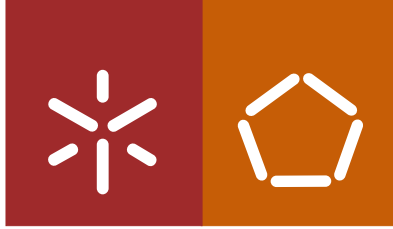


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Joana Marisa Brito Sampaio

**Infeções associadas a cateteres de  
diálise peritoneal: etiologia e papel  
do biofilme na patogénese**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Joana Marisa Brito Sampaio

**Infeções associadas a cateteres de diálise peritoneal: etiologia e papel do biofilme na patogénese**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica  
Área de Especialização em Engenharia Clínica

Trabalho realizado sob a orientação da  
**Doutora Margarida Martins**

outubro de 2013

## DECLARAÇÃO

**Nome:** Joana Marisa Brito Sampaio

**Endereço electrónico:** a55981@alunos.uminho.pt

**Telefone:** 918947719

**Número do Bilhete de Identidade:** 13629089

**Título da Dissertação:** Infeções associadas a cateteres de diálise peritoneal: etiologia e papel do biofilme na patogénese

**Orientador:** Doutora Margarida Martins

**Ano de conclusão:** 2013

**Designação do Mestrado:** Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE

Universidade do Minho, 31/10/2013

Joana Marisa Brito Sampaio

## Agradecimentos

À Doutora **Margarida Martins**, pela partilha de conhecimentos e toda a disponibilidade, apoio e confiança demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho. A sua orientação e amizade foram fundamentais para que tudo corresse bem.

À Doutora **Anabela Rodrigues**, Doutor **António Cabrita**, enfermeira **Olívia Santos**, enfermeira **Ana Abrunhosa**, enfermeira **Cristiana Sarmento** do serviço de nefrologia do Centro Hospitalar do Porto- Hospital Geral de Santo António e à Doutora **Ana Marta Gomes** do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/ Espinho, pela disponibilização das amostras para a realização deste trabalho.

A todos os **colegas do LMA**, um obrigada especial por toda a ajuda prestada durante o trabalho laboratorial.

Este estudo foi financiado pelo Projeto de Investigação: *"Insights into peritoneal dialysis catheter associated biofilms: Avaliação da contribuição dos biofilmes microbianos para as infeções em diálise peritoneal"*, atribuído pela Sociedade Portuguesa de Nefrologia à Doutora Anabela Rodrigues.

## Resumo

A diálise peritoneal (DP) é uma das modalidades dialíticas utilizadas no tratamento da insuficiência renal crónica. Apesar de apresentar inúmeras vantagens, um dos principais problemas associados a esta técnica são as peritonites. Tem sido sugerido que o biofilme associado ao cateter tem um papel importante na ocorrência de peritonites repetidas e recidivantes. No entanto, os estudos relativos à caracterização etiológica dos biofilmes, assim como à avaliação de fatores que influenciam a formação do biofilme, como por exemplo as soluções de DP, são limitados.

Assim, o primeiro objetivo do trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação consistiu na recuperação de microrganismos associados a extensores e cateteres de DP, através de métodos de cultura semi-quantitativos e qualitativos, e na sua identificação através de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). O segundo objetivo consistiu na avaliação da influência das soluções de DP em células planctónicas e em biofilme de bactérias de *Staphylococcus* coagulase-negativas. O número de células planctónicas e de biofilme foi determinado pelo número de unidades formadoras de colónias (UFC) e a biomassa total do biofilme por coloração com violeta cristal.

Neste estudo foram analisados 63 extensores e 28 cateteres permanentes de DP. A partir dos resultados obtidos através da análise semi-quantitativa observou-se que no extensor e no segmento externo a densidade celular está geralmente compreendida entre  $1 < \text{UFC/segmento} \leq 100$ . Relativamente aos *cuffs* intermédios e *cuffs* internos, em geral, a densidade celular variou entre  $300 < \text{UFC/segmento} \leq 3 \times 10^5$  e  $1 < \text{UFC/segmento} \leq 100$ , respetivamente. Finalmente, no segmento intraperitoneal observou-se uma densidade celular entre  $1 < \text{UFC/segmento} \leq 100$ . A técnica de MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 89% dos microrganismos recuperados de extensores e 91% dos microrganismos recuperados de cateteres permanentes de DP, tendo sido as bactérias Gram-positivas as mais comumente detetadas. Especificamente nos cateteres de DP as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, nomeadamente *Staphylococcus epidermidis*, foram as mais comumente identificadas. A bactéria Gram-negativa predominante foi *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados obtidos relativamente à influência das soluções biocompatíveis de DP sugerem que estas soluções têm um efeito bacteriostático no crescimento de bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas planctónicas, com reduções geralmente inferiores a 2 log UFC/poço. Relativamente à formação de biofilme em soluções de DP, foi demonstrado que apesar de estes microrganismos aderirem (5-6 log UFC/poço) não produzem biomassa (média  $\text{DO}_{570} = 0,02$ ).

Em conclusão, o trabalho realizado permitiu concluir que as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas têm um papel importante na colonização dos cateteres e que apesar de todas as soluções de DP afectarem o seu crescimento planctónico, não afetam a sua adesão.

## Abstract

Peritoneal dialysis (PD) is one of the dialytic modalities used for chronic kidney disease treatment. Despite the several advantages of the modality, peritonitis remains a challenging problem in PD. It has been suggested that catheter-associated biofilm has an important role in the incidence of repeated and relapsing peritonitis. However, the studies regarding the etiological characterization of the biofilm, as well as the evaluation of factors that influence biofilm formation, such as PD solutions, are limited.

Thus, the first aim of this work was to recover microorganisms associated with transfer sets and PD catheters using semi-quantitative and qualitative culture methods, and to identify them using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). The second objective was to study the influence of PD solutions in coagulase-negative *Staphylococcus* planktonic cells and biofilms. The number of planktonic and biofilm cells was determined by colony forming units (CFU) and the total biofilm biomass was determined by crystal violet staining.

In this study, 63 transfer sets and 28 permanent catheters have been analyzed. The semi-quantitative culture method showed that the cell density in the transfer set and external segment is comprised between  $1 < \text{CFU/segment} \leq 100$ . Considering the intermediate and internal cuff, the cell density was  $300 < \text{CFU/segment} \leq 3 \times 10^5$  and  $1 < \text{CFU/segment} \leq 100$ , respectively. Finally, in the intraperitoneal segment the cell density was between  $1 < \text{CFU/segment} \leq 100$ . MALDI-TOF MS technique allowed the identification of 89% of the microorganisms recovered from transfer sets and 91% of the microorganisms recovered from PD catheters, being Gram-positive bacteria the most frequently detected. Specifically for the PD catheter, coagulase-negative *Staphylococcus* bacteria, namely *Staphylococcus epidermidis*, were the most frequently identified. The most common Gram-negative bacteria was *Pseudomonas aeruginosa*.

The results obtained regarding the influence of PD biocompatible solutions showed that these solutions have a bacteriostatic effect on coagulase-negative *Staphylococcus* planktonic growth (less than 2 log CFU/well reduction). Considering the biofilm formation, it has been shown that although bacteria adhere (5-6 log CFU/well), they are unable to form biomass (mean  $\text{OD}_{570} = 0.02$ ).

In conclusion, this work revealed the importance of coagulase-negative *Staphylococcus* in PD catheter colonization and that although all PD solutions affect microorganism's planktonic growth, they do not affect their adhesion.

# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Índice.....	VI
Índice de tabelas.....	IX
Índice de figuras.....	X
Lista de abreviaturas.....	XII
Preâmbulo.....	XIII
1. Introdução.....	1
1.1 Insuficiência renal e terapêuticas de substituição renal crónica.....	1
1.2 Diálise peritoneal.....	3
1.2.1 Cateteres de diálise peritoneal.....	4
1.2.2 Soluções de diálise peritoneal: soluções convencionais e biocompatíveis....	6
1.2.3 Complicações infecciosas em diálise peritoneal.....	8
1.2.3.1 Vias de entrada e principais microrganismos associados a infeções em diálise peritoneal.....	9
1.3 Biofilme.....	11
1.3.1 Definição e fases da formação do biofilme.....	11
1.4 Biofilmes microbianos em diálise peritoneal.....	13
1.4.1 Análise morfológica do biofilme associado a extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal.....	13

1.4.2	Composição microbiológica do biofilme associado a extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal.....	15
1.4.3	O papel do biofilme associado ao cateter nas infeções em diálise peritoneal.....	17
1.4.4	Impacto das soluções de diálise peritoneal convencionais e biocompatíveis em células planctónicas .....	24
1.4.5	Impacto das soluções de diálise peritoneal convencionais e biocompatíveis na regulação do biofilme.....	28
1.5	Objetivos .....	29
2.	Materiais e métodos .....	30
2.1	Microrganismos.....	30
2.2	Meios de cultura.....	31
2.3	Manutenção dos microrganismos.....	31
2.4	Criopreservação dos microrganismos.....	32
2.5	Recuperação, isolamento e identificação de microrganismos aderidos a extensores e cateteres permanentes de DP.....	32
2.5.1	Pacientes e amostras.....	32
2.5.2	Processamento dos extensores e avaliação da eficácia do álcool 70% (v/v) como agente desinfetante .....	32
2.5.3	Processamento do segmento externo dos cateteres de DP .....	33
2.5.4	Processamento dos <i>cuffs</i> dos cateteres permanentes de DP.....	33
2.5.5	Processamento do segmento intraperitoneal dos cateteres permanentes de DP.....	33
2.5.6	Análise semi-quantitativa e qualitativa dos segmentos .....	33
a)	Análise semi-quantitativa por rolamento .....	33
b)	Análise semi-quantitativa por sonicação .....	34
c)	Análise qualitativa .....	34
2.5.7	Avaliação das colónias crescidas em meio de cultura .....	34
2.5.8	Identificação os microrganismos aderidos a extensores e cateteres de DP	34



2.5.8.1	Identificação presuntiva dos microrganismos com base em meios de cultura.....	34
2.5.8.2	Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF MS .....	35
2.6	Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas e biofilmes de bactérias <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas recuperadas de cateteres de diálise peritoneal.....	36
2.6.1	Preparação do inóculo .....	37
2.6.2	Recuperação da fração das células planctónicas e do biofilme.....	37
2.6.2.1	Avaliação do número de células cultiváveis .....	38
2.6.2.2	Avaliação da biomassa total por coloração violeta cristal 1% (v/v) .....	38
2.7	Análise estatística .....	38
3.	Resultados.....	39
3.1	Avaliação da eficácia do álcool 70% (v/v) como agente desinfetante .....	39
3.2	Recuperação, isolamento e identificação de microrganismos aderidos a extensores e cateteres permanentes de DP.....	40
3.2.1	Extensores.....	40
3.2.2	Cateteres permanentes.....	41
3.3	Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas e biofilmes de bactérias <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas recuperadas de cateteres de diálise peritoneal.....	47
3.3.1	Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas.....	47
3.3.2	Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em biofilme .....	49
4.	Discussão dos resultados.....	52
5.	Conclusões e sugestões de trabalho futuro.....	61
6.	Bibliografia .....	64

## Índice de Tabelas

<b>Tabela1</b> - Composição das soluções de DP ( bioincompatíveis e biocompatíveis) [Adaptado de (McIntyre, 2007, Chaudhary and Khanna, 2010, Johnson et al., 2010, Schmitt et al., 2011)] .....	7
<b>Tabela 2</b> – Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP .....	19
<b>Tabela 3</b> – Resumo dos estudos publicados relacionados com o efeito das soluções de DP em culturas planctónicas.....	25
<b>Tabela 4</b> – Isolados clínicos utilizados na avaliação do efeito de soluções de DP no crescimento microbiano.....	30
<b>Tabela 5</b> – Composição das soluções de diálise peritoneal <sup>1</sup> .....	31
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos para a descontaminação dos extensores e segmentos externos .....	39
<b>Tabela 7</b> – Resultados obtidos pela análise semi-quantitativa e qualitativa em extensores para os quais foram detetados microrganismos através da análise microbiológica ..	41

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática do sistema de DPCA: o extensor é conectado ao sistema em Y, permitindo a introdução da solução de DP na cavidade peritoneal através do cateter de DP. Após o período de troca, o efluente é removido da cavidade peritoneal [Adaptado de Choi and Brown (2003)]. .....	3
<b>Figura 2</b> - Localização do cateter <i>Tenckhoff</i> com segmento intraperitoneal enrolado e duplo <i>cuff</i> no organismo [Adaptado de (Bayston et al., 2009)]. .....	4
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática das etapas da formação de biofilme. Numa primeira fase ocorre a formação de um filme condicionador (a). Os microrganismos na forma planctónica são transportados até a superfície condicionada, aderindo de forma reversível (b). Em seguida, ocorre a produção de SPE e adesão irreversível dos microrganismos (c). Após a maturação do biofilme (d), os microrganismos podem desprender-se do biofilme, estando disponíveis para aderir a outra superfície (e) [Adaptado de (Soumya et al., 2012)]. .....	12
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da distribuição diversidade e densidade celular de microrganismos detetados em cateteres de DP através de cultura microbiológica [Esquema adaptado de (Pihl et al., 2012)]. .....	44
<b>Figura 5</b> - Detecção de microrganismos em cateteres de DP através a) método de análise semi-quantitativa e qualitativa; e b) método de análise semi-quantitativa: rolamento e sonicação. ....	46
<b>Figura 6</b> – Comparação do efeito da solução A (icodextrina) e solução B (glucose) no crescimento planctónico de 10 espécies de <i>S. epidermidis</i> , 2 espécies de <i>S. caprae/S. capitis</i> , 3 espécies de <i>S. haemolyticus</i> e 1 espécie de <i>S. hominis</i> . A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial. ....	47
<b>Figura 7</b> – Comparação do efeito da solução B (bicarbonato/lactato), solução C (bicarbonato) e solução D (lactato) no crescimento planctónico de 10 espécies de <i>S. epidermidis</i> , 2 espécies de <i>S. caprae/S. capitis</i> , 3 espécies de <i>S. haemolyticus</i> e 1 espécie de <i>S. hominis</i> . A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial. ....	48
<b>Figura 8</b> – Comparação do efeito do controlo positivo (TSB) e controlo negativo (NaCl 0,9%) no crescimento planctónico de 10 espécies de <i>S. epidermidis</i> , 2 espécies de <i>S. caprae/S.</i>	

*capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial. .... 48

**Figura 9** – Efeito da solução A (icodextrina) e solução B (glucose) na formação de biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. .... 49

**Figura 10** – Efeito da solução B (bicarbonato/lactato), solução C (bicarbonato) e solução D (lactato) na formação de biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. .... 49

**Figura 11** – Comparação do efeito do controlo positivo (TSB) e controlo negativo (NaCl 0,9%) na formação do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. .... 50

**Figura 12** – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* na solução A (icodextrina) e solução B (glucose). .... 51

**Figura 13** – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* na solução B (bicarbonato/lactato) e solução C (bicarbonato) e solução D (lactato). .... 51

**Figura 14** – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* no TSB (controlo positivo) e NaCl 0,9% (controlo negativo). .... 51

## Lista de Abreviaturas

BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
DHB	2,5-ácido dihidroxibenzóico
DP	Diálise Peritoneal
DPCA	Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória
DPA	Diálise Peritoneal Automática
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>
PDG	Produtos de Degradação da Glucose
MALDI-TOF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-flight Mass Spectrometry</i>
MCVL	Microscopia Confocal de Varrimento a Laser
ME	Microscopia Eletrónica
MEV	Microscopia Eletrónica de Varrimento
MET	Microscopia Eletrónica de Transmissão
MAS	<i>Mannitol Salt Agar</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
TBA	<i>Tryptose Blood Agar</i>
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colónias

## Preâmbulo

A motivação para a realização do trabalho apresentado nesta dissertação está relacionada com o facto de a diálise peritoneal (DP) ter assumido um papel importante no tratamento de pacientes com insuficiência renal crónica (IRC). No entanto, as complicações associadas à DP, nomeadamente as infeções relacionadas com o cateter e as peritonites, constituem uma causa importante de morbilidade associada à técnica. Tem sido sugerido que os biofilmes microbianos, associados aos cateteres de DP, têm um papel importante na persistência destas infeções. No entanto, os estudos relacionados com o papel do biofilme na patogénese são escassos. Deste modo, torna-se relevante investigar e conhecer as características dos biofilmes associados ao cateter de DP, para desenvolver estratégias preventivas em DP. Assim, neste trabalho foi efetuada a análise microbiológica de biofilmes recuperados de extensores e cateteres permanentes de DP. O último ponto de interesse na realização desta dissertação, consistiu no estudo da interacção entre os microrganismos e o ambiente em DP. Para tal, foi avaliada a capacidade de microrganismos clinicamente relevantes, formarem biofilme *in vitro* em condições semelhantes às encontradas na prática clínica, nomeadamente a avaliação do efeito das soluções de DP em células planctónicas e na regulação do biofilme microbiano.

Esta dissertação está organizada em seis capítulos. No Capítulo 1 são abordados os conceitos teóricos relacionados com a DP e com os biofilmes microbianos, incluindo, os efeitos das soluções de DP em culturas planctónicas e na formação de biofilme. No Capítulo 2 encontram-se descritos os materiais e os métodos utilizados na realização deste trabalho. No Capítulo 3 são apresentados os resultados obtidos e no Capítulo 4 é realizada a discussão desses resultados. No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros. Finalmente, o Capítulo 6 inclui as referências bibliográficas consultadas para a elaboração desta dissertação.

# 1. Introdução

## 1.1 Insuficiência renal e terapêuticas de substituição renal crónica

Os rins são um dos órgãos constituintes do sistema urinário e são responsáveis por três funções essenciais no organismo, função: i) homeostática; ii) excretora e iii) endócrina. Os rins atuam na manutenção da homeostasia do organismo através da regulação do volume plasmático e do equilíbrio hidrolítico, importantes no controlo da pressão sanguínea, e através da regulação da osmolaridade sanguínea, equilíbrio eletrolítico e ácido-base. Adicionalmente, os rins são os principais órgãos excretores removendo do organismo os produtos finais do metabolismo celular (ureia, creatinina e o ácido úrico) e fármacos. Finalmente, os rins apresentam uma função endócrina que inclui a produção de três hormonas essenciais para o organismo: o calcitriol, que é a forma ativa da vitamina D, essencial para o controlo dos níveis de cálcio no organismo; a eritropoietina, hormona que regula a síntese de glóbulos vermelhos na medula óssea; e a renina, enzima que estimula a secreção de aldosterona pelas glândulas supra-renais (Seeley et al., 2005).

A insuficiência renal (IR), que surge quando os rins são incapazes de desempenhar as suas funções de forma adequada, pode ser classificada em IR aguda ou IR crónica. A IR aguda é definida por uma diminuição abrupta da taxa de filtração glomerular num período de horas ou dias. Esta patologia é geralmente reversível, e clinicamente pode traduzir-se na acumulação de ureia e creatinina e desequilíbrios hidro-eletrolíticos e ácido-base (Hilton, 2011).

A IR crónica, segundo a definição proposta pela *National Kidney Foundation*, é caracterizada pela presença de alterações na estrutura ou na função renal, com ou sem alteração da taxa de filtração glomerular (TFG), por um período igual ou superior a três meses. A IR crónica compreende diferentes estadios de gravidade (classificados de 1 a 5). Esta estratificação é definida de acordo com as alterações na estrutura renal e no valor da TFG. Assim, o estadio 1 é considerado quando há lesão renal, mas a TFG se encontra dentro de valores normais/aumentados e os estadios 2 a 4 são considerados quando se verifica uma diminuição ligeira, moderada e grave, respetivamente, da TFG. Finalmente, o estadio 5 corresponde a uma situação em que a função renal está seriamente comprometida e é inevitável o início de uma terapêutica substitutiva da função renal (KDOQI, 2007).

Atualmente, estão disponíveis três modalidades de substituição renal em pacientes no estadio 5: o transplante renal, hemodiálise (HD) e a DP. O transplante renal é a forma mais eficaz e económica de substituição da função renal. No entanto, o número de doadores de rins é inferior ao número de pacientes que necessitam de transplantação renal (Willcocks and Smith, 2003). Para além disso, nem todos os pacientes reúnem as condições clínicas para o transplante. E, há ainda a considerar, os pacientes que após a falência do transplante necessitam de nova intervenção terapêutica. Neste contexto, as modalidades dialíticas, HD e DP, têm um papel importante no tratamento substitutivo renal crónico (Rodrigues, 2010).

Na técnica de HD o sangue é extraído do corpo do paciente através de um acesso vascular (fístula arteriovenosa). A circulação sanguínea ocorre num circuito extracorporal por ação de uma bomba, possibilitando as trocas de substâncias entre o plasma e uma solução de diálise, o dialisante, através de uma membrana semipermeável, situada no interior do dialisador (Misra, 2005). A HD é geralmente realizada em centros especializados ou em unidades hospitalares, com sessões de cerca de 4 horas, três vezes por semana (Himmelfarb and Ikizler, 2010). A falência e as complicações do acesso vascular, tais como as infeções, são o principal problema da técnica de HD (Rodrigues, 2010).

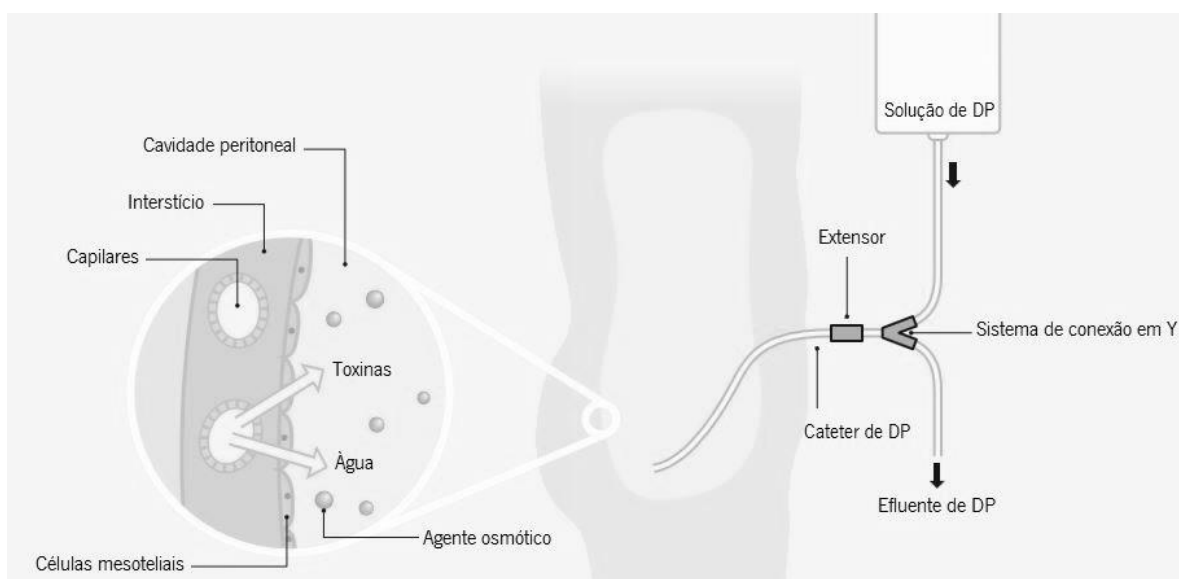
Por outro lado, a DP é uma modalidade dialítica que utiliza o peritoneu, uma membrana biológica semipermeável constituída por uma complexa estrutura de vasos, matriz intersticial e mesotélio e que recobre os órgãos abdominais, como superfície de troca de substâncias entre o sangue e a solução de DP (Figura 1). Esta técnica pressupõe a inserção de um cateter permanente na cavidade peritoneal para a entrada da solução de DP e a drenagem do efluente após o processo de diálise (Figura 1). Apesar de a DP ser o tratamento substitutivo renal crónico menos frequentemente utilizado, em relação à HD, esta técnica oferece inúmeras vantagens. A saber, i) é uma técnica simples, oferecendo ao paciente uma maior mobilidade, independência e qualidade de vida (Gokal and Mallick, 1999); ii) quando efetuada como primeira opção terapêutica, permite a preservação da função renal residual e a conservação dos acessos vasculares, que podem ser necessários no decurso do tratamento da IR crónica (Lameire et al., 2000); iii) representa um importante suporte nutricional calórico e proteico, devido às soluções de DP infundidas na cavidade intraperitoneal contendo glucose ou aminoácidos (Rodrigues, 2010); e iv) é uma terapia mais económica que a hemodiálise (Rodrigues, 2010). No entanto, alguns pacientes em DP apresentam problemas psicossociais: (Choi and Brown, 2003) i) devido ao uso do cateter permanente; e ii) cansaço do uso da técnica, particularmente em pacientes



idosos; e problemas clínicos, dos quais se destacam as peritonites e as infecções associadas ao cateter (Choi and Brown, 2003).

## 1.2 Diálise peritoneal

A DP pode ser realizada segundo duas vertentes: a Diálise Peritoneal Contínua Ambulatória (DPCA) e a Diálise Peritoneal Automática (DPA). Na DPCA a solução de DP é instilada na cavidade peritoneal, e embora o período e o número de trocas seja variável, tendo em conta as condições clínicas do paciente, a solução permanece geralmente entre 4 a 6 h na cavidade peritoneal até ser drenada, num processo que é repetido três a quatro vezes por dia (Choi and Brown, 2003). Sumariamente, durante o período de trocas, as toxinas retidas no sangue, passam dos capilares para a cavidade peritoneal, através da membrana peritoneal, por um processo de difusão, e o agente osmótico presente na solução de DP promove um gradiente osmótico que permite a saída de água, por um processo de ultrafiltração (Figura 1) (Ellam and Wilkie, 2007).



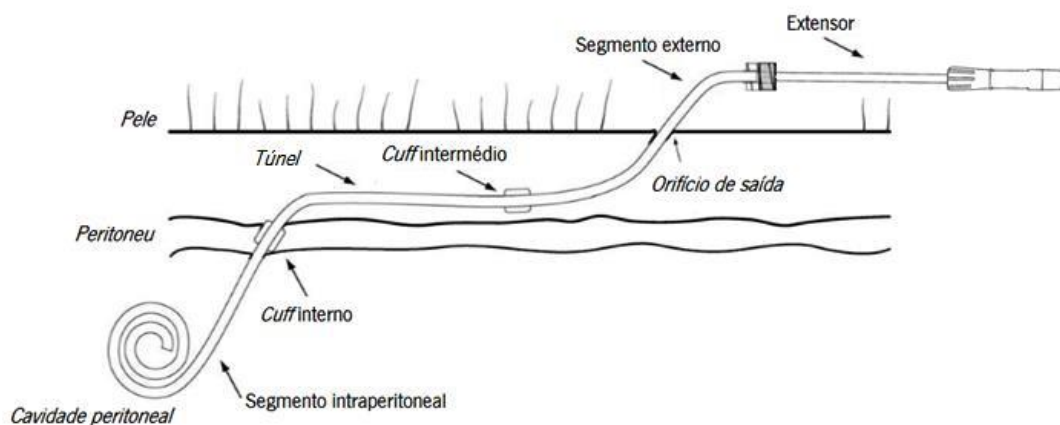
**Figura 1** – Representação esquemática do sistema de DPCA: o extensor é conectado ao sistema em Y, permitindo a introdução da solução de DP na cavidade peritoneal através do cateter de DP. Após o período de troca, o efluente é removido da cavidade peritoneal [Adaptado de Choi and Brown (2003)].

A DPA é realizada durante a noite, com ciclos de duração entre 8 a 10 h (Demetriou et al., 2006), e as trocas de solução de DP são efetuadas de forma automática, com o auxílio de uma máquina cicladora (Choi and Brown, 2003, Ellam and Wilkie, 2007). Do ponto de vista clínico, a DPCA e a DPA apresentam resultados semelhantes, embora a DPA permita uma

melhor adaptação da técnica à vida quotidiana ou atividade laboral do paciente, familiar ou técnico de saúde em casos de doentes dependentes (Rodrigues, 2010).

### 1.2.1 Cateteres de diálise peritoneal

Em DP, o acesso à cavidade peritoneal, para a introdução da solução de diálise e drenagem do efluente, é conseguido através da inserção de um cateter permanente (Figura 2). O cateter de DP deve: i) ser biocompatível; ii) permitir taxas de fluxo rápidas e sem vazamento; iii) ter uma configuração que permita uma boa adaptação ao paciente, sem causar dor e desconforto; e iv) minimizar a ocorrência de infeções (Ash, 1990). Idealmente, o cateter de DP deveria impedir a colonização microbiana e consequentemente a formação de biofilme, no entanto, o material usado no desenvolvimento dos cateteres não apresenta essa característica (Thodis et al., 2005). Os cateteres permanentes de DP são constituídos por três elementos fundamentais (Figura 2): i) a extremidade interna, colocada na cavidade peritoneal, designada de segmento intraperitoneal; ii) a parte subcutânea, que atravessa a parede abdominal, constituída por um ou dois *cuffs*; e iii) a porção externa, que emerge num local adequado na pele, designada de segmento externo, e permite a conexão ao extensor.



**Figura 2** - Localização do cateter *Tenckhoff* com segmento intraperitoneal enrolado e duplo *cuff* no organismo [Adaptado de (Bayston et al., 2009)].

Os cateteres em DP são de silicone, que é um material biocompatível (Buffington et al., 2012) e os *cuffs* são de poliéster (Thodis et al., 2005) que, contrariamente ao silicone, é um material bioincompatível. No entanto, esta característica dos *cuffs* promove uma reação fibrótica, que permite a fixação do cateter, e impede a migração do mesmo (Ash, 2003).

Embora se tenha vindo a observar um aumento da sobrevida do cateter de DP, continua a verificar-se uma elevada taxa de complicações relacionadas com este. Assim, no sentido de minimizar as possíveis complicações associadas ao cateter, têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos, vários tipos cateteres de DP, a saber: o cateter *Tenckhoff*, *Swan neck*, *Toronto-Western Hospital (TWH)*, *Ash Advantage* e *Cruz* (Thodis et al., 2005). Estes cateteres apresentam diferentes configurações, que incluem alterações no formato do trajeto subcutâneo (reto ou curvado), no número e desenho de *cuffs* e no formato do segmento intraperitoneal (reto, enrolado, em forma de T ou reto com discos de silicone)(Flanigan and Gokal, 2005, Peppelenbosch et al., 2008). O cateter permanente de DP mais utilizado na prática clínica, a nível mundial, é o cateter *Tenckhoff* (Kathuria et al., 2009). Este cateter pode apresentar o segmento intraperitoneal reto ou enrolado e um ou dois *cuffs*. Na Figura 2 está representada a localização no organismo do cateter *Tenckhoff*, com segmento intraperitoneal enrolado, e de duplo *cuff*. Esta configuração do segmento intraperitoneal minimiza o efeito de jato causado pelo fluxo de saída da solução de DP do cateter, reduzindo assim o desconforto do paciente durante a introdução da solução na cavidade peritoneal (Thodis et al., 2005). Todos os cateteres *Tenckhoff* incorporam uma tira de sulfato de bário, que permite a visualização da sua posição durante a realização de raio-X (Kathuria et al., 2009). Adicionalmente, os cateteres *Tenckhoff*, possuem furos laterais com 1 mm de diâmetro no segmento intraperitoneal, com a função de melhorar as taxas de fluxo das soluções de DP (Ash, 2003).

### 1.2.2 Soluções de diálise peritoneal: soluções convencionais e biocompatíveis

Em DP, a correção dos desequilíbrios ácido-base, hidroeletrolíticos e da volêmia é conseguida através da introdução, na cavidade peritoneal, de uma solução de DP, constituída por i) eletrólitos; ii) tampão; e iii) um agente osmótico.

Existem dois tipos principais de soluções para DP: as soluções convencionais (bioincompatíveis) e as soluções biocompatíveis (Tabela 1). As soluções convencionais são caracterizadas por um possuir um pH ácido, concentrações de lactato muito altas e elevada osmolaridade em consequência das elevadas concentrações de glucose (Cho et al., 2012). No entanto, o fator de maior bioincompatibilidade destas soluções está associado à formação de produtos de degradação da glucose (PDG) durante o processo de esterilização por calor e armazenamento (Witowski et al., 2000). Têm sido sugerido que a exposição prolongada da membrana peritoneal a estes produtos pode promover processos patológicos de deterioração da camada de células mesoteliais, fibrose e neoangiogénese (Schmitt et al., 2007).

Por outro lado, as soluções de DP biocompatíveis apresentam um pH mais próximo do fisiológico, em comparação com as soluções convencionais e tampões alternativos ao lactato, nomeadamente o bicarbonato e o bicarbonato/lactato. Adicionalmente, em algumas soluções biocompatíveis, a glucose é substituída por um polímero, a icodextrina (solução *Extraneal*), ou por aminoácidos (solução *Nutrineal*), evitando assim a problemática da formação de PDG. Estas soluções permitem, do ponto de vista clínico, manter as características anatómicas e fisiológicas do peritoneu inalteradas durante a realização da terapêutica dialítica (Ortiz et al., 2011)

**Tabela 1** - Composição das soluções de DP ( bioincompatíveis e biocompatíveis) [Adaptado de (McIntyre, 2007, Chaudhary and Khanna, 2010, Johnson et al., 2010, Schmitt et al., 2011)]

<b>Solução (compatibilidade)</b>	<b>Sódio (mmol/L)</b>	<b>Cloro (mmol/L)</b>	<b>Cálcio (mmol/L)</b>	<b>Magnésio (mmol/L)</b>	<b>Agente osmótico (%)</b>	<b>Osmolaridade (mOsm/L)</b>	<b>Tampão (mmol/L)</b>	<b>pH</b>
<i>Dianeal</i> PD1/PD2/PD4 <i>Baxter</i> (bioincompatível)	132	102/96/95	1,75/1,75/0,25	0,75/0,75/0,25	glucose 1,36/ 2,27/3,86	344-486	lactato 35/40/40	5,5
<i>Stay-safe</i> <i>Fresenius</i> (bioincompatível)	134	102,5	1,75	0,5	glucose 1,5/4,25	358-511	lactato 35	5,5
<i>Bicavera</i> <i>Fresenius</i> (biocompatível)	132	104,5	1,75	0,5	glucose 1,5/ 2,3/4,25	358-511	bicarbonato 34	7,4
<i>Balance</i> <i>Fresenius</i> (biocompatível)	134	100,5	1,25/1,75	0,5	glucose 1,5/ 2,3/4,25	358-511	lactato 35	7,0
<i>Gambrosol</i> <i>Trio 10/40</i> <i>Fresenius</i> (biocompatível)	132	96	1,75/1,35	0,25	glucose 1,5/ 2,5/3,9	356-483	lactato 40	5,5/ 6,5
<i>Physioneal</i> 35/40 <i>Baxter</i> (biocompatível)	132	101/95	1,75/1,25	0,25	glucose 1,36/ 2,27/3,86	344-484	lactato 10/15 bicarbonato 25/25	7,4
<i>Extraneal</i> <i>Baxter</i> (biocompatível)	132	96	1,75	0,25	icodextrina 7,5	284	lactato 40	5,5
<i>Nutrineal</i> <i>Baxter</i> (biocompatível)	132	105	1,25	0,25	aminoácidos 1,1	365	lactato 40	6,7

### 1.2.3 Complicações infecciosas em diálise peritoneal

Em DP as infeções manifestam-se como infeções do orifício de saída (IOS), infeção do túnel (IT) (Figura 2) e peritonites (Li et al., 2010). Os dois primeiros tipos de infeção anteriormente citados são coletivamente denominados de infeções do cateter (Li et al., 2010).

As IOS são caracterizadas pela presença de drenagem purulenta, com ou sem eritema da pele. As IT são caracterizadas pela presença de eritema, edema e sensibilidade do trajeto subcutâneo do cateter. Estas infeções ocorrem geralmente na presença de IOS (Li et al., 2010).

As peritonites são o tipo de infeção mais grave em DP, e embora menos de 4% dos episódios de peritonites resultem na morte do paciente, representam uma causa importante de remoção do cateter, falência da membrana peritoneal e, conseqüentemente descontinuação da técnica de DP e transferência para HD (Li et al., 2010). Os pacientes que desenvolvem um episódio de peritonite, apresentam um quadro clínico caracterizado pela presença de pelo menos dois dos seguintes critérios: i) dor abdominal, febre, náuseas e vômitos; ii) turvação do efluente, com uma concentração de leucócitos no efluente superior a 100 células/ $\mu\text{L}$  (50% neutrófilos); e iii) cultura microbiológica positiva do efluente (Quintanar Lartundo et al., 2011). De notar que, alguns pacientes podem desenvolver episódios de peritonite estéril, caracterizados pela obtenção de uma cultura microbiológica negativa do efluente, embora tenha sido detetado o efluente turvo e os sintomas clínicos acima mencionados (de Freitas and Gokal, 2005). A *International Society for Peritoneal Dialysis* (ISPD) recomenda a classificação das peritonites em cinco tipos distintos: i) peritonite recorrente: episódio de peritonite que ocorre nas quatro semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, mas é causado por um microrganismo diferente; ii) peritonite recidivante: episódio que ocorre quatro semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, sendo causado pelo mesmo microrganismo; iii) peritonite repetitiva: episódio que ocorre mais de quatro semanas após o fim da terapia de um episódio prévio, e é causado pelo mesmo microrganismo; iv) peritonite refractária: episódio que se caracteriza pela permanência do efluente turvo após cinco dias de tratamento com agentes microbianos apropriados; e v) peritonite associada ao cateter: episódio de peritonite que está associado a uma IOS ou IT, causado pelo mesmo microrganismo, ou evidência de infeção em ambos os locais (Li et al., 2010).

Segundo a ISPD, é recomendável a remoção do cateter em caso de: peritonite refractária, peritonite recidivante, peritonite fúngica e infeção refractária do orifício de saída e túnel (Li et al., 2010).

### 1.2.3.1 Vias de entrada e principais microrganismos associados a infeções em diálise peritoneal

Os microrganismos podem aceder à cavidade peritoneal através de cinco vias: transluminal, periluminal, transmural, hematogénica e transvaginal (Vargemezis and Thodis, 2001, Oreopoulos and Tzamaloukas, 2008)

A entrada de microrganismos através da via transluminal, ou seja, ao longo do lúmen do cateter, ocorre principalmente através do toque no cateter durante as trocas de solução de DP, e representa a principal via de contaminação da cavidade peritoneal (von Graevenitz and Amsterdam, 1992, Oreopoulos et al., 2008). Os microrganismos envolvidos são essencialmente bactérias Gram-positivas pertencentes à flora comensal da pele, com predomínio das bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, mas também *Corynebacterium spp.* e *Bacillus spp.* e bactérias Gram-negativas, como por exemplo as bactérias do género *Acinetobacter* (McGinley et al., 1988, Fried and Piraino, 2009).

Na via periluminal os microrganismos migram ao longo do túnel do cateter, desde o orifício de saída até ao peritoneu (von Graevenitz and Amsterdam, 1992, Oreopoulos and Tzamaloukas, 2008). A entrada de microrganismos por esta via representa uma importante causa de infeções relacionadas com o cateter, nomeadamente as IOS e as IT do cateter, aumentando a predisposição para a ocorrência de peritonites (Zimmerman et al., 1988, von Graevenitz and Amsterdam, 1992, Fried and Piraino, 2009, Piraino et al., 2011). Os microrganismos mais comumente associados às infeções associadas ao cateter são predominantemente as bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi proposto que a diminuição do risco de entrada de *S. aureus* pela via periluminal pode ser conseguida com profilaxia antibiótica com mupirocina nasal no orifício de saída, no caso de pacientes portadores nasais de *S. aureus* (Piraino, 2010). A aplicação intranasal de mupirocina previne a disseminação de *S. aureus* do nariz para as mãos e, conseqüentemente das mãos para o orifício de saída, favorecendo a diminuição da incidência de IOS (Dasgupta, 2000). Adicionalmente, a aplicação de mupirocina no orifício de saída permite uma redução significativa das IOS e das peritonites relacionadas com *S. aureus* (Xu et al., 2010). A título de exemplo, o estudo realizado por Mahajan et al. (2005) que incluiu 40 pacientes em DP, demonstrou que a aplicação diária de mupirocina como medida profilática permite reduzir a taxa de IOS em 60,5% e a taxa de peritonites em 55% .

A entrada de microrganismos na cavidade peritoneal pela via transmural resulta principalmente da migração de microrganismos entéricos, através da parede intestinal (von Graevenitz and Amsterdam, 1992, Oreopoulos and Tzamaloukas, 2008). A contaminação do peritoneu por esta via está fortemente associada à existência de patologias do foro intestinal, tais como colecistite gangrenosa, isquémia intestinal e diverticulose do cólon, ou devido à realização de procedimentos invasivos, como a colonoscopia (Piraino et al., 2011).

Os microrganismos podem aceder, à cavidade peritoneal, em casos mais raros, através da corrente sanguínea, em consequência da realização de procedimentos invasivos e dentários. Os microrganismos geralmente associados a esta via de contaminação são as bactérias do género *Streptococcus* ou *Staphylococcus* (Fried and Piraino, 2009, Piraino et al., 2011). A entrada de microrganismos na cavidade peritoneal pela via transvaginal é rara. No entanto, a realização de procedimentos ginecológicos ou o uso de dispositivos intrauterinos estão associados à migração de microrganismos (predominantemente *Candida* e *Streptococcus*) geralmente desde a vagina ou útero até ao peritoneu (Fried and Piraino, 2009, Piraino et al., 2011).

É importante referir que na prática clínica, o tratamento e a resolução de infeções em pacientes de DP esta fortemente relacionado com o agente etiológico envolvido e com os factores de virulência a ele associados, como por exemplo a formação de biofilme. De acordo com a ISPD, as infeções causadas por *Staphylococcus* coagulase-negativas, que são os microrganismos mais comumente associados a peritonites, são pouco severas. No entanto, as bactérias *Staphylococcus* coagulase negativas estão fortemente associadas a ocorrência de episódios de peritonites repetitivas e recidivantes. Tem sido sugerido que a adesão microbiana e consequente formação de biofilme pode ser um fator contributivo muito importante para o desenvolvimento deste tipo de infeções. No entanto esta hipótese permanece pouco caracterizada, sendo necessários estudos mais aprofundados no sentido de determinar e perceber o papel do biofilme nas infeções associadas a DP (Szeto et al., 2008).

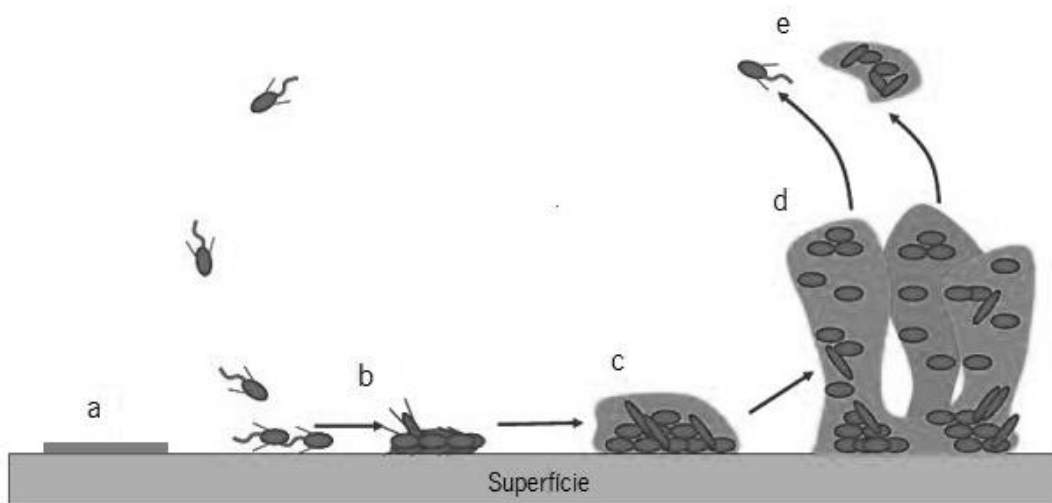


## 1.3 Biofilme

### 1.3.1 Definição e fases da formação do biofilme

O estudo dos biofilmes microbianos têm sido uma área científica largamente estudada ao longo das últimas décadas, tendo a definição de biofilme evoluído (Behlau and Gilmore, 2008). De acordo com Donlan and Costerton (2002), um biofilme pode ser definido como uma comunidade sésil de microrganismos, em que as células microbianas aderem de forma irreversível a uma superfície ou a outras células microbianas, e que estão envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE). A composição química das SPE consiste em polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. A matriz do biofilme corresponde a 85% do volume do biofilme (Donlan and Costerton, 2002).

A formação de biofilme é um processo complexo que envolve cinco etapas fundamentais (Figura 3)(Mahami and Adu-Gyamfi, 2011). Inicialmente, ocorre a formação de um filme condicionador (Figura 3 – a), que resulta da deposição de substâncias provenientes do meio aquoso, promovendo a modificação físico-química da superfície original e influenciando a posterior adesão microbiana (Donlan, 2002). Este fenómeno ocorre, por exemplo, imediatamente após a implantação de um cateter, cuja superfície é coberta por proteínas, que favorecem a adesão dos microrganismos e consequente formação de biofilme (Donlan, 2001, Trautner and Darouiche, 2004 ). Numa segunda etapa (Figura 3 – b), os microrganismos na forma planctónica são transportados até à superfície condicionada, através da ação de mecanismos de transporte, tais como, movimentos *brownianos*, difusão, convecção, sedimentação ou motilidade (Boland et al., 2000). Quando os microrganismos estão próximos da superfície podem aderir, o que vai depender do balanço entre as forças de atração e repulsão geradas entre o microrganismos e a superfície, como por exemplo, forças electrostáticas, de *Van der Waals* e hidrofóbicas (Boland et al., 2000). Após esta fase inicial de adesão, caracterizada por ser reversível, a adesão microbiana é consolidada pela produção de SPE (Figura 3 – c). Nesta fase, o processo de adesão, é mediado pela presença de recetores específicos localizados na superfície da parede celular e de estruturas celulares, tais como flagelos, *pili* e fimbrias (Dunne, 2002), que facilitam a adesão irreversível à superfície.



**Figura 3** - Representação esquemática das etapas da formação de biofilme. Numa primeira fase ocorre a formação de um filme condicionador (a). Os microrganismos na forma planctônica são transportados até a superfície condicionada, aderindo de forma reversível (b). Em seguida, ocorre a produção de SPE e adesão irreversível dos microrganismos (c). Após a maturação do biofilme (d), os microrganismos podem desprender-se do biofilme, estando disponíveis para aderir a outra superfície (e) [Adaptado de (Soumya et al., 2012)].

Quando os microrganismos se encontram aderidos de forma irreversível, (Figura 3 – d), ocorre o desenvolvimento de microcolónias, que são a unidade básica dos biofilmes. O biofilme apresenta nesta fase uma maior densidade e complexidade (Dunne, 2002). As células microbianas encapsuladas na matriz encontram-se separadas por canais de água que permitem o transporte de nutrientes, oxigénio, remoção de metabolitos, e que podem condicionar o desenvolvimento biofilme (Dunne, 2002). As células localizadas nas camadas mais exteriores do biofilme beneficiam de um acesso mais facilitado a nutrientes e oxigénio, apresentando geralmente um estado metabólico mais ativo. Por outro lado, as células microbianas localizadas nas camadas mais próximas da superfície, podem apresentar um estado metabólico menos ativo, podendo encontrar-se num estado dormente, uma vez que têm acesso a menores níveis de nutrientes e oxigénio (Anwar et al., 1992, Prakash B, 2003). Finalmente, na última etapa ocorre a dispersão dos microrganismos (Figura 3 - e), que ficam disponíveis para colonizar outras superfícies (Dunne, 2002). A fase de dispersão dos microrganismos tem implicações importantes na área clínica, já que pode representar uma fonte de disseminação dos microrganismos e de estabelecimento de infeções em outros locais (Kaplan, 2010). Tem sido sugerido que o destacamento dos microrganismos pode funcionar como uma forma de sobrevivência dos

mesmos, como resposta a condições nutritivas desfavoráveis. Apesar deste processo ser mal conhecido, são avançados na literatura possíveis mecanismos envolvidos na dispersão dos microrganismos, a saber: i) produção de enzimas extracelulares pelos próprios microrganismos, levando à quebra de ligações da matriz; ii) ocorrência de fenómenos de erosão, que consistem na perda contínua de pequenas porções de biofilme; iii) *sloughing off*, que consiste no destacamento de grandes porções de biofilme; e iv) fenómenos de abrasão, que resultam no deslocamento do biofilme devido à colisão de partículas suspensas com o biofilme (Donlan, 2002, Kaplan, 2010).

Do ponto de vista clínico, os biofilmes podem conferir aos microrganismos uma tolerância aumentada a agentes antimicrobianos. No entanto os factores envolvidos no aumento dessa tolerância não são totalmente conhecidos (Myszka and Czaczyk, 2012), sendo consequentemente difícil desenvolver estratégias terapêuticas para o tratamento de infeções relacionadas com biofilme. Especificamente em DP, os estudos desenvolvidos ao longo das últimas décadas evidenciam que o desenvolvimento de biofilme em cateteres é comum. Adicionalmente, as condições encontradas no ambiente de DP, nomeadamente as soluções de DP e o efluente de DP, podem ter um papel importante na regulação do biofilme.

## **1.4 Biofilmes microbianos em diálise peritoneal**

### **1.4.1 Análise morfológica do biofilme associado a extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal**

A análise morfológica do biofilme associado a cateteres de DP através de técnicas de microscopia eletrónica (ME), nomeadamente microscopia eletrónica de varrimento (MEV) e microscopia eletrónica de transmissão (MET), e de microscopia confocal de varrimento a laser (MCVL), tem sido reportada em vários estudos (Tabela 2). Através de microscopia, vários autores têm demonstrado a presença de microrganismos (bactérias e fungos), aderidos à superfície dos cateteres de DP e envolvidos numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (Tabela 2). Para além de microrganismos a análise através de microscopia permitiu detetar a presença de células inflamatórias, tais como, leucócitos ou macrófagos provavelmente provenientes da resposta inflamatória decorrente da implantação do cateter (Marrie et al., 1983, Dasgupta et al., 1987, Wegmann et al., 1988, Verger et al., 1987, Sekkarie et al., 1991, Swartz et al., 1991,

Gorman et al., 1994, Pihl et al., 2012). De facto, o estudo realizado por Peters et al. (2011), em que foi implantado silicone na cavidade peritoneal de ratinhos, sugere que após a implantação do cateter ocorre uma reação inflamatória que resulta na deposição de células do hospedeiro, tais como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, células mesoteliais e fibroblastos, na superfície do material. Adicionalmente, após o início da diálise, ocorre a deposição de proteínas do hospedeiro no cateter (Wegmann et al., 1988, Pihl et al., 2012), que vão contribuir para a formação do filme condicionador, o que vai alterar as características da superfície do cateter.

Os resultados obtidos a partir da análise por ME, revelam que, os biofilmes não são homogêneos e formam-se na superfície extra e intraluminal dos cateteres de DP. Adicionalmente, a extensão e espessura dos biofilmes associados a cateteres removidos devido a causa infecciosa ou não infecciosa, não são significativamente diferentes (Marrie et al., 1983, Dasgupta et al., 1986, Dasgupta et al., 1987, Swartz et al., 1991, Pihl et al., 2012). De referir no entanto, o estudo publicado por Nodaira et al. (2008), que incluiu a análise de 30 cateteres removidos devido a causa infecciosa e 33 devido a causa não infecciosa em que, apenas os cateteres removidos devido a causas infecciosas apresentavam biofilme na sua superfície.

Relativamente aos extensores de DP, apenas foi publicado um trabalho relacionado com o estudo da morfologia do biofilme nestes elementos. Através de MEV, Martins et al. (2013) analisaram a superfície de dois extensores, removidos por rotina, tendo sido verificada a presença de um filme amorfo. No entanto, não foram detetados microrganismos nas amostras analisadas.

Outro aspecto importante, também evidenciado pela análise microscópica de cateteres de DP, consiste na relação entre a formação de biofilme e as características da superfície dos cateteres, nomeadamente a rugosidade e a porosidade. Gorman et al. (1993) estudaram através de MCVL as características da superfície de cateteres não usados, e verificou que estes também apresentam alterações na superfície. Por outro lado, estudos efetuados em cateteres removidos de pacientes em DP sugerem que as alterações da superfície dos cateteres favorecem a adesão e colonização microbiana, funcionando como locais de proteção dos microrganismos contra as tensões de corte, exercidas durante as trocas de solução de DP. Refiram-se os estudos publicados por Gorman et al. (1993) e Park et al. (1996), que sugerem que a adesão microbiana por *Staphylococcus epidermidis* e *Aspergillus fumigatus*, respetivamente, ocorre preferencialmente nas superfícies irregulares do cateter.

#### 1.4.2 Composição microbiológica do biofilme associado a extensores e cateteres permanentes de diálise peritoneal

Os métodos de recuperação dos microrganismos aderidos à superfície dos cateteres, para cultura microbiológica, incluem: i) a raspagem do biofilme da superfície do cateter, geralmente utilizado no segmento externo e no segmento intraperitoneal do cateter; (Gorman et al., 1993, Gorman et al., 1994, Dasgupta et al., 1986, Dasgupta et al., 1987, Verger et al., 1987, Machado, 2012); e ii) o rolamento do cateter em meio de cultura com agar, de acordo como descrito por Maki et al. (1977), sendo maioritariamente utilizado nos *cuffs* (Marrie et al., 1983, Bayston et al., 1999, Machado, 2012).

Para a identificação dos microrganismos recuperados dos cateteres e/ou extensores de DP foram utilizados, como evidenciado na Tabela 2, métodos de identificação convencionais, que incluem testes bioquímicos (tais como o teste da catalase e coagulase, meios de cultura diferenciais e seletivos ou o teste *Analytical Profile Index* – API), métodos de identificação molecular, tais como a sequenciação do gene 16S rRNA e métodos baseados na análise das proteínas ribossomais, isto é o método *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS).

Em relação à análise microbiológica efetuada em cateteres removidos de pacientes de DP, os estudos sugerem que a presença de microrganismos viáveis no biofilme é frequente (Tabela 2). De referir, por exemplo, os estudos realizados por Gorman et al. (1993) e Machado (2012), em que através de cultura microbiológica, foram detectados microrganismos em todos os cateteres analisados. No entanto, Pihl et al. (2012), com recurso a MCVL, verificaram a presença de microrganismos aderidos à superfície de cateteres com cultura microbiológica negativa. Estes resultados indicam que, alguns microrganismos viáveis, aderidos a cateteres de DP podem não ser cultiváveis nas condições de cultura utilizadas, ou que alguns microrganismos podem não estar viáveis.

Os microrganismos mais comumente detetados através da cultura microbiológica dos cateteres são as bactérias Gram-positivas, com predomínio das bactérias da espécie *S. epidermidis* (Tabela 2). Refira-se, a título de exemplo, o estudo realizado por Gorman et al. (1993), onde foram detetadas espécies de *S. epidermidis* em 100% das amostras, removidas devido a causa infecciosa e não infecciosa, ou o estudo publicado por Pihl et al. (2012), que permitiu isolar este microrganismo em 30% dos cateteres removidos devido a causa não infecciosa. As bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas têm um papel importante na

colonização do cateter de DP, tendo sido também detetadas, em vários estudos, espécies de *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae/capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis* (Tabela 2). Adicionalmente, foram detetadas em cateteres outras bactérias Gram-positivas, tais como, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., e espécies de *S. aureus* e *Micrococcus luteus*. Relativamente às bactérias Gram-negativas, a espécie *P. aeruginosa* foi a mais detetada [13% das amostras analisadas (Bayston et al. (1999)) e 30% das amostras analisadas (Machado, 2012)], tendo sido isoladas de cateteres removidos de pacientes com ou sem infeção. Adicionalmente, foram detetadas outras espécies de bactérias Gram-negativas, tais como, *Klebsiella* spp., *Alcaligenes xylosoxidans* e *Serratia* spp., isoladas de cateteres removidos devido a causa infecciosa (Marrie et al., 1983).

Os fungos são detetados mais raramente em cateteres de DP (Tabela 2). No entanto, as infeções devidas a estes microrganismos estão associadas a uma maior taxa de morbilidade e mortalidade (Prasad and Gupta, 2005). De facto, a colonização do cateter de DP por fungos implica, invariavelmente, a remoção imediata do cateter (Li et al., 2010). O género mais frequentemente detetado é *Candida*, que foi isolado de cateteres de DP removidos devido a causa infecciosa, em cinco dos estudos apresentados (Marrie et al., 1983, Lukowski et al., 1983, Bayston et al., 1999, Nodaira et al., 2008). Curiosamente Vargemezis et al. (2004) publicaram um estudo, no qual descrevem a colonização massiva do cateter, removido de um paciente sem evidência clínica de infeção, por fungos da espécie *Candida albicans*. De referir que, as espécies de *Candida* são as mais frequentemente associadas a peritonites fúngicas, especificamente, *C. albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* (Ramage et al., 2006, Matuszkiewicz–Rowinska, 2009). Adicionalmente, outros autores reportaram casos de colonização por outras espécies de fungos menos comuns, nomeadamente: *Penicillium pinophilum*, *A. fumigatus*, *Helminthosporium* e *Alternaria*, em cateteres removidos de pacientes sem infeção (Tabela 2). Tem sido sugerido que, estes microrganismos possuem um menor grau de patogenicidade (Huang et al., 2000), embora colonizem o cateter, podendo provocar a obstrução do mesmo (Locci et al., 1984) ou a sua degradação (Wegmann et al., 1988, Vargemezis et al., 2004), sem causar peritonite.

Relativamente aos extensores de DP, o número de estudos relacionados com a composição microbiológica do biofilme é muito limitado, tendo sido publicados até à data apenas dois estudos (Verger et al., 1987, Machado, 2012). O trabalho publicado por Machado (2012),

sugere que a presença de biofilme microbiano em extensores de DP, removidos por rotina, é menos frequente comparativamente aos cateteres, tendo sido isolados microrganismos em 34% do total das amostras analisadas. Neste estudo, os microrganismos mais comumente detetados através da cultura microbiológica dos extensores são as bactérias Gram-positivas. Em concordância com os resultados obtidos na análise dos cateteres, as bactérias da espécie *Staphylococcus* coagulase-negativas (com predomínio da espécie *S. epidermidis*, detetada em 7% das amostras analisadas) (Tabela 2) são frequentemente detetadas nestas amostras. No que diz respeito às bactérias Gram-negativas, as bactérias *P. aeruginosa* e *Sphingomonas* spp. foram as mais detetadas (4% das amostras analisadas).

### **1.4.3 O papel do biofilme associado ao cateter nas infeções em diálise peritoneal**

Como evidenciado na Tabela 2, os microrganismos colonizam frequentemente o cateter de DP. No entanto, torna-se difícil estabelecer uma relação entre a presença de biofilme e a ocorrência de infeção, uma vez que o biofilme é observado em cateteres removidos devido a causas infecciosas e não infecciosas. Especificamente, a presença de biofilme em cateteres de DP removidos de pacientes sem sinais clínicos de infeção, sugere que não é o processo de infeção que está na origem da colonização do cateter. Adicionalmente, o biofilme pode atuar como um reservatório de microrganismos com tolerância aumentada aos agentes antimicrobianos, o que impede a sua total erradicação e aumenta a predisposição para múltiplas infeções devidas ao mesmo microrganismo, nomeadamente as peritonites recidivantes e repetidas (Kristinsson et al., 1986, Finkelstein et al., 2002). A título de exemplo, o estudo publicado por Finkelstein et al. (2002), que incluiu 198 pacientes que desenvolveram pelo menos dois episódios de peritonite, mostrou que 80% dos pacientes desenvolveu pelo menos um episódio de infeção repetido pelo mesmo microrganismo. Por outro lado, dos 67 pacientes aos quais foi removido o cateter, apenas 15% desenvolveu um episódio de peritonite repetida após a remoção do cateter. Assim, estes resultados sugerem que a disseminação de células planctónicas do biofilme associado ao cateter de DP pode estar na origem da persistência das infeções em DP. Por outro lado, foram publicados estudos que revelam a ausência de biofilme em cateteres removidos devido a causa infecciosa (Dasgupta et al., 1986, Dasgupta et al., 1987). No entanto, este fato pode estar associado ao efeito das terapias antimicrobianas no crescimento dos microrganismos ou devido à presença de microrganismos viáveis, mas não cultiváveis nas condições de cultura utilizadas.

Em conclusão, torna-se necessário realizar estudos mais aprofundados, com um maior número de amostras e com a caracterização detalhada da população (como por exemplo a causa de remoção do cateter), no sentido de esclarecer o papel do biofilme nas infeções em DP e desenvolver estratégias preventivas em DP.



Tabela 2 – Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP

Causa de remoção ou análise das amostras (nº de amostras)	Metodologia de avaliação (nº de amostras em que foi identificado biofilme/nº total de amostras)	Microrganismos isolados	Observações	Referência
Peritonite (2)	Cultura microbiológica (2/2) MEV (1/1) <sup>1</sup>	<i>Fusarium moniliforme</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> .	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do seg. externo do cateter; <u>Identificação dos microrganismos</u> : meio de cultura diferencial.	(McNeely et al., 1981)
Peritonite (1)	Cultura microbiológica (1/1) MEV (1/1) <sup>1</sup>	<i>C. albicans</i>	Análise da superfície intraluminal do cateter do cateter; <u>Identificação dos microrganismos</u> : n.d.	(Lukowski et al., 1983)
Peritonite (4); IOS (3); Peritonite + IOS (1); Ausência de infeção (2)	Cultura microbiológica (9/10) MEV e MET (8/10) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas</u> : <i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas</u> : <i>Enterobacter</i> spp; <i>A. xyloxydans</i> ; <i>Klebsiella</i> spp. e <i>Serratia</i> spp; <u>Fungos</u> : <i>C. albicans</i> .	Análise do cuff e análise extraluminal e intraluminal do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos</u> : meio de cultura seletivo e diferencial.	(Marrie et al., 1983)
Ausência de infeção (1)	Cultura microbiológica (1/1) MEV (1/1) <sup>1</sup>	<i>P. pinophilum</i>	<u>Identificação dos microrganismos</u> : n.d.	(Locci et al., 1984)
Peritonite (6); IOS (4); Peritonite + IOS (5); Ausência de infeção (5)	Cultura microbiológica (15/20) MEV e MET (n.d.) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas</u> : <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas</u> : <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Pseudomonas</i> .	Análise da superfície extra e intraluminal do seg. externo e seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos</u> : n.d.	(Dasgupta et al., 1986)
Peritonite (13) Ausência de infeção (12)	Cultura microbiológica (20/25); MEV e MET (25/25) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas</u> : <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Streptococcus</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas</u> : <i>Pseudomonas</i> spp.	Análise da superfície extra e intraluminal do seg. externo e seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos</u> : n.d.	(Dasgupta et al., 1987)

<sup>1</sup> análise microscópica da superfície do cateter; <sup>2</sup> análise microscópica dos microrganismos; seg. externo – segmento externo; seg. ip – segmento intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

Tabela 2 - Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP (continuação)

Causa de remoção ou análise das amostras (n° de amostras)	Metodologia de avaliação (n° de amostras em que foi identificado biofilme/n° total de amostras)	Microrganismos isolados	Observações	Referência
Peritonite (7) Ausência de infecção (10)	Cultura microbiológica (0/17) MEV (2/10)	—	Análise da superfície intraluminal do extensor, seg. externo e seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> meio de cultura seletivo.	(Verger et al., 1987)
Ausência de infecção (1)	Cultura microbiológica (1/1) Microscopia de luz (1/1) <sup>1</sup>	<i>A. fumigatus</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> meio de cultura diferencial.	(Wegmann et al., 1988)
Ausência de infecção (1)	Cultura microbiológica (1/1) MEV (1/1) <sup>2</sup>	<i>Helminthosporium</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do cateter e do extensor; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Sekkarie et al., 1991)
Infeção (3) Ausência de infecção (3)	MEV e MET (6/6) <sup>1</sup>	Bactérias do tipo cocos	Análise da superfície extra e intraluminal do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Swartz et al., 1991)
Peritonite e ausência de infecção (6)	Cultura microbiológica (6/6) MEV (6/6) <sup>1</sup> e MCLV (n.d.) <sup>1</sup>	<i>S. epidermidis</i>	Análise intraluminal do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Gorman et al., 1993)
Peritonites (4) Ausência de infecção (28)	Cultura microbiológica (26/32) MEV (29/32) <sup>1</sup> e MET/MCLV (n.d.) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas:</u> <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. saprophyticus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>S. simulans</i> ; <i>S. warneri</i> ; <i>Micrococcus spp.</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas:</u> <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Enterobacter cloacae</i> .	Análise da superfície extra e intraluminal do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> meios seletivos e diferenciais, teste da catalase e coagulase.	(Gorman et al., 1994)

<sup>1</sup> análise microscópica da superfície do cateter; <sup>2</sup> análise microscópica dos microrganismos; seg. externo – segmento externo; seg. ip – segmento intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

**Tabela 2** - Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP (continuação)

Causa de remoção ou análise das amostras (nº de amostras)	Metodologia de avaliação (nº de amostras em que foi identificado biofilme/nº total de amostras)	Microrganismos isolados	Observações	Referência
Ausência de peritonite (1)	Cultura microbiológica (1/1)	<i>Alternaria</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Buchanan et al., 1994)
Peritonite (1)	Cultura microbiológica (1/1) ME (1/1) <sup>1</sup>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do cateter e do extensor; <u>Identificação dos microrganismos:</u> meio seletivo e diferencial.	(Caporale et al., 1996)
Peritonite (1)	Cultura microbiológica (1/1) MEV (1/1) <sup>1</sup>	<i>A. fumigatus</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do seg. externo e análise intraluminal do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Park et al., 1996)
Peritonite (1)	Cultura microbiológica (1/1) ME (1/1) <sup>2</sup>	<i>Fusarium spp.</i>	Análise do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Giacchino et al., 1997)
Peritonite (1)	Cultura microbiológica(1/1) ME (1/1) <sup>1</sup>	<i>Cylindrocarpon lichenicola</i>	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Sharma et al., 1998)

<sup>1</sup> análise microscópica da superfície do cateter; <sup>2</sup> análise microscópica dos microrganismos; seg. externo – segmento externo; seg. ip – segmento intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

Tabela 2 - Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP (continuação)

Causa de remoção ou análise das amostras (n° de amostras)	Metodologia de avaliação (n° de amostras em que foi identificado biofilme/n° total de amostras)	Microorganismos isolados	Observações	Referência
Peritonite (7) IOS (11) Peritonite + IOS (8) Ausência de infecção (19)	Cultura microbiológica (22/45) MEV (n.d.) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas:</u> <i>S. aureus</i> ; <i>Corynebacterium striatum</i> ; <i>Corynebacterium sp.</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. simulans</i> ; <i>Streptococcus viridans</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas:</u> <i>P. aeruginosa</i> ; <u>Fungos:</u> <i>C. albicans</i> ; <i>Aspergillus niger</i> .	Análise dos cuffs do cateteres; <u>Identificação dos microrganismos:</u> API.	(Bayston et al., 1999)
Ausência de infecção (1)	Microscopia de luz (1/1) <sup>1</sup>	<i>Penicillium</i> spp.	Deteção macroscópica de microrganismos na superfície intraluminal do extensor (não analisado) e cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Huang et al., 2000)
Peritonite (36) IOS (29) Ausência de infecção (22)	n.d.	<u>Bactérias Gram-positivas:</u> <i>S. aureus</i> ; <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativas; <i>Streptococcus</i> spp.; <u>Bactérias Gram-negativas:</u> n.d.; <u>Fungos:</u> <i>Candida</i> spp.	Análise dos cuffs e do seg. ip do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> meios de cultura seletivos e diferenciais.	(Rodríguez-Carmona et al., 2000)
Ausência de infecção (1)	Cultura microbiológica (0/1) Microscopia (1/1) <sup>1</sup>	<i>C. albicans</i>	Erosão do cateter devido a colonização microbiana; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Vargemezis et al., 2004)
Peritonite (30) Ausência de infecção (33)	MEV (30/63) <sup>1</sup>	<u>Bactérias Gram-positivas:</u> <i>Staphylococcus</i> spp.; <u>Bactérias Gram-negativas:</u> <i>P. aeruginosa</i> ; <u>Fungos:</u> <i>C. albicans</i> .	Análise da superfície extraluminal do cateter; <u>Identificação dos microrganismos:</u> n.d.	(Nodaira et al., 2008)

<sup>1</sup> análise microscópica da superfície do cateter; <sup>2</sup> análise microscópica dos microrganismos; seg. externo – segmento externo; seg. ip – segmento intraperitoneal; n.d. – não discriminado.

Tabela 2 - Resumo dos estudos efetuados em cateteres e extensores de DP (continuação)

Causa de remoção ou análise das amostras (n° de amostras)	Metodologia de avaliação (n° de amostras em que foi identificado biofilme/n° total de amostras)	Microrganismos isolados	Observações	Referência
Peritonite (1) IOS (1) Ausência de infeção(15)	Cultura microbiológica (11/17) MCLV (9/17) <sup>1</sup>	<i>S. epidermidis</i> ; <i>Micrococcus spp.</i> ; <i>S. lugdunensis</i> ; <i>S. warneri</i> ; <i>Corynebacterium spp.</i> ; <i>Propionibacterium acnes</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; <i>Rothia mucilaginosa</i> ; <i>Streptococcus sanguinis</i> ; <i>S. aureus</i>	Análise extra e intraluminal do seg. ip do cateter; Identificação dos microrganismos: sequenciação do gene 16S rRNA.	(Pihl et al., 2012)
Rotina (55) n.d. (10)	Cultura microbiológica (21/55) e (10/10)	<u>Bactérias Gram-positivas:</u> <i>S. epidermidis</i> ; <i>M. luteus</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>S. capitis</i> ; <i>Corynebacterium spp.</i> ; <i>caprae</i> / <i>S. capitis</i> ; <i>S. hominis</i> ; <u>Bactérias Gram-negativas:</u> <i>Delftia acidovorans</i> ; <i>H. huttinense</i> ; <i>S. haemolyticus</i> ; <i>Sphingomonas</i> ; <i>P. aeruginosa</i> .	Análise da superfície intraluminal dos extensores e seg. externo, análise do <i>cuff</i> intermédio e interno e análise extra e intraluminal do seg. ip do cateter; Identificação dos microrganismos: MALDI-TOF MS.	(Machado, 2012)

<sup>1</sup>análise microscópica da superfície do cateter; <sup>2</sup> análise microscópica dos microrganismos; seg. externo – segmento externo; seg. ip – segmento intraperitoneal ; n.d. – não discriminado.

#### 1.4.4 Impacto das soluções de diálise peritoneal convencionais e biocompatíveis em células planctónicas

Vários autores avaliaram, *in vitro*, o efeito das soluções de DP no crescimento dos microrganismos na forma planctónica (Tabela 3). Estes estudos sugerem que as soluções de DP convencionais e biocompatíveis afetam de forma distinta o crescimento das células planctónicas. Como evidenciado na Tabela 1, as soluções de DP convencionais (ponto 1.2.2) têm um efeito bacteriostático [definido como uma redução inferior a 3 log UFC/mL, comparativamente ao inóculo inicial (Pankey and Sabath, 2004)] no crescimento de *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *Streptococcus sanguinis* (Tabela 3). Adicionalmente, alguns estudos que comparam o efeito de soluções com diferentes concentrações de glucose e pH no crescimento de células planctónicas, sugerem que a concentração de glucose da solução de DP (Verbrugh et al., 1984, McDonald et al., 1986, Calame et al., 1995) e o pH (McDonald et al., 1986, Calame et al., 1995) não influenciam o crescimento dos microrganismos. Por outro lado, Shalit et al. (1985) mostraram, num estudo *in vitro*, que o ajuste do valor do pH da solução de DP para valores próximos do fisiológico, promove o crescimento de *P. aeruginosa*. Similarmente, McCormick and Echols (1987) mostraram que a solução de DP com um valor de pH próximo do fisiológico promove o crescimento de *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (Tabela 3). No entanto, é importante referir que, os estudos realizados *in vivo* mostram que o valor de pH da solução de DP é neutralizado trinta minutos depois da sua introdução na cavidade peritoneal (Duwe et al., 1981). Adicionalmente, após o período de trocas, o efluente de DP apresenta proteínas do hospedeiro na sua composição e concentrações de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  mais baixas (Shalit et al., 1985). Deste modo, o efluente apresenta uma composição diferente das soluções de DP e contrariamente a estas, os estudos publicados sugerem que o efluente suporta o crescimento microbiano, nomeadamente de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* (Tabela 3). De salientar, no entanto, o estudo publicado por Dawson et al. (1985), que sugere que o efluente de DP não suporta o crescimento da bactéria *S. epidermidis*. Relativamente às soluções biocompatíveis o número de estudos disponíveis relativos ao efeito destas soluções no crescimento planctónico dos microrganismos é limitado (Tobudic et al., 2011, Tobudic et al., 2012). No entanto, foi sugerido que as soluções de icodextrina e aminoácidos afetam de forma muito menos acentuada o crescimento de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* (Tobudic et al., 2011) e MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), do que as soluções convencionais (Tobudic et al., 2011, Tobudic et al., 2012).

**Tabela 3** – Resumo dos estudos publicados relacionados com o efeito das soluções de DP em culturas planctónicas

Microrganismos	Meios de cultura	Condições de cultura	Observações	Referência
<i>S. epidermidis</i> <sup>1</sup> <i>S. aureus</i> <sup>1</sup> <i>E. coli</i> <sup>1</sup>	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> e PBS <sup>3</sup> ; <i>Dianeal</i> (1,5%, 2,5% e 4,25% glucose, pH = 5,1/5,5); Efluente de DP <sup>10</sup> .	24 h a 37°C; inóculo inicial: 400 a 800 UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> , promove o crescimento da bactéria <i>E. coli</i> ; <u>Efluente de DP</u> : promove o crescimento das bactérias <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> ; <u>Concentração de glucose</u> : não influencia o crescimento dos microrganismos.	(Verbrugh et al., 1984)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> ; <i>Dianeal</i> (1,5 % glucose, pH= 5,1/5,5); Efluente de DP <sup>10</sup> .	24 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>5</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático; <u>Efluente de DP</u> : promove o crescimento de <i>P. aeruginosa</i> .	(Shalit et al., 1985)
<i>P. aeruginosa</i> <i>S. epidermidis</i>	Meio de controlo: BHI <i>Dianeal</i> (n.d.) Efluente de DP <sup>10</sup> .	72 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>2</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bactericida no crescimento de <i>S. epidermidis</i> ; promove o crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> ; <u>Efluente de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de <i>S. epidermidis</i> e promove o crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> .	(Dawson et al., 1985)
<i>S. epidermidis</i> <sup>1</sup>	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> ; <i>Dianeal</i> (0,5%, 1,5%, 2,5% e 4,25% glucose, pH= 5,2/7,4); Efluente de DP <sup>10</sup> .	24 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>5</sup> a 10 <sup>6</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático; <u>Concentração de glucose e pH</u> : não influencia o crescimento do microrganismo; <u>Efluente de DP</u> : promove o crescimento de <i>S. epidermidis</i> .	(McDonald et al., 1986)

<sup>1</sup>Isolados clínicos; n.d. – não discriminado; <sup>2</sup>*Cation adjusted Muller Hinton Broth*; <sup>3</sup>*Phosphate Buffered Saline*; <sup>4</sup>*Brain Heart Infusion*; <sup>5</sup>*Todd Hewitt Broth*; <sup>6</sup>*Methicillin-sensitive S. aureus*; <sup>7</sup>*Methicillin resistant S. aureus*; <sup>8</sup>*Methicillin-sensitive S. epidermidis*; <sup>9</sup>*Muller Hinton Broth*; <sup>10</sup> Efluente de DP de soluções convencionais.

**Tabela 3** - Resumo dos estudos publicados relacionados com o efeito das soluções de DP em culturas planctónicas (continuação)

Microrganismos	Meios de cultura	Condições de cultura	Observações	Referência
<i>S. epidermidis</i> (MRSE) <sup>1</sup> <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> <i>Dianeal</i> (1,5 % glucose, pH= 7,4 ajustado com NaOH) Efluente de DP <sup>10</sup> .	24 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>7</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : promovem o crescimento de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	(McCormick and Echols, 1987)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Meio de controlo: BHI <i>Dianeal</i> (1,36%; 2,27% e 3,86% de glucose, pH: 5,5); Efluente de DP <sup>10</sup> .	3 h a 37°C; Inóculo inicial: 1×10 <sup>6</sup> CFU/mL	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático; <u>Efluente de DP</u> : promove o crescimento de <i>S. aureus</i> ; <u>Concentração de glucose e pH</u> : não influencia o crescimento do microrganismo.	(Calame et al., 1995)
MSSA <sup>6</sup> (ATCC 29213); MRSA <sup>7</sup> (ATCC 33592); MSSE <sup>8</sup> (ATCC 12228); <i>S. sanguis</i> (ATCC 10556)	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> e THB <sup>5</sup> ; <i>Dianeal</i> (1,5 % glucose; pH= 5,5).	24 h a 37°C e 5 % CO <sub>2</sub> ; inóculo inicial:10 <sup>5</sup> a 10 <sup>6</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de todos os microrganismos testados	(Hermsen et al., 2003)
MSSA <sup>6</sup> (ATCC 29213), MRSA <sup>7</sup> (ATCC 33592) MSSE <sup>8</sup> (ATCC 12228) <i>S. sanguis</i> (ATCC 10556)	Meio de controlo: MHB <sup>9</sup> <i>Dianeal</i> (2,5% de glucose, pH =5,5)	24 h a 37°C; inóculo inicial:10 <sup>5</sup> a 10 <sup>6</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de todos os microrganismos testados	(Hotchkiss et al., 2004)
MSSA <sup>6</sup> (ATCC 29213) MRSA <sup>7</sup> (ATCC 33592)	Meio de controlo: CAMHB; <i>Dianeal</i> PD4 (2,5% de glucose; pH=7,4)	24 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>6</sup> CFU/mL	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de todos os microrganismos testados	(Clouse et al., 2007)

<sup>1</sup>Isolados clínicos; n.d. – não discriminado; <sup>2</sup>Cation adjusted Muller Hinton Broth; <sup>3</sup>Phosphate Buffered Saline; <sup>4</sup>Brain Heart Infusion; <sup>5</sup>Todd Hewitt Broth; <sup>6</sup>Methicillin-sensitive *S. aureus*; <sup>7</sup>Methicillin resistant *S. aureus*; <sup>8</sup>Methicillin-sensitive *S. epidermidis*; <sup>9</sup>Muller Hinton Broth; <sup>10</sup>Efluente de DP de soluções convencionais.



**Tabela 3** - Resumo dos estudos publicados relacionados com o efeito das soluções de DP em culturas planctónicas (continuação)

Microrganismos	Meios de cultura	Condições de cultura	Observações	Referência
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923) <i>S. epidermidis</i> (ATCC 35983) <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27583) <i>C. albicans</i> (ATCC 90029)	Meio de controlo: CAMHB <sup>2</sup> e <i>Sabouraud bouillon</i> ; <i>Dianeal</i> PD4; <i>Physioneal</i> 40; <i>Extraneal</i> ; <i>Nutrineal</i> PD4;	24 h a 37°C; inóculo inicial: 10 <sup>6</sup> UFC/mL;	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático no crescimento de todos os microrganismos testados: redução inferior para as bactérias <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>P. aeruginosa</i> nas soluções biocompatíveis	(Tobudic et al., 2011)
MRSA <sup>7</sup>	Meio de controlo: CAMHB; <i>Dianeal</i> PD4 <i>Physioneal</i> 40 <i>Extraneal</i> <i>Nutrineal</i> PD4	24 h a 37°C; inóculo inicial: 1-5 × 10 <sup>6</sup> CFU/mL)	<u>Solução de DP</u> : efeito bacteriostático inferior nas soluções nas soluções biocompatíveis ( <i>Extraneal</i> e <i>Nutrineal</i> )	(Tobudic et al., 2012)

<sup>1</sup>Isolados clínicos; n.d. – não discriminado; <sup>2</sup>*Cation adjusted Muller Hinton Broth*; <sup>3</sup>*Phosphate Buffered Saline*; <sup>4</sup>*Brain Heart Infusion*; <sup>5</sup>*Todd Hewitt Broth*; <sup>6</sup>*Methicillin-sensitive S. aureus*; <sup>7</sup>*Methicillin resistant S. aureus*; <sup>8</sup>*Methicillin-sensitive S. epidermidis*; <sup>9</sup>*Muller Hinton Broth*; <sup>10</sup> Efluente de DP de soluções convencionais.

#### 1.4.5 Impacto das soluções de diálise peritoneal convencionais e biocompatíveis na regulação do biofilme

Os estudos que avaliam o efeito das soluções de DP e do efluente (soluções convencionais) na adesão microbiana e consequente formação de biofilme são escassos. No entanto, os estudos disponíveis têm sugerido que tanto as soluções de DP como o efluente representam um papel importante na regulação do biofilme.

Um estudo *in vitro* realizado por Gorman et al. (1997) mostra que a adesão de isolados clínicos de *S. epidermidis* em superfícies de cateteres de silicone revestidos com efluente de DP de soluções bioincompatíveis é inferior à adesão deste microrganismo em superfícies revestidas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Por outro lado, um estudo realizado por Yanagisawa et al. (2004) demonstrou que a adesão de estirpes de referência de *S. aureus* e *S. epidermidis* ao material de silicone do cateter de DP, previamente revestido com efluente de DP de soluções bioincompatíveis, é maior do que a adesão verificada com o revestimento do cateter com solução de DP bioincompatível.

Adicionalmente, têm sido publicados estudos que avaliam a influência das soluções de DP na adesão microbiana e na formação de biofilme com recurso ao dispositivo de *Robbins* modificado (Dasgupta et al., 1990, Dasgupta et al., 1994 ). Sumariamente, este dispositivo consiste num tubo de acrílico que possui ao longo do seu comprimento orifícios que permitem a introdução de amostras de materiais, nomeadamente discos de silicone, para a realização de ensaios em condições dinâmicas de fluido, simulando assim as condições fisiológicas do organismo. Especificamente, para o estudo da influência das soluções de DP na formação de biofilme, os sacos da solução de DP (ou efluente), inoculados com microrganismos com interesse em testar, são conectados a este dispositivo e infundidos por ação de uma bomba peristáltica, para posterior avaliação da adesão microbiana aos discos de silicone (Dasgupta et al., 1992). A partir da utilização do dispositivo de *Robbins* modificado, tem sido sugerido que as espécies de *S. epidermidis* aderem aos discos de silicone e formam biofilme nas soluções de DP bioincompatíveis (Dasgupta et al., 1990, Dasgupta et al., 1994 ), embora a adesão microbiana seja superior no efluente de DP (Dasgupta et al., 1994 ). Por outro lado, a adesão da bactéria *P. aeruginosa* é superior à da bactéria *S. epidermidis* quer na solução de DP quer no efluente. Adicionalmente, estes autores demonstraram que a bactéria *E. coli* apresenta uma fraca capacidade de adesão na solução de DP e no efluente (Dasgupta et al., 1994 ), comparativamente às espécies *S. epidermidis* e *S. aureus*. Estes resultados sugerem que a

formação de biofilme é dependente da espécie, e que a capacidade de formação de biofilme das bactérias *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* nas soluções de DP e efluente pode justificar o facto de estas espécies serem frequentemente detetadas em cateteres de DP (Tabela 2).

De notar que não foram publicados até à data estudos que avaliem a influência das soluções de diálise biocompatíveis na adesão microbiana e consequente formação de biofilme.

## 1.5 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho consistiu na avaliação e caracterização do biofilme associado a cateteres de DP e na avaliação de factores que possam influenciar a regulação do biofilme. Os objetivos específicos incluíram: o isolamento, semi-quantificação e na identificação de microrganismos associados a extensores e cateteres de DP, removidos de pacientes em programa de DP no Hospital de Santo António e no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia. Adicionalmente, foi avaliado o efeito de soluções de DP, usadas na prática clínica, em células planctónicas e na formação de biofilme de microrganismos clinicamente relevantes.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Microrganismos

Para a avaliação do efeito das soluções de DP no crescimento dos microrganismos foram utilizados dezasseis isolados clínicos, a saber: *S. epidermidis* (n=10), *S. caprae/S.capitis* (n=2), *S. haemolyticus* (n=3) e *S. hominis* (n=1). Os isolados clínicos PD62.7, PD64.6, PD81.1 e PD85.8 foram recuperados dos segmentos externos e segmentos intraperitoneais dos cateteres permanentes e identificados por MALDI-TOF MS no decurso deste estudo (ponto 2.5.3 – 2.5.8). Os restantes isolados clínicos utilizados foram obtidos no âmbito do projeto “*Insights into peritoneal dialysis catheter associated biofilms*” (Tabela 4). A escolha destas espécies está relacionada com o fato de as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas estarem frequentemente associadas ao biofilme de cateteres e a infeções em DP (Fried and Piraino, 2009).

**Tabela 4** – Isolados clínicos utilizados na avaliação do efeito de soluções de DP no crescimento microbiano

Espécie	Designação	Origem
<i>S. epidermidis</i>	PD6	segmento externo
	PD20.8	
	PD37.3	
	PD10.2	segmento intraperitoneal
	PD11.4	
	PD36.1	
	PD45.8	
	PD62.7 <sup>1</sup>	
	PD64.6 <sup>1</sup>	
	PD85.8 <sup>1</sup>	
<i>S. caprae/S.capitis</i>	PD42.5	segmento intraperitoneal
	PD81.1 <sup>1</sup>	segmento externo
<i>S. haemolyticus</i>	PD10.1	segmento externo
	PD50.1	
<i>S. hominis</i>	PD20.7	segmento intraperitoneal
	PD37.7	segmento intraperitoneal

<sup>1</sup>Isolados clínicos recuperados no decurso deste estudo.

## 2.2 Meios de cultura

Neste estudo foram utilizados os seguintes meios para a manutenção, cultivo e/ou recuperação dos microrganismos: i) *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA, Biokar Diagnostics®); ii) *Luria Bertani Agar* (LBA, Liofilchem®); iii) *Nutrient Agar* (NA, Liofilchem®); iv) *Tryptic Soy Agar* (TSA, Liofilchem®); v) *Tryptic Soy Broth* (TSB, Liofilchem®); vi) TSB *Tween* [TSB suplementado com 1% (v/v) de *Tween* 20 (Sigma)] e vii) *Tryptose Blood Agar* [TBA, Oxoid® enriquecido com 7% (v/v) de sangue desfibrinado de carneiro (Probiológica)]. Para a identificação presuntiva dos microrganismos isolados dos extensores e cateteres permanentes de DP (ponto 2.5.8.1) foram usados os seguintes meios seletivos e diferenciais: i) *Mannitol Salt Agar* (MSA, Liofilchem®) e ii) *Eosin Methylene Blue Levine Agar* (EMBA, Liofilchem®). Adicionalmente, para o processo de criopreservação dos microrganismos (ponto 2.4) foi utilizado TSB suplementado com 15% (v/v) de glicerol (Applichem®). Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Para a avaliação da influência das soluções de DP nas células planctônicas e na regulação do biofilme (ponto 2.6) foram utilizadas as soluções de DP discriminadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Composição das soluções de diálise peritoneal <sup>1</sup>

	Solução A (biocompatível)	Solução B (biocompatível)	Solução C (biocompatível)	Solução D (bioincompatível)
<b>Eletrólitos (mmol/L)</b>				
Sódio	133	132	134	134
Cálcio	1,75	1,25	1,75	1,75
Magnésio	0,25	0,25	0,5	0,5
Cloro	96	95	104,5	103,5
<b>Tampão</b>				
Lactato	40	15	0	35
Bicarbonato	0	25	34	0
pH	~5,5	~7,4	~7,4	~5,5
<b>Agente osmótico/(%)</b>	icodextrina/7,5	glucose /1,5	glucose/1,5	glucose/1,5

<sup>1</sup> Os dados relativos à composição das soluções foram obtidos dos folhetos informativos disponíveis nos sacos das soluções de DP.

## 2.3 Manutenção dos microrganismos

Os microrganismos isolados dos extensores e cateteres de DP (ponto 2.5) foram cultivados em BHIA a 37°C durante 24 h e mantidos a 4°C durante um período não superior a um mês.

## **2.4 Criopreservação dos microrganismos**

Os microrganismos isolados dos extensores e cateteres de DP (ponto 2.5) foram criopreservados em TSB glicerol de acordo com a metodologia descrita por Perry (1998) e armazenados a -80°C.

## **2.5 Recuperação, isolamento e identificação de microrganismos aderidos a extensores e cateteres permanentes de DP**

A análise microbiológica efetuada teve como objectivo recuperar, isolar e identificar os microrganismos dos extensores e dos diferentes elementos do cateter (Figura 2). A metodologia utilizada foi previamente validada por Machado (2012).

### **2.5.1 Pacientes e amostras**

No período do estudo (setembro de 2012 – junho de 2013) foram analisados 63 extensores, removidos por rotina e 28 cateteres permanentes de DP (cateter *Tenckhoff* com segmento enrolado e duplo *cuff*) (Figura 2), removidos por indicação clínica de pacientes adultos em programa de DP no Centro Hospitalar do Porto (CHP) e Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho. Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética do Departamento de Ensino Formação e Investigação do CHP [(referência PI 243/11 (153-DEFI/229-CES)].

Após a remoção as amostras foram transportadas em sacos estéreis e mantidas a 4°C durante um período não superior a 24 h. Para a cultura microbiológica do cateter permanente de DP (pontos 2.5.3 – 2.5.7), este foi dividido em quatro segmentos: segmento externo, *cuff* intermédio, *cuff* interno e segmento intraperitoneal (Figura 2), sempre que aplicável.

### **2.5.2 Processamento dos extensores e avaliação da eficácia do álcool 70% (v/v) como agente desinfetante**

Tendo em conta que a superfície extraluminal dos extensores está em contacto com a flora da pele do paciente (Figura 2), foi necessária a realização da descontaminação dessa superfície. Adicionalmente foi avaliada a eficiência do agente desinfetante utilizado no processo, o etanol a 70%. Resumidamente, foi realizado o rolamento do extensor na superfície de uma placa de NA, e em seguida o extensor foi colocado numa solução de etanol a 70% durante 10 min para a descontaminação da superfície extraluminal. Após esse período, procedeu-se à sua passagem em água esterilizada e imersão em água esterilizada por um período de 5 min. Por último, foi realizado novamente o rolamento do extensor na superfície de uma placa de NA. As placas de cultura foram incubadas a 37°C durante 18 a 72 h, e após esse

período foi realizada a contagem das unidades formadoras de colónias (UFC). A eficácia do agente desinfetante foi determinada com base na redução logarítmica do número de UFC antes e após o processo de descontaminação (Donlan et al., 2001). O limite de deteção do método de análise semi-quantitativa é de 1 UFC por extensor e por segmento externo.

Após o processo de descontaminação, o extensor foi cortado longitudinalmente com o auxílio de uma lâmina esterilizada. Um dos fragmentos foi utilizado para cultura microbiológica. Para tal, a matéria amorfa visível da superfície intraluminal do extensor foi raspada com uma lâmina e ressuspensa em 400 µL de NaCl 0,9% (p/v) (Liofilchem®). A partir da suspensão obtida realizou-se a análise semi-quantitativa [por sonicação (ponto 2.5.6 b) e qualitativa (ponto 2.5.6 c)].

### **2.5.3 Processamento do segmento externo dos cateteres de DP**

A análise microbiológica do segmento externo dos cateteres permanentes de DP foi realizada conforme descrito anteriormente para os extensores (ponto 2.5.2).

### **2.5.4 Processamento dos *cuffs* dos cateteres permanentes de DP**

O *cuff* intermédio e o *cuff* interno foram processados de acordo com a metodologia descrita nas análises semi-quantitativa [por rolamento (ponto 2.5.6 a) e por sonicação (ponto 2.5.6 b) e qualitativa (ponto 2.5.6 c)].

### **2.5.5 Processamento do segmento intraperitoneal dos cateteres permanentes de DP**

O segmento intraperitoneal foi cortado longitudinalmente com o auxílio de uma lâmina esterilizada. Um dos fragmentos foi ressuspensa em 4 mL de TSