</i> spp.			
90	+	1	<i>P. aeruginosa</i>	+	-	1	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	1	<i>P. aeruginosa</i>	-	1	<i>S. hominis</i>
	+		n.i.	+	+		<i>P. aeruginosa</i>	-	1		<i>S. hominis</i>			
	+		<i>S. epidermidis</i>	+	+		<i>P. aeruginosa</i>	-	1		<i>S. hominis</i>			
105	+	1	<i>Sphingomonas</i> spp.	-	-	0	n.e.	-	-	0	n.e.	+	1	<i>S. caprae/ S. capitis</i>
	-		<i>P. aeruginosa</i>	-	-		<i>P. aeruginosa</i>	+	1		<i>S. caprae/ S. capitis</i>			
116	-	0	n.e.	+	-	1	n.i.	+	-	1	n.i.	-	1	n.i.
				+	-		n.i.	+	-		n.i.	-	1	<i>S. epidermidis</i>
				-	-		1	n.i.	+		n.i.	-	1	n.i.

ID - Identificação da amostra; seg. - segmento; n.e. - não efetuado; n.i. - não identificado; a.c. - ausência do cuff; ^a -: < 10 UFC/segmento, +: 10 ≤ UFC/segmento ≤ 300, ++: 300 < UFC/segmento < 3000, +++ UFC/segmento > 3000; ^b 1: deteção de microrganismos, 0: sem deteção de microrganismos; ^c -: UFC/cuff < 1, +: 1 ≤ UFC/cuff ≤ 300, ++: UFC/cuff > 300; ^d -: UFC/cuff < 50, +: 50 ≤ UFC/cuff ≤ 15000, ++: UFC/segmento > 15 000; ^e -: UFC/segmento < 100, +: 100 ≤ UFC/segmento ≤ 30000, ++: UFC/segmento > 30000; ^f amostras analisadas numa fase experimental inicial em que apenas foi efetuado o rolling dos cuffs e a análise qualitativa dos diferentes elementos do cateter.

A partir da Tabela 10 pode-se verificar também que em 80% das amostras cujos isolados foram todos identificados (amostras 21, 29, 39, 40 e 105), foi detetada uma cultura monomicrobiana em cada um dos elementos colonizados (amostras 21, 29, 39 e 40). Destes cateteres, em apenas um (amostra 40) foi identificada a mesma espécie bacteriana em todos os elementos. Em duas amostras de segmento externo (amostras 90 e 105) foram observadas culturas polimicrobianas, uma constituída por *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e por outra espécie não identificada por MALDI-TOF MS e a outra por *P. aeruginosa* e *Sphingomonas*. Em relação aos *cuffs*, foram observadas culturas polimicrobianas em duas amostras (amostra 57 – *cuff* intermédio e interno), uma constituída por *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* e a outra por *S. caprae/ S. capitis* e *S. epidermidis* (Tabela 10). No segmento externo e *cuff* interno da amostra 58 e no *cuff* interno, *cuff* intermédio e segmento intraperitoneal da amostra 116 foram observadas colónias com morfotipos distintos. No entanto, apenas um tipo de cada amostra foi identificado por MALDI-TOF MS, à exceção dos isolados dos *cuffs* da amostra 116 para os quais não foi obtida identificação por MALDI-TOF MS.

Como se pode verificar na Tabela 10, não foi possível obter a identificação de 13 isolados. Assim sendo, na Tabela 11 encontram-se os resultados da sua identificação presuntiva. Como se pode constatar, é possível que a cultura observada no *cuff* interno da amostra 116 seja polimicrobiana dado que foram presuntivamente identificadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É ainda possível que a cultura observada no *cuff* intermédio (amostra 116) seja constituída por duas espécies de bactérias Gram-positivas, uma vez que foram presuntivamente identificadas *Staphylococcus* coagulase-negativa e positiva. Em relação aos isolados não identificados do segmento externo e do *cuff* interno da amostra 58 e do segmento intraperitoneal da amostra 116, os resultados da identificação presuntiva não permitem concluir se estes pertencem ou não à mesma espécie dos isolados identificados.

Tabela 11 - Resultados da identificação presuntiva dos microrganismos recuperados a partir dos cateteres permanentes e não identificados por MALDI- TOF MS

ID	Elemento do cateter	Reação hemolítica a	Crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia		Identificação Presuntiva
			MSA ^b		
			EMBA ^c		
20	segmento externo	γ	bom/ rosa/ rosa	inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
57	segmento ip	γ	inibido/ n.a./ n.a.	inibido/ n.a./ n.a.	n.i.
		β	bom/ amarela/ amarelo	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva
58	segmento externo	γ	inibido/ n.a./ n.a.	bom/ sem cor/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
	cuff interno	β	bom/ amarela/ amarelo	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva
90	segmento externo	γ	bom/ amarela/ amarelo	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i>
116	cuff intermédio	γ	bom/ amarela/amarelo	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva
	cuff interno	γ	parcialmente inibido	bom/ púrpura/ n.a.	Bactéria Gram-negativa
		γ	bom/ rosa/ rosa	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
segmento ip	γ	bom/ amarela/rosa	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	<i>Staphylococcus</i>	
	γ	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	parcialmente inibido/ n.a./ n.a.	n.i.	

ID - Identificação da amostra; n.i. - não identificado; n.a. - não aplicável; para as estirpes de referência: ^a resposta de reação hemolítica: *S. aureus* - β; *S. epidermidis* - γ; *P. aeruginosa* - β.; *E. coli* - α ; ^b resposta em MSA (crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia): *S. aureus* - bom/ amarela/ amarelo; *S. epidermidis* - bom/ rosa/ rosa; *P. aeruginosa* - inibido/ n.a./ n.a.; *E. coli* - inibido/ n.a./ n.a.; ^c resposta em EMBA (crescimento/ cor da colónia/ cor do meio em torno da colónia): *S. aureus* - parcialmente inibido/ n.a./ n.a.; *S. epidermidis* - parcialmente inibido/ n.a./ n.a.; *P. aeruginosa* - bom/ púrpura / n.a.; *E. coli* - bom/ verde metálico/ n.a.

À semelhança do que foi efetuado para os *cuffs* de cateteres de HD, foi realizada a comparação dos métodos semi-quantitativos (*rolling* e sonicação pós-*rolling*). Tal como foi observado nas amostras de HD, a percentagem de *cuffs* a partir dos quais foram isolados microrganismos por o *rolling* (67%) foi superior à percentagem obtida por sonicação (33%).

Tabela 12- Detecção de microrganismos nos *cuffs* de cateteres de DP através de dois métodos de análise semi-quantitativa (*rolling* e sonicação pós-*rolling*)

		Rolling		
		>LD	< LD	
Sonicação pós-<i>rolling</i> (Nº total de <i>cuffs</i>)	> LD	4	0	4
	< LD	4	4	8
		8	4	12^a

LD – Limite de deteção; ^a número total de *cuffs* nos quais foram efetuados ambos os métodos de análise semi-quantitativa.

3.4 Análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento e por Espectroscopia de Energia Dispersiva de raios-X

Como nos extensores de DP a percentagem de recuperação de microrganismos foi reduzida em comparação com a observada nos cateteres de DP (item 3.3.3 vs. 3.3.4), foi efetuado um estudo preliminar que envolveu a análise por MEV e por EDS da superfície de duas amostras de extensores nas quais não foram detetados microrganismos e que foram selecionadas aleatoriamente.

Na Figura 6 estão apresentadas as imagens obtidas por MEV e os espectros relativos à análise da composição elementar por EDS da superfície intraluminal dos controlos (extensores não usados). As observações efetuadas mostraram a superfície dos extensores (Figura 6A e 6B), revelando a presença de estrias numa das amostras (Figura 6A). Adicionalmente, os espectros

obtidos por EDS (Figura 6C e 6D) revelaram a presença de carbono, oxigénio e silício (elementos constituintes do silicone).

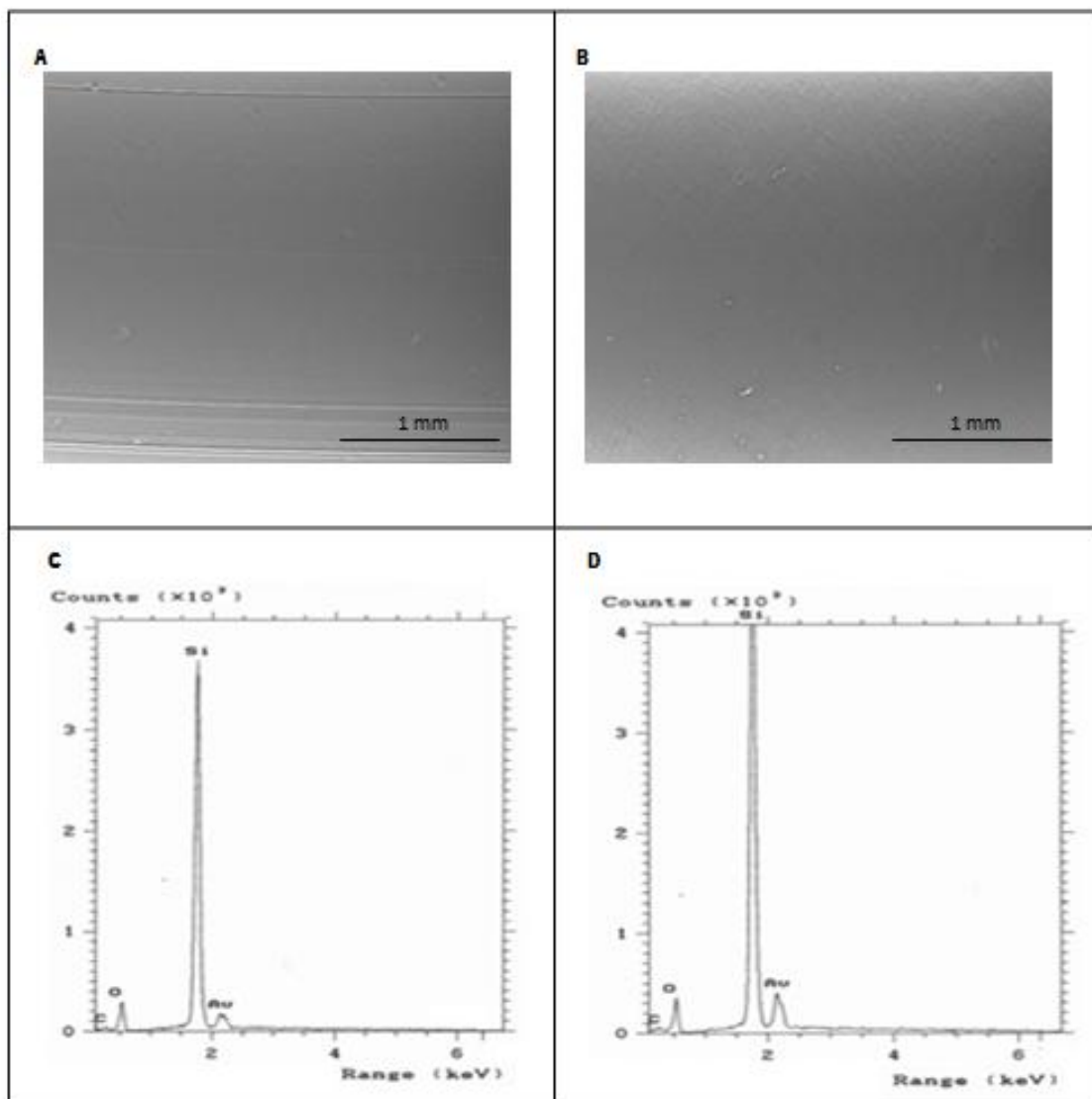


Figura 6 – Imagens de MEV representativas da superfície intraluminal da marca A (A) e da marca B (B) e respetiva composição elementar (C) e (D) analisada por EDS. O ouro detetado nas amostras corresponde ao revestimento usado para análise. yy: 0 - 4 x 10³ counts.

Relativamente à análise dos extensores removidos de pacientes, as imagens da superfície intraluminal adquiridas por MEV, e os respetivos espetros obtidos por EDS estão apresentados na Figura 7. Como se pode observar, a superfície de ambas as amostras revela a presença de um filme amorfo e homogéneo (Figuras 7A e 7B). No entanto, para ampliações inferiores a 100 μm não foi possível distinguir microrganismos na superfície das secções analisadas (dados não mostrados). Em relação aos espetros obtidos da análise por EDS (Figuras 7C e 7D), estes revelaram a presença de carbono, oxigénio, silício, cloro e cálcio.

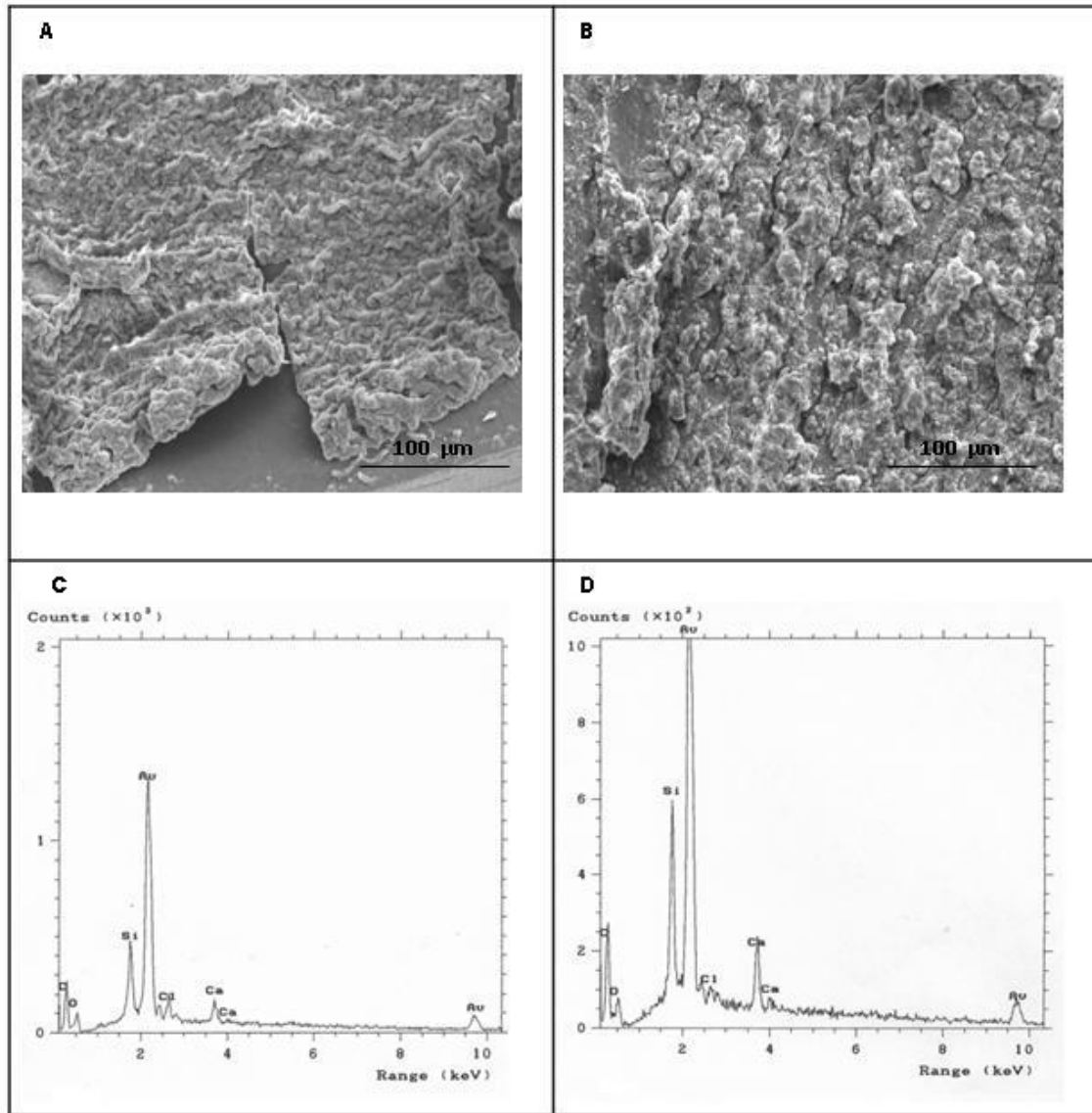


Figura 7- Imagens de MEV representativas da superfície intraluminal da amostra 5 (A) e da amostra 6 (B) e respetiva composição elementar (C) e (D) analisada por EDS. O ouro detetado nas amostras corresponde ao revestimento usado para análise. yy: 0 - 4 x 10³ counts.

4 Discussão

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como objetivo principal a investigação de biofilmes microbianos em cateteres de DP, com recurso a métodos de cultura microbiológica e de identificação microbiana.

Como evidenciado no Capítulo 1 (Tabela 3) são vários os métodos utilizados para a recuperação de microrganismos dos extensores e diferentes elementos dos cateteres de DP, embora não seja claro qual o método mais indicado. Consequentemente, neste trabalho a seleção dos métodos utilizados baseou-se essencialmente nos previamente descritos e nos utilizados em cateteres de HD. Estudos anteriores que envolveram a análise microbiológica em cateteres de DP (Tabela 3) expressam os seus resultados em termos qualitativos e, em alguns casos, em termos quantitativos, isto é, é indicado o número de microrganismos cultiváveis identificados. No entanto, é notar que em apenas um destes estudos (Tabela 3) foi avaliada a metodologia de recuperação, utilizando cateteres contaminados *in vitro*, tendo sido sugerido que o método utilizado (escovagem) é semi-quantitativo (Verger *et al.* 1987). Desta forma, pareceu relevante efetuar a avaliação dos métodos selecionados em termos da sua capacidade de detetar e recuperar os microrganismos. Para tal, procedeu-se à execução desses métodos em cateteres contaminados *in vitro* e em cateteres de HD removidos de pacientes, onde a presença de biofilme é amplamente reconhecida (Marcus *et al.* 2008). Para a avaliação da descontaminação da superfície extraluminal dos cateteres foram usados extensores de DP removidos de pacientes.

Neste estudo foi mostrado que as diferentes metodologias de recuperação microbiana - raspagem, *rolling* e sonicação - são válidas para a semi-quantificação e deteção de microrganismos em cateteres (item 3.2.2).

Primeiro, em relação aos extensores e segmentos externos, como a sua superfície extraluminal está em contacto com a flora da pele (Figura 2), podendo representar uma fonte de contaminação, considerou-se necessário efetuar um passo de descontaminação. Neste caso específico foi observado que o método utilizado é eficaz na eliminação de microrganismos cultiváveis em mais de 80% das amostras (item 3.2.2.1). Apesar de estes resultados inviabilizarem a recuperação do biofilme intraluminal por metodologias como por exemplo a sonicação, foi mostrado que esta pode ser efetuada por raspagem. De facto, a passagem consecutiva de um bisturi pela superfície intraluminal minimiza o contacto com a superfície

extraluminal e, com um operador treinado, limita a contaminação com microrganismos que eventualmente permaneçam na superfície extraluminal (item 3.2.2.1). Por outro lado, foi também mostrado neste trabalho que a recuperação de microrganismos da superfície intraluminal por raspagem é um método semi-quantitativo, dado que não permite recuperar a totalidade dos microrganismos, como demonstrado nos ensaios de recuperação efetuados em extensores contaminados *in vitro* (Figura 5).

Relativamente à análise dos *cuffs* (Figura 2), foram realizados dois métodos de análise semi-quantitativa, o *rolling* e a sonicação pós-*rolling* (item 3.2.2.2), que têm sido testados em segmentos internos de cateteres de HD (Sherertz *et al.* 1997, Slobbe *et al.* 2009). No presente trabalho, a combinação dos dois métodos semi-quantitativos permitiu a recuperação de microrganismos em 73% das amostras de HD analisadas (Tabela 5). Comparando os métodos entre si verificou-se que o *rolling* permitiu a deteção de microrganismos em todos os *cuffs* em que foram observadas culturas positivas, ao passo que a sonicação pós-*rolling* permitiu isolar microrganismos em 80% das amostras (item 3.2.2.2). Especificando os métodos semi-quantitativos, de acordo com Sherertz *et al.* (1997) e Slobbe *et al.* (2009), numa análise realizada em cateteres de HD, o *rolling* efetuado como primeira técnica parece reduzir a sensibilidade de deteção de uma cultura positiva por sonicação pós-*rolling*. No entanto, o limite de deteção da sonicação pós-*rolling* (50 UFC/*cuff*) é superior ao do *rolling* (1 UFC/*cuff*). Portanto, como ainda não existe consenso na literatura sobre o método mais indicado para a análise dos *cuffs*, foram mantidos os dois métodos semi-quantitativos.

Em relação à análise dos segmentos intraperitoneais, são vários os métodos utilizados em estudos anteriores para a sua análise, sendo a raspagem o mais comum (Tabela 3). Tendo em conta que o segmento intraperitoneal apresenta furos laterais (Figura 2), deixa de ser relevante efetuar a recuperação de microrganismos da superfície extra e intraluminal separadamente. A recuperação por sonicação, que tem sido usada em vários estudos com cateteres de HD (Raad *et al.* 1993, Sherertz *et al.* 1997, Raad *et al.* 2007, Slobbe *et al.* 2009), é um método que permite a recuperação simultânea dos microrganismos aderidos a ambas as superfícies. Neste trabalho a sonicação foi efetuada pela primeira vez nos segmentos intraperitoneais de cateteres de DP. Através da sonicação dos segmentos internos de HD foi possível verificar que este método permite recuperar microrganismos das superfícies dos cateteres (item 3.2.2.3).

Paralelamente à análise semi-quantitativa, que permite obter uma estimativa da densidade celular (Bonkat *et al.* 2011), foi efetuada a análise qualitativa com o objetivo de detetar culturas positivas em amostras cuja análise semi-quantitativa se encontre abaixo do limite de deteção do respetivo método. Assim sendo, nos diferentes elementos de cateter de HD analisados foi verificado que o método qualitativo permite a deteção de culturas positivas num maior número de amostras comparativamente com os métodos semi-quantitativos (itens 3.2.2.1 – 3.2.2.3). Deste modo, o método qualitativo confere maior sensibilidade ao método microbiológico e, por isso, foi mantido na análise de cateteres de DP.

Como revisto no Capítulo 1 (item 1.3.1.3), os métodos com base em meios seletivos e diferenciais foram usados em estudos anteriores para a identificação de microrganismos recuperados de cateteres de DP. Contudo, nos casos dos microrganismos recuperados das amostras analisadas neste trabalho, é necessário notar que os meios usados (MSA e EMBA) nem sempre forneceram informações concretas quanto à identificação das espécies isoladas, isto é, apenas indicaram se os microrganismos eram *Staphylococcus* coagulase-positivos ou – negativos ou bactérias Gram-negativas fermentadoras ou não fermentadoras de lactose. Adicionalmente, em alguns isolados foram obtidas informações incorretas quanto à sua identificação presuntiva. Por exemplo, espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas como *S. capitis* (amostras 85 e 95) (Tabela 8) e *S. haemolyticus* (amostras 39 e 57) (Tabela 10) foram presuntivamente identificadas como *Staphylococcus* coagulase-positivas, o que foi também descrito por outros autores (Merlino *et al.* 2000, Shittu *et al.* 2006). Portanto, torna-se necessário recorrer a métodos que forneçam a identificação definitiva das espécies isoladas. Neste caso específico, foi usado MALDI-TOF MS, método nunca antes usado na identificação de microrganismos recuperados de cateteres de DP. Este método permitiu a identificação de 8% dos isolados de extensores ao nível do género (1 género) e 50% ao nível da espécie (7 espécies) (Tabela 8); 17% dos isolados de cateteres permanentes ao nível do género (3 géneros) e 51% ao nível da espécie (4 espécies) (Tabela 10); 100% dos isolados de efluente ao nível da espécie (5 espécies) (Tabela 6); e 75% dos isolados do orifício de saída ao nível da espécie (3 espécies) (Tabela 7).

Uma vez mostrado que os métodos de recuperação microbiana são válidos, estes foram aplicados para a análise microbiológica dos extensores e dos diferentes elementos dos cateteres de DP recolhidos na população em estudo.

Em relação aos extensores (item 3.3.3), que foram removidos por rotina, 34% apresentaram culturas positivas na superfície intraluminal. No entanto, é de notar que a densidade celular observada nestes segmentos foi sempre inferior a 3000 UCF (Tabela 8). Até à data, Verger *et al.* (1987) foram os únicos autores a investigar biofilmes em extensores de DP, não tendo detetado culturas microbianas positivas em nenhuma das amostras. Esta diferença de resultados pode estar associada ao facto de o número de amostras processadas em ambos os trabalhos ser muito diferente [55 neste trabalho *vs.* 17 (Verger *et al.* 1987)] e às diferentes metodologias de recuperação microbiana utilizadas.

Com base nos resultados da identificação dos microrganismos isolados dos extensores, é possível verificar que a maioria das amostras apresentou culturas mono-microbianas. As bactérias Gram-positivas foram as predominantemente identificadas, sendo *S. epidermidis* a espécie mais frequentemente identificada (Tabela 8). Das bactérias Gram-negativas, as espécies predominantemente identificadas foram *P. aeruginosa* e as do género de *Sphingomonas* (Tabela 8). No entanto, uma elevada percentagem de isolados não foi identificada por MALDI-TOF MS neste grupo de amostras (42%). Com base nos meios seletivos e diferenciais usados, 40% destes microrganismos foram presuntivamente identificados como *Staphylococcus*, 40% como bactérias Gram-negativas e 20% não foram identificados (Tabela 9). Tendo em conta as amostras cujos isolados foram identificados definitivamente, foram observadas culturas polimicrobianas constituídas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em duas amostras (Tabela 8). Por outro lado, cruzando os resultados da identificação por MALDI-TOF MS (Tabela 8) com os resultados da identificação presuntiva (Tabela 9), existe a possibilidade de haver uma amostra colonizada por espécies diferentes (amostra 49), dado que um dos isolados foi identificado como *S. epidermidis* e o outro não cresceu em nenhum dos meios seletivos e diferenciais usados para a identificação presuntiva (MSA e EMBA).

Analisando os resultados da análise microbiológica de cateteres de DP efetuada em estudos anteriores (Tabela 3), as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, *S. aureus* e *P. aeruginosa* fazem parte do conjunto de espécies geralmente isoladas, o que explica o facto de terem sido identificadas no conjunto de amostras analisadas neste trabalho. Em casos mais

esporádicos também foram identificadas espécies de *Micrococcus* em amostras de cateteres (Gorman *et al.* 1994, Pihl *et al.* 2012), tal como foi observado neste trabalho. Em relação às bactérias Gram-negativas *Sphingomonas*, *D. acidovorans*, *H. huttiense* identificadas neste estudo, não se conhecem registos de casos em que estas tenham sido isoladas a partir de cateteres de DP. No entanto, estão documentados casos na literatura relativos à deteção de *S. paucimobilis* (Dervisoglu *et al.* 2008, Tambawala *et al.* 2011) e de *D. acidovorans*, também designada por *Comamonas acidovorans* (Lopez-Menchero *et al.* 1998, Schoenmaeckers *et al.* 2011, Song *et al.* 2011) em efluentes de DP recolhidos de pacientes com peritonite e em zaragatoas do orifício de saída de pacientes com IOS. Isto sugere que estas espécies também são agentes patogénicos responsáveis pelas infeções em pacientes em DP, embora em situações menos frequentes.

Como referido, a incidência de biofilme microbiano neste grupo de amostras foi reduzida. Contudo, a presença de matéria amorfa nos extensores foi frequentemente visível (não mostrado). No sentido de obter uma melhor caracterização destes biofilmes foi realizado um estudo preliminar no qual foi efetuada a análise por MEV e por EDS da superfície intraluminal de extensores em que não foram observadas culturas microbianas positivas (item 3.4). Para a preparação das amostras não foi efetuada a fixação uma vez que este processo envolve a utilização de químicos que tendem a reagir com as SPE, podendo alterar a estrutura do biofilme (Simoes *et al.* 2007). Nas secções das amostras analisadas (Figura 7A e B) foi possível observar a presença de um biofilme amorfo. À semelhança do que foi observado neste trabalho, outros autores detetaram por MEV a presença de biofilmes em cateteres em que não foram observadas culturas positivas pelos métodos de análise microbiológica (Verger *et al.* 1987). No entanto, enquanto Verger *et al.* (1987) descreveram a presença de bactérias em forma de cocos e de bacilos em algumas amostras, podendo-se tratar de microrganismos não cultiváveis ou não viáveis, neste trabalho não foi possível observar microrganismos em nenhuma das secções analisadas. A utilização de EDS para a análise da composição elementar da superfície de biofilmes de DP foi descrita pela primeira vez neste trabalho. Esta análise (Figura 7C e D) revelou a presença de carbono, oxigénio, cloro, cálcio e silício. De facto, estes elementos foram previamente descritos em biofilmes de *stents* urinários (Reid *et al.* 1994, Tieszer *et al.* 1998). Tendo em conta que a urina contém minerais de carbono, oxigénio, cloro e cálcio, os resultados de Reid *et al.* (1994) e de Tieszer *et al.* (1998) sugerem que os elementos detetados podem resultar da adsorção destes minerais à superfície dos dispositivos. De igual forma, a presença

dos elementos detetados na superfície intraluminal dos extensores usados pode ter resultado da adsorção de compostos de carbono, oxigénio, cloro e cálcio constituintes das soluções de diálise/efluentes (Kee *et al.* 2008). Quanto ao silício, este elemento faz parte da composição do extensor (silicone, Figura 2). Contudo, devido ao facto de terem sido analisadas apenas duas amostras, torna-se necessário alargar a amostragem e efetuar estudos mais aprofundados para perceber qual a origem destes elementos.

Em relação aos cateteres permanentes de DP (item 3.3.4), que foram removidos por indicação clínica, foram observadas culturas positivas em 100% dos cateteres (80% dos segmentos externos, 67% dos *cuffs* intermédios, 60% dos *cuffs* internos e 70% dos segmentos intraperitoneais) pelo método semi-quantitativo e/ou qualitativo (Tabela 10). Relativamente aos resultados da semi-quantificação, de uma forma geral foi observada maior densidade celular nos *cuffs* (interno e intermédio), do que nos segmentos externos e intraperitoneais. Especificamente, para a amostra 57, a densidade celular nos *cuffs* foi superior a 300 UFC/*cuff* ao passo que no segmento externo não foram observados microrganismos pelo método semi-quantitativo. Nas amostras 58, 90 e 116, a densidade celular nos *cuffs* variou entre 1 e 300 UFC/*cuff*, ao passo que nos respetivos segmentos intraperitoneais só foi possível a deteção de microrganismos pelo método qualitativo. É possível notar ainda que a densidade celular do *cuff* intermédio da amostra 58 e do *cuff* interno da amostra 90 variou entre 50 e 15000 UFC/*cuff*, ao passo que nos respetivos segmentos externos a densidade celular foi inferior a 3000 UFC e a 300 UFC. À semelhança do que foi observado neste trabalho, Bayston *et al.* (1999) também reportou que, em geral, os *cuffs* apresentam maior colonização microbiana do que os restantes segmentos do respetivo cateter.

Adicionalmente, os métodos semi-quantitativos usados na análise dos *cuffs* (*rolling* e *sonicação pós-rolling*) mostraram ser complementares, uma vez que em algumas amostras foram isoladas espécies diferentes pelos dois métodos (Tabela 10).

Quanto à utilização do método qualitativo na análise dos extensores e dos diferentes elementos do cateter, comparando o número de amostras nas quais foram recuperados microrganismos através dos métodos semi-quantitativos com o número de amostras em que foram observadas culturas positivas pelo método qualitativo, é possível concluir que o método qualitativo foi importante para a deteção de microrganismos em quase metade das amostras de

extensor (Tabela 8) e em 22% dos elementos dos cateteres permanentes (Tabela 10), cuja densidade celular foi inferior ao limite de detecção dos métodos semi-quantitativos usados.

Em relação às espécies identificadas nos diferentes elementos dos cateteres, pode-se verificar que no caso dos segmentos externos a maior parte destas amostras apresentaram apenas uma única espécie microbiana, tendo sido as bactérias Gram-positivas as maioritariamente isoladas (*S. epidermidis* e *S. haemolyticus*) (Tabela 10). Por outro lado, as bactérias Gram-negativas detetadas nos segmentos externos foram espécies do género *Sphingomonas* e *P. aeruginosa* (Tabela 10). Dos isolados não identificados por MALDI-TOF MS (25%), a maioria (67%) foi presuntivamente identificada como bactérias Gram-positivas (Tabela 11), reforçando a importância das bactérias Gram-positivas na colonização do segmento externo. Em estudos desenvolvidos por outros autores (Dasgupta *et al.* 1986, Dasgupta *et al.* 1987, Bayston *et al.* 1999, Pihl *et al.* 2012) também foram recuperadas dos segmentos externos as bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* (Tabela 3), embora a identificação de *S. haemolyticus* e de bactérias do género *Sphingomonas* não tenham sido descritas até à data. Com base nos resultados obtidos a partir de MALDI-TOF MS, em duas amostras foram observadas culturas polimicrobianas, uma constituída por uma combinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a outra por bactérias Gram-negativas (amostras 90 e 105, respetivamente Tabela 10). Nos estudos de Dasgupta *et al.* (1986) e Pihl *et al.* (2012) foram descritas culturas polimicrobianas em segmentos externos em percentagens inferiores à obtida neste trabalho [5% (Dasgupta *et al.* 1986) e 6% (Pihl *et al.* 2012)].

No caso dos *cuffs*, tal como foi verificado nos extensores e nos segmentos externos, observou-se que a maioria dos microrganismos identificados corresponde a bactérias Gram-positivas, nomeadamente *S. epidermidis* (Tabela 10). Por outro lado, *P. aeruginosa* foi a única bactéria Gram-negativa detetada nestas amostras (Tabela 10). Dos 32% dos isolados não identificados por MALDI-TOF MS, 67% foram presuntivamente identificados como bactérias Gram-positivas (Tabela 11). À semelhança do que foi observado neste trabalho, Bayston *et al.* (1999) identificaram *P. aeruginosa* e espécies de *Corynebacterium* em *cuffs* de DP (15% e 4%, respetivamente). Contudo, não se encontra descrito na literatura o isolamento de *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*/ *S. caprae* e *M. luteus* nestes elementos, ao contrário do que se verificou neste trabalho. A maior parte dos *cuffs* colonizados apresentou culturas monomicrobianas (Tabela 10). No entanto, e em relação às amostras cujos isolados foram identificados por MALDI-TOF MS, foi possível observar culturas polimicrobianas em duas

amostras, uma constituída por uma combinação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e a outra por bactérias Gram-positivas (*cuffs* intermédio e interno da amostra 57, respetivamente, Tabela 10). Adicionalmente, existe a possibilidade de haver mais duas amostras (amostra 116 - *cuff* intermédio e interno, Tabela 11) nas quais foram co-isoladas diferentes espécies de acordo com a identificação presuntiva. No estudo de Rodriguez-Carmona *et al.* (2000) foram também descritas culturas polimicrobianas em *cuffs* numa percentagem de amostras próxima à observada neste trabalho (15%).

Quanto aos segmentos intraperitoneais, apenas foram observadas bactérias Gram-positivas e com maior incidência de *S. epidermidis* (Tabela 10). No entanto, uma elevada percentagem de isolados não foi identificada nestes elementos do cateter (40%). Através dos meios seletivos e diferenciais usados, 50% destes microrganismos foram presuntivamente identificados como bactérias Gram-positivas e 50% não foram identificados (Tabela 11). Em relação às espécies *Staphylococcus* coagulase-negativa, nomeadamente *S. epidermidis*, estas foram identificadas na maioria dos estudos em que foi efetuada a análise microbiológica a segmentos intraperitoneais de cateteres de DP (Marrie *et al.* 1983, Dasgupta *et al.* 1986, Dasgupta *et al.* 1987, Gorman *et al.* 1993, Gorman *et al.* 1994, Rodriguez-Carmona *et al.* 2000, Pihl *et al.* 2012) (Tabela 3). No caso das bactérias do género *Corynebacterium*, estas foram detetadas em segmentos intraperitoneais em situações mais esporádicas: 4% (Bayston *et al.* 1999) e 6% (Pihl *et al.* 2012), em paralelo com o que foi observado neste trabalho. Com base apenas nos segmentos cujos isolados foram todos identificados, em nenhuma das amostras foram observadas culturas polimicrobianas. No entanto, existe a possibilidade de haver duas amostras com culturas polimicrobianas (amostras 57 e 116, Tabela 11). Especificamente, em ambas as amostras um isolado foi presuntivamente identificado como *Staphylococcus* o outro não obteve identificação presuntiva. Em geral, a percentagem de culturas polimicrobianas é variável, como se pode constatar nos estudos de Dasgupta *et al.* (1986), Gorman *et al.* (1994), Rodriguez-Carmona *et al.* (2000) e Pihl *et al.* (2012) nos quais foram observadas culturas polimicrobianas em 5%, 41%, 6% e 12% dos segmentos intraperitoneais de cateteres de DP.

De acordo com o descrito sobre as vias de entrada dos principais agentes patogénicos (revisito no item 1.1.2.3), as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, *S. aureus* e *P. aeruginosa* podem entrar no cateter pela via transluminal (Figura 3), o que pode estar relacionado com o facto de estas terem sido detetadas na superfície intraluminal dos extensores

(Tabela 8) e dos segmentos externos (Tabela 10) analisados. Adicionalmente as bactérias *Staphylococcus* coagulase-positivas e *P. aeruginosa* também podem entrar no orifício de saída e no túnel do cateter pela via periluminal (Figura 3), o que vai de encontro às observações efetuadas nos *cuffs* (Tabela 10). Porém, de acordo com as observações efetuadas na sequência deste trabalho (Tabelas 8 e 10), outras espécies de origem ambiental, tais como *M. luteus*, *Sphingomonas*, *D. acidovorans* e *H. huttiense* (Kocur *et al.* 1992, Tambawala *et al.* 2011, Lopez-Menchero *et al.* 1998, Surhone *et al.* 2011) podem aceder ao cateter, por exemplo, pela via transluminal; e espécies de *Corynebacterium* podem aceder ao túnel, entrando pela via periluminal.

Resumidamente, nos extensores e em todos os segmentos do cateter permanente analisados foram maioritariamente identificadas bactérias Gram-positivas, com predomínio de *Staphylococcus* coagulase-negativas. Adicionalmente, a maioria dos isolados não identificados por MALDI-TOF MS foram presuntivamente identificados como bactérias Gram-positivas. Portanto, estes resultados reforçam a importância das bactérias Gram-positivas na colonização de extensores e cateteres, e isto é importante na medida em que o conhecimento dos microrganismos que estão envolvidos na colonização é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção de formação de biofilme. Adicionalmente, dada a alta densidade celular observada nos *cuffs*, seria também importante definir estratégias de prevenção da adesão microbiana nestes elementos do cateter.

Além da investigação de biofilmes microbianos em cateteres de DP, foi efetuada a análise de espécies microbianas responsáveis pelas infeções (peritonites e IOS).

Para a investigação de microrganismos associados à peritonite, foi efetuada a análise de efluentes recolhidos de pacientes com esta infeção. De todos os efluentes analisados, só foi possível quantificar os microrganismos das amostras transportadas em frascos estéreis ($n=2$), cuja densidade celular foi baixa (1 e 14 UFC/mL) (Tabela 6). Em relação ao método qualitativo, este foi a única forma possível para a investigação de espécies presentes em amostras recolhidas em frascos Bactec plus aerobic/F ($n=4$) (Tabela 6). Nos efluentes, todas as espécies obtidas foram identificadas, com predomínio de bactérias Gram-positivas, nomeadamente *S. aureus* (Tabela 6), que possivelmente acederam à cavidade peritoneal através das vias transluminal e/ou periluminal (Li *et al.* 2010). Entre as bactérias Gram-negativas, foi identificada uma espécie que não se encontra frequentemente referenciada como agente responsável pelas

peritonites - *P. rettgeri* (Tabela 6) (von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001, Fried e Piraino 2009, Li *et al.* 2010). No entanto, existem relatos na literatura de casos esporádicos de peritonite associada a *P. rettgeri*, embora em associação com outros microrganismos (Gloor *et al.* 2003, Atalay *et al.* 2010), ao passo que neste trabalho esta foi a única espécie isolada na amostra. Dado que esta a bactéria pertence à flora intestinal, a infeção provavelmente terá resultado da entrada desta espécie para a cavidade peritoneal através da via transmural (Atalay *et al.* 2010). Em apenas um caso (amostra 48, Tabela 6) foi observada uma cultura polimicrobiana causada por *S. aureus* e *P. aeruginosa*. De notar que a percentagem de peritonites polimicrobianas observada neste estudo está em concordância com a indicada na literatura (< 25%) (Vargemezis e Thodis 2001) apesar de ter sido analisado um pequeno conjunto de amostras. De acordo com vários estudos de revisão, a maioria das espécies identificadas fazem parte do grupo dos principais microrganismos responsáveis pelas peritonites em DP (von Graevenitz e Amsterdam 1992, Vargemezis e Thodis 2001, Fried e Piraino 2009, Li *et al.* 2010).

Para a investigação das espécies associadas às IOS, foi efetuada a análise a zaragatoas recolhidas do orifício de saída de pacientes com esta infeção. Através da análise semi-quantitativa avaliada no item 3.2.1, foi possível isolar microrganismos de todas as zaragatoas, tendo a densidade celular variado entre 1500 e 150000 UFC/zaragatoa (Tabela 7). De acordo com os resultados da identificação por MALDI-TOF MS, as espécies de *Staphylococcus* foram os principais agentes responsáveis pelas IOS na população estudada. Uma vez que estas bactérias pertencem à flora da pele, a contaminação do orifício de saída pode ter resultado da entrada destas bactérias pela via periluminal (Li *et al.* 2010). Adicionalmente, foi observada uma cultura polimicrobiana constituída por *E. coli* (Tabela 7) e por uma espécie presuntivamente identificada como *Staphylococcus* coagulase-negativa. Quanto à bactéria *E. coli*, a contaminação do orifício de saída pode ocorrer, por exemplo, através do toque quando esta espécie está presente nas mãos (von Graevenitz e Amsterdam 1992, Li *et al.* 2010). Como revisto em algumas publicações (Luzar 1991, von Graevenitz e Amsterdam 1992) as bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* são as principais responsáveis pelas IOS, tal como foi observado neste trabalho.

Sinteticamente, o MALDI-TOF MS permitiu a identificação da maioria dos isolados obtidos das diferentes amostras recolhidas de pacientes em DP. No entanto, 42% dos isolados de extensores (Tabela 8), 32% dos isolados de cateteres permanentes (Tabela 10) e 25% dos

isolados do orifício de saída (Tabela 7) não foram identificados por MALDI-TOF MS. Logo, estes dados mostram que são necessários outros métodos que permitam a identificação de microrganismos associados a amostras de DP. Por exemplo, a técnica de *Fluorescent In-Situ Hybridization* permite avaliar a presença de microrganismos específicos em biofilmes através de sondas marcadas com fluorescência que hibridam com as suas sequências complementares presentes nos ribossomas, podendo inclusive detetar simultaneamente dois ou mais microrganismos presentes na amostra (Moter *et al.* 2010, Hall-Stoodley *et al.* 2012). A eficácia deste método foi mostrada por Larsen *et al.* (2008) na identificação de bactérias associadas a cateteres venosos centrais não identificadas por métodos convencionais, e por Peters *et al.* (2006) na identificação de mais de 90% dos isolados em frascos de cultura BACTEC. Adicionalmente, esta técnica permite a deteção e identificação de microrganismos não cultiváveis, o que seria uma nova abordagem no estudo dos cateteres de DP (Waar *et al.* 2005). Por outro lado, a PCR permite a identificação de microrganismos por amplificação de sequências específicas de DNA, sendo a elevada sensibilidade uma das principais vantagens deste método (Schwartz 2002). A eficácia deste método foi mostrada, por exemplo, por Warwick *et al.* (2004) para a identificação de bactérias em todas as amostras de sangue recolhidas de pacientes com infeção associada a cateter venoso central, por amplificação do gene 16S rDNA. Apesar das vantagens destes métodos, Pihl *et al.* (2012) foram os únicos a usar métodos moleculares para a identificação de microrganismos associados a cateteres de DP.

5.1 Conclusões

A presente dissertação centrou-se na semi-quantificação, isolamento e identificação com recurso a meios seletivos e diferenciais e MALDI-TOF MS de microrganismos associados a extensores e a cateteres permanentes de DP. Adicionalmente, foi efetuada a (semi-) quantificação e identificação de microrganismos responsáveis pelas peritonites e pelas IOS na população em estudo. Em resumo, as principais conclusões derivadas do trabalho experimental realizado são as seguintes:

- 1) As metodologias de recuperação de microrganismos utilizadas apenas permitem a semi-quantificação e/ou deteção dos microrganismos em zaragatoas do orifício de saída, extensores e cateteres permanentes de DP.
- 2) Foram detetados e identificados pela primeira vez microrganismos associados a biofilmes formados na superfície intraluminal de extensores de DP (34% das amostras). De uma forma geral, através da análise semi-quantitativa foi possível verificar que por extensor a densidade celular variou entre 10 e 300 UFC. As bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas e *P. aeruginosa* foram as espécies predominantemente identificadas nestas amostras.
- 3) No caso dos segmentos externos dos cateteres permanentes, a análise semi-quantitativa revelou densidades celulares que variaram entre 10 e 300 UFC/segmento (28%), 300 a 3000 UFC/ segmento (14%) e mais de 3000 UFC/ segmento (28%). Quanto aos *cuffs*, através do *rolling* e a sonicação pós-*rolling* observaram-se entre 1 e 300 UFC/ *cuff* e entre 50 e 15000 UFC/ *cuff* para a maioria das amostras (43% e 29%, respetivamente). Para um menor número de amostras, o *rolling* e a sonicação pós-*rolling* permitiram isolar mais de 300 UFC/ *cuff* e mais de 15000 UFC/ *cuff* em 28% e 14% das amostras, respetivamente. No caso dos segmentos intraperitoneais, nas amostras em que foram observadas culturas positivas pelo método semi-quantitativo (28%), a densidade celular variou entre 100 a 30000 UFC/ segmento. Em geral, a densidade celular nos *cuffs* foi superior à dos segmentos externos e intraperitoneais do respetivo cateter. As bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas

e *P. aeruginosa* foram as espécies predominantemente identificadas nos cateteres permanentes.

- 4) Nos extensores e nos cateteres permanentes foram identificadas espécies microbianas que não foram detetadas em amostras de DP analisadas em estudos anteriores, tais como *Sphingomonas*, *D. acidovorans*, *H. huttiense*.
- 5) Nos efluentes, recolhidos de pacientes com peritonite, as espécies do género *Staphylococcus* foram as predominantemente isoladas, apesar de ter sido identificada uma espécie raramente associada a peritonites, a *P. rettgeri*.
- 6) Nas zaragatoas do orifício de saída, recolhidas de pacientes com IOS, as espécies do género *Staphylococcus* foram as predominantemente isoladas.
- 7) O MALDI-TOF MS foi usado pela primeira vez para a identificação de microrganismos associados a amostras de DP. Este método possibilitou a identificação definitiva de todos os isolados obtidos dos efluentes e da maior parte dos isolados do orifício de saída e dos cateteres de DP.

5.2 Sugestões de trabalho

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, são apresentadas de seguida algumas sugestões para futuros trabalhos de investigação. A saber,

- 1) Determinar e comparar a eficiência de recuperação microbiana de várias metodologias aplicadas em cateteres de DP (raspagem, *rolling*, sonicação, aspiração, escovagem e passagem de zaragatoas).
- 2) Identificar os microrganismos associados a cateteres de DP com recurso a métodos moleculares, tais como a *Fluorescent In-Situ Hybridization* e a PCR.

- 3) Averiguar a presença de biofilmes e/ou de microrganismos não cultiváveis nos cateteres através de métodos microscópios. Comparar a morfologia dos biofilmes em cateteres com cultura microbiológica positiva *vs.* negativa.
- 4) Caracterizar a composição bioquímica do filme condicionador dos segmentos reservados, por exemplo, com recurso à espectrometria de massa.
- 5) Determinar a origem dos elementos adsorvidos na superfície dos extensores e dos cateteres permanentes. Por exemplo, através de EDS é possível averiguar se estes têm origem nas soluções, por comparação dos elementos detetados nas amostras previamente condicionadas com solução de diálise ou com EADP com os detetados nas amostras não condicionadas.
- 6) Avaliar o efeito dos constituintes do filme condicionador na adesão microbiana.

6 Bibliografia

- Akpolat, T. (2009) Tuberculous peritonitis. *Perit Dial Int*, 29: S166-9.
- al-Wali, W., R. Baillod, J. M. Hamilton-Miller & W. Brumfitt (1990) Detective work in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Infect*, 20: 151-4.
- Almeras, C. & A. Argiles (2009) The general picture of uremia. *Semin Dial*, 22: 329-33.
- Anhalt, J. P. & C. Fenselau (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem*, 47: 219-25.
- Appelbaum, P. C., Beckwith, D.G., Dipersio, J.R., Dyke, J.W., Salventi, J.F., Stone, L.L. (1983) Enhanced detection of bacteremia with a new BACTEC resin blood culture medium. *J Clin Microbiol*, 17: 48-51.
- Archer, N. K., M. J. Mazaitis, J. W. Costerton, J. G. Leid, M. E. Powers & M. E. Shirtliff (2011) *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2: 445-59.
- Ash, S. R. (1990) Chronic peritoneal dialysis catheters: effects of catheter design, materials, and location. *Semin Dial*, 3: 39-46.
- Ash, S.R. (2004) Peritoneal access and its complications. Replacement of renal function by dialysis. W. H. Hörl, K. M. Koch, R. M. Lindsay, C. Ronco & J. F. Winchester (eds.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 5th edition, 231-58.
- Atalay, H., I. Guney, Y. Solak & E. Almaz (2010) First case of CAPD-related peritonitis caused by *Morganella morganii*. *Perit Dial Int*, 30: 119-21.
- Barretti, P., A. C. Montelli, J. E. Batalha, J. C. Caramori & L. Cunha Mde (2009) The role of virulence factors in the outcome of staphylococcal peritonitis in CAPD patients. *BMC Infect Dis*, 9: 212.
- Bayston, R., M. Andrews, K. Rigg & A. Shelton (1999) Recurrent infection and catheter loss in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 19: 550-5.

- Bayston, R., L. E. Fisher & K. Weber (2009) An antimicrobial modified silicone peritoneal catheter with activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biomaterials*, 30: 3167-73.
- Bonkat, G., M. Rieken, C. A. Rentsch, S. Wyler, A. Feike, J. Schafer, T. Gasser, A. Trampuz, A. Bachmann & A. F. Widmer (2011) Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication. *World J Urol*, 29: 133-8.
- Brading, M. G., J. Jass & H. M. Lappin-Scott (1995) Dynamics of bacterial biofilm formation. Microbial biofilms. H. M. Lappin-Scott & J. W. Costerton (eds.). Cambridge: Cambridge University Press, 1st edition, 46-63.
- Briefel, G. R. (2006) Chronic kidney disease. Principles of ambulatory medicine. N. H. Fiebach, D. E. Kern, P. A. Tack & R.C. Ziegelstein (eds.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 7th edition, 767-95.
- Brogden, K. A. (2002) Polymicrobial diseases of animals and humans. Polymicrobial diseases, K. A. Brogden & J. M. Guthmiller (eds.). Washington (DC): ASM Press, 1st edition, 3-20.
- Brum, S., A. Rodrigues, S. Rocha, M. J. Carvalho, C. Nogueira, C. Magalhaes, D. Mendonca & A. Cabrita (2010) Moncrief-Popovich technique is an advantageous method of peritoneal dialysis catheter implantation. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 3070-5.
- Bryers, J. D. (2008) Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng*, 100: 1-18.
- Burkart, J. (2009) The future of peritoneal dialysis in the United States: optimizing its use. *Clin J Am Soc Nephrol*, 4: S125-31.
- Carbonnelle, E., C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J. L. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann & X. Nassif (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*, 44: 104-9.
- Chadha, V., F. S. Schaefer & B. A. Warady (2010) Dialysis-associated peritonitis in children. *Pediatr Nephrol*, 25: 425-40.
- Chaves, L. C. D. (2004) Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contacto com água potável. Tese de Mestrado. Departamento de Engenharia Biológica. Braga: Universidade do Minho.

- Conway, G. C., S. C. Smole, D. A. Sarracino, R. D. Arbeit & P. E. Leopold (2001) Phyloproteomics: species identification of *Enterobacteriaceae* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3: 103-12.
- Crabtree, J. H., R. J. Burchette, R. A. Siddiqi, I. T. Huen, L. L. Hadnott & A. Fishman (2003) The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int*, 23: 368-74.
- Croxatto, A., G. Prod'hom & G. Greub (2011) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 36: 380-407.
- Dasgupta, M., R. Ulan, K. Bettcher, V. Burns, K. Lam, J. Dossetor & C. JW. (1986) Effect of exit-site infection and peritonitis on the distribution of biofilm-encased adherent bacterial microcolonies (BABM) on Tenckhoff (T) catheters in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Advances in continuous ambulatory peritoneal Dialysis*. R. Khanna, K. Nolph, B. Prowant, Z. Twardowski & D. Oreopoulos (eds.). Toronto: University of Toronto Press, 102-9.
- Dasgupta, M. K. (1994) Silver peritoneal catheters reduce bacterial colonization. *Adv Perit Dial*, 10: 195-8.
- Dasgupta, M.K. (2002) Biofilms and infection in dialysis patients. *Semin Dial*, 15: 338-46.
- Dasgupta, M. K., K. B. Bettcher, R. A. Ulan, V. Burns, K. Lam, J. B. Oossetor & J. W. Costerton (1987) Relationship of adherent bacterial biofilms to peritonitis in chronic ambulatory peritoneal dialysis *Perit Dial Int*, 7: 168-73.
- Davies, D. (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2: 114-22.
- del Pozo, J. L. & R. Patel (2007) The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther*, 82: 204-9.
- Dervisoglu, E., M. Meric, B. Kalender & E. Sengul (2008) *Sphingomonas paucimobilis* peritonitis: a case report and literature review. *Perit Dial Int*, 28: 547-50.

- Diedrich, J. (2007) Laser-induced breakdown spectroscopy on bacterial samples. Master thesis. Physics. Michigan: Wayne State University.
- Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8: 881-90.
- Donlan, R. M. & J. W. Costerton (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15: 167-93.
- Dunne, W. M., Jr. (2002) Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15: 155-66.
- Edey, M., C. M. Hawley, S. P. McDonald, F. G. Brown, J. B. Rosman, K. J. Wiggins, K. M. Bannister & D. W. Johnson (2010) Enterococcal peritonitis in Australian peritoneal dialysis patients: predictors, treatment and outcomes in 116 cases. *Nephrol Dial Transplant*, 25: 1272-8.
- Finelli, A., L. L. Burrows, F. A. DiCosmo, V. DiTizio, S. Sinnadurai, D. G. Oreopoulos & A. E. Khoury (2002) Colonization-resistant antimicrobial-coated peritoneal dialysis catheters: evaluation in a newly developed rat model of persistent *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis. *Perit Dial Int*, 22: 27-31.
- Flemming, H. C. & J. Wingender (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8: 623-33.
- Flessner, M. F., X. Li, R. Potter & Z. He (2010) Foreign-body response to sterile catheters is variable over 20 weeks. *Adv Perit Dial*, 26: 101-4.
- Fong, I. W. (2008) Emerging issues and controversies in infectious disease - emerging infectious diseases of the 21st century. New York: Springer, 1st version.
- Fried, L. & B. Piraino (2009) Peritonitis. Nolph and Gokal's textbook of peritoneal dialysis. R. Khanna & R. T. Krediet (eds.). New York: Springer, 3rd edition, 543-70.
- Friedman, L. & R. Kolter (2004) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol*, 51: 675-90.
- Fung, L. C., A. E. Khoury, S. I. Vas, C. Smith, D. G. Oreopoulos & M. W. Mittelman (1996) Biocompatibility of silver-coated peritoneal dialysis catheter in a porcine model. *Perit Dial Int*, 16: 398-405.

- Giebel, R., C. Worden, S. M. Rust, G. T. Kleinheinz, M. Robbins & T. R. Sandrin (2010) Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol*, 71: 149-84.
- Gloor, H.J., S. Pandolfi & S. Rüttimann (2003) 20 years of peritoneal dialysis in a mid-sized Swiss hospital. *Swiss Med WKLY*, 133: 619-24.
- Gokal, R. (2000) Peritoneal dialysis. Prevention and control of infection. *Drugs Aging*, 17: 269-82.
- Gokal, R., S. Alexander, S. Ash, T. W. Chen, A. Danielson, C. Holmes, P. Joffe, J. Moncrief, K. Nichols, B. Piraino, B. Prowant, A. Slingeneyer, B. Stegmayr, Z. Twardowski & S. Vas (1998) Peritoneal catheters and exit-site practices toward optimum peritoneal access: 1998 update. *Perit Dial Int*, 18: 11-33.
- Gorman, S. P., C. G. Adair & W. M. Mawhinney (1994) Incidence and nature of peritoneal catheter biofilm determined by electron and confocal laser scanning microscopy. *Epidemiol Infect*, 112: 551-9.
- Gorman, S. P., D. S. Jones, W. M. Mawhinney, J. G. McGovern & C. G. Adair (1997) Conditioning fluid influences on the surface properties of silicone and polyurethane peritoneal catheters: implications for infection. *J Mater Sci Mater Med*, 8: 631-5.
- Gorman, S. P., W. M. Mawhinney, C. G. Adair & M. Issouckis (1993) Confocal laser scanning microscopy of peritoneal catheter surfaces. *J Med Microbiol*, 38: 411-7.
- Guerra e Silva, A., M. G. M. S. Lima, C. M. Takiya & L. R. Andrade (2011) Patient's cells colonize the biofilm of Tenckhoff catheters used in peritoneal dialysis. *Biofouling*, 27: 603-8.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton & P. Stoodley (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, 2: 95-108.
- Hall-Stoodley, L., P. Stoodley, S. Kathju, N. Hoiby, C. Moser, J. W. Costerton, A. Moter & T. Bjarnsholt (2012) Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65: 127-45.

- Heaf, J. G., H. Lokkegaard & M. Madsen (2002) Initial survival advantage of peritoneal dialysis relative to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 17: 112-7.
- Heimbürger, O. & P. G. Blake (2006) Apparatus for peritoneal dialysis. Handbook of dialysis. J. T. Daugirdas, P. G. Blake & T. S. Ing (eds.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 4th edition, 339-5.
- Herigstad, B., M. Hamilton & J. Heersink (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*, 44: 121-9.
- Hettick, J. M., B. J. Green, A. D. Buskirk, M. L. Kashon, J. E. Slaven, E. Janotka, F. M. Blachere, D. Schmechel & D. H. Beezhold (2008a) Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Anal Biochem*, 380: 276-81.
- Hettick, J. M., B. J. Green, A. D. Buskirk, M. L. Kashon, J. E. Slaven, E. Janotka, F. M. Blachere, D. Schmechel & D. H. Beezhold (2008b) Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 22: 2555-60.
- Holland, R. D., J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees & J. O. Lay, Jr. (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10: 1227-32.
- Holmes, C. J., R. C. Evans & E. Vonesh (1989) Application of an empirically derived growth curve model to characterize *Staphylococcus epidermidis* biofilm development on silicone elastomer. *Biomaterials*, 10: 625-9.
- Jacobs, C. N. & D. Opolinsky (2008) End stage renal disease. The little black book of nephrology and hypertension. D.K. Onion (ed.). Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, LCC, 1st edition, 205-64.
- Johnson, D. W., J. Wong, K. J. Wiggins, R. Kirwan, A. Griffin, J. Preston, D. Wall, S. B. Campbell, N. M. Isbel, D. W. Mudge, C. M. Hawley & D. L. Nicol (2006) A randomized controlled trial of coiled versus straight swan-neck Tenckhoff catheters in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis*, 48: 812-21.

- Kaplan, J. B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*, 89: 205-18.
- Kaplan, J. B., C. Ragnath, K. Velliyagounder, D. H. Fine & N. Ramasubbu (2004) Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2633-6.
- Karahan, O. I., H. Taskapan, A. Yikilmaz, O. Oymak & C. Utas (2005) Ultrasound evaluation of peritoneal catheter tunnel in catheter related infections in CAPD. *Int Urol Nephrol*, 37: 363-6.
- Karatan, E. & P. Watnick (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol R*, 73: 310-47.
- Kathuria, P., Z. J. Twardowski & K. W. Nichols (2009) Peritoneal dialysis access and exit-site care including surgical aspects. Nolph and Gokal's textbook of peritoneal dialysis. R. Khanna & R. Krediet (eds.). New York: Springer, 3rd edition, 371-446.
- Kee, J. L. F., B. J. Paulanka & C. Polek (2008) Clinical situations: fluid, electrolyte, and acid-base imbalances. Fluids and electrolytes with clinical applications - a programmed approach. Delmar: Cengage Learning, 8th edition, 295-515.
- Kiddy, K., Brown, PP, Michael, J, Adu, D. (1985) Peritonitis due to *Streptococcus viridans* in patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Br Med J*, 290: 969-70.
- Kim, C. Y., A. Kumar, L. Sampath, K. Sokol & S. Modak (2002) Evaluation of an antimicrobial-impregnated continuous ambulatory peritoneal dialysis catheter for infection control in rats. *Am J Kidney Dis*, 39: 165-73.
- Kleinpeter, M. A. & N. K. Krane (2001) Treatment of mycobacterial exit-site infections in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial*, 17: 172-5.
- Kocur, M., W. E. Kloos & K. H. Schleifer (1992) The genus *Micrococcus*. The Prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer (eds.). New York: Springer, 2nd edition, 1300-11.
- Krediet, R. T. (2007) 30 years of peritoneal dialysis development: the past and the future. *Perit Dial Int*, 27: S35-41.

- Kubey, W., P. Luneburg, S. Ericson, J. Brown & C. J. Holmes (1995) A longitudinal *in vitro* antimicrobial evaluation of two silver polymer surface treatments for peritoneal dialysis catheters. *Adv Perit Dial*, 11: 193-6.
- La Scola, B. & D. Raoult (2009) Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Plos One*, 4: e8041.
- Larsen MKS, T. T., Moser C, Høiby N, Nielsen PH (2008) Use of cultivation-dependent and -independent techniques to assess contamination of central venous catheters: a pilot study. *BMC Clin Pathol*, 8: 10.
- Li, P. K., C. C. Szeto, B. Piraino, J. Bernardini, A. E. Figueiredo, A. Gupta, D. W. Johnson, E. J. Kuijper, W. C. Lye, W. Salzer, F. Schaefer & D. G. Struijk (2010) Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. *Perit Dial Int*, 30: 393-423.
- Lopez-Mencherero, R., F. Siguenza, A. Caridad, J. C. Alonso & R. M. Ferreruela (1998) Peritonitis due to *Comamonas acidovorans* in a CAPD patient. *Perit Dial Int*, 18: 445-6.
- Luvira, V., B. Satirapoj, O. Supasynndh, A. Chaiprasert, P. Ruangchanasetr, N. Nata, I. Kanjanakul, T. Supaporn, P. Choovichian, S. Bijaphala, U. Luvira & D. Phiboonbanakit (2011) A single-centre experience: peritoneal dialysis-related infections in patients on long-term dialysis. *J Med Assoc Thai*, 94: S30-6 (abstract).
- Luzar, M. A. (1991) Exit-site infection in continuous ambulatory peritoneal dialysis: a review. *Perit Dial Int*, 11: 333-40.
- Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen & R. Laufs (1996) Association of biofilm production of coagulase-negative Staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis*, 174: 881-4.
- Maeda, Y., T. Uno, A. Yoshida, A. Takahashi, N. Inaba & T. Shiigai (2009) Nontuberculous mycobacterial peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Rural Med*, 4: 75-9.
- Mahami, T. & A. Adu-Gyamfi (2011) Biofilm-associated infections: public health implications *IRJM*, 2: 375-81.

- Maki, D. G., C. E. Weise & H. W. Sarafin (1977) A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*, 296: 1305-9.
- Marcus, R. J., J. C. Post, P. Stoodley, L. Hall-Stoodley, R. L. McGill, K. K. Sureshkumar & V. Gahlot (2008) Biofilms in nephrology. *Expert Opin Biol Ther*, 8: 1159-66.
- Marinach-Patrice, C., A. Lethuillier, A. Marly, J. Y. Brossas, J. Gene, F. Symoens, A. Datry, J. Guarro, D. Mazier & C. Hennequin (2009) Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clin Microbiol Infect*, 15: 634-42.
- Marklein, G., M. Josten, U. Klanke, E. Muller, R. Horre, T. Maier, T. Wenzel, M. Kostrzewa, G. Bierbaum, A. Hoerauf & H. G. Sahl (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*, 47: 2912-7.
- Marrie, T. J., M. A. Noble & J. W. Costerton (1983) Examination of the morphology of bacteria adhering to peritoneal dialysis catheters by scanning and transmission electron microscopy. *J Clin Microbiol*, 18: 1388-98.
- Merlino, J., M. Leroi, R. Bradbury, D. Veal & C. Harbour (2000) New chromogenic identification and detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol*, 38: 2378-80.
- Moter, A., M. Musci & D. Schmiedel (2010) Molecular methods for diagnosis of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*, 12: 244-52.
- Otto, M. (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 207-28.
- Parsek, M. R. & P. K. Singh (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*, 57: 677-701.
- Perry, S. F. (1998) Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Mol Biotechnol*, 9: 59-64.
- Peters, R. P., P. H. Savelkoul, A. M. Simoons-Smit, S. A. Danner, C. M. Vandenbroucke-Grauls & M. A. van Agtmael (2006) Faster identification of pathogens in positive blood cultures by fluorescence in situ hybridization in routine practice. *J Clin Microbiol*, 44: 119-23.

- Peters, T., R. Potter, X. Li, Z. He, G. Hoskins & M. F. Flessner (2011) Mouse model of foreign body reaction that alters the submesothelium and transperitoneal transport. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300: F283-9.
- Pfaller, M. A. (2001) Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerg Infect Dis*, 7: 312-8.
- Pihl, M. (2011) Microbial biofilms on peritoneal dialysis catheter. Master Thesis. Department of Oral Biology. Malmö University.
- Pihl, M., J. R. Davies, A. C. Johansson & G. Svensater (2012) Bacteria on catheters in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* (as published).
- Piraino, B., G. R. Bailie, J. Bernardini, E. Boeschoten, A. Gupta, C. Holmes, E. J. Kuijper, P. K. Li, W. C. Lye, S. Mujais, D. L. Paterson, M. P. Fontan, A. Ramos, F. Schaefer & L. Uttley (2005) Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2005 update. *Perit Dial Int*, 25: 107-31.
- Porth, C. M. (2010) Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 8th edition.
- Raad, I., W. Costerton, U. Sabharwal, M. Sacilowski, E. Anaissie & G. P. Bodey (1993) Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis*, 168: 400-7.
- Raad, I., H. Hanna & D. Maki (2007) Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis*, 7: 645-57.
- Reid, G., R. Davidson & J. D. Denstedt (1994) XPS, SEM and EDX analysis of conditioning film deposition onto ureteral stents. *Surf Interf Anal*, 21: 581-86.
- Rodrigues, A. (2010) Diálise Peritoneal - Uma diálise feita em casa: para quando a opção? Lisboa: Lidel, 1^a edição.
- Rodríguez-Carmona, A., M. P. Fontán, T. G. Falcón & F. V. Cañedo (2000) Prevalence of microbial colonization in removed peritoneal catheters: a prospective study. *Adv Perit Dial*, 16: 276-79.

- Schoenmaeckers, E. J., A. J. Woittiez, J. F. Raymakers & S. Rakic (2011) Continuous ambulatory peritoneal dialysis after intra-abdominally placed synthetic mesh for ventral hernia repair. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*, 21: 741-3.
- Schwartz, M. K. (2002) Tumor markers. Clinical laboratory medicine. K. D. McClatchey (ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2nd edition, 489 - 788.
- Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain & D. Raoult (2009) Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49: 543-51.
- Sherertz, R. J., S. O. Heard & Raad, II (1997) Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of roll plate, sonication, and flushing methodologies. *J Clin Microbiol*, 35: 641-6.
- Shin, J. H., S. H. Kim, H. S. Jeong, S. H. Oh, H. R. Kim, J. N. Lee, Y. C. Yoon, Y. W. Kim & Y. H. Kim (2011) Identification of coagulase-negative Staphylococci isolated from continuous ambulatory peritoneal dialysis fluid using 16S ribosomal RNA, tuf, and SodA gene sequencing. *Perit Dial Int*, 31: 340-6.
- Shittu, A., J. Lin, D. Morrison & D. Kolawole (2006) Identification and molecular characterization of mannitol salt positive, coagulase-negative Staphylococci from nasal samples of medical personnel and students. *J Med Microbiol*, 55: 317-24.
- Shukla, A., Z. Abreu & J. M. Bargman (2006) Streptococcal PD peritonitis - a 10 year review of one centre's experience. *Nephrol Dial Transplant*, 21: 3545-9.
- Simoes, M., M. O. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo & M. J. Vieira (2007) The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, 23: 249-58.
- Slobbe, L., A. El Barzouhi, E. Boersma & B. J. Rijnders (2009) Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose catheter colonization and bacteremia in patients with long-term tunnelled catheters: a randomized prospective study. *J Clin Microbiol*, 47: 885-8.

- Smith, K. & I. S. Hunter (2008) Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol*, 57: 966-73.
- Sodré, F. L., J. C. B. Costa & J. C. C. Lima (2007) Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. *J Bras Patol Med Lab*, 43: 329-37.
- Song, E. J., C. S. Seon, S. H. Park, J. K. Jung, S. A. Sung, S. Y. Lee, Y. H. Hwang & Y. U. Cho (2011) A case of *Delftia acidovorans* peritonitis in a peritoneal dialysis patient managed with preserving the dialysis catheter. *Korean J Nephrol*, 30: 343-45 (abstract).
- Spencer, R.C. (1988) Infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Med Microbiol*, 27: 1-9.
- Stevenson, L. G., S. K. Drake, Y. R. Shea, A. M. Zelazny & P. R. Murray (2010) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol*, 48: 3482-6.
- Stewart, P. S. & M. J. Franklin (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 6: 199-210.
- Surhone, L. M., M. T. Tennoe & S. F. Henssonow (2011) *Herbaspirillum Huttiense*. Saarbrücken: VDM Publishing, 1st edition.
- Szabados, F., M. Michels, M. Kaase & S. Gatermann (2011) The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT (bioMerieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect*, 17: 192-5.
- Szeto, C. C. & K. M. Chow (2007) Gram-negative peritonitis – the achilles heel of peritoneal dialysis? *Perit Dial Int*, 27: S267-71.
- Tambawala, A. Q., S. Hamid, I. Khan & A. Ali (2011) Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) associated peritonitis in a child: a rare case of peritonitis caused by *Sphingomonas paucimobilis*. *J Pak Med Assoc*, 61: 178-80.
- Tieszer, C., G. Reid & J. Denstedt (1998) Conditioning film deposition on ureteral stents after implantation. *J Urol*, 160: 876-81.

- Tokgoz, B. (2009) Clinical advantages of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 29: S59-61.
- Troidle, L. & F. Finkelstein (2006) Treatment and outcome of CPD-associated peritonitis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5: 6.
- Twardowski, Z. J. & B. F. Prowant (1996) Classification of normal and diseased exit sites. *Perit Dial Int*, 16: S32-50.
- van Veen, S. Q., E. C. Claas & E. J. Kuijper (2010) High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*, 48: 900-7.
- Vargemezis, V. & E. Thodis (2001) Prevention and management of peritonitis and exit-site infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 16: 106-8.
- Verger, C., A. M. Chesneau, M. Thibault & N. Bataille (1987) Biofilm on Tenckhoff catheters: a negligible source of contamination *Perit Dial Int*, 7: 174-78.
- von Graevenitz, A. & D. Amsterdam (1992) Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Rev*, 5: 36-48.
- Vychytil, A., M. Lorenz, B. Schneider, W. H. Horl & M. Haag-Weber (1998) New criteria for management of catheter infections in peritoneal dialysis patients using ultrasonography. *J Am Soc Nephrol*, 9: 290-6.
- Waar, K., J. E. Degener, M. J. van Luyn & H. J. Harmsen (2005) Fluorescent in situ hybridization with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *J Med Microbiol*, 54: 937-44.
- Warwick S, W. M., Hennessy E, Powell-Tuck J, Small M, Sharp J, Millar MR (2004) Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection. *J Clin Microbiol*, 42: 1402-8.
- Winn, W. C., S. D. Allen, W. M. Janda, E. W. Koneman, G. Procop, P. C. Schreckenberger & G. L. Woods (2006) Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 6th edition.

Yanagisawa, N., D. Q. Li & A. Ljungh (2004) Protein adsorption on *ex vivo* catheters and polymers exposed to peritoneal dialysis effluent. *Perit Dial Int*, 24: 264-73.

Yip, T., K. C. Tse, F. Ng, I. Hung, M. F. Lam, S. Tang, S. L. Lui, K. N. Lai, T. M. Chan & W. K. Lo (2011) Clinical course and outcomes of single-organism *Enterococcus* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 31: 522-8.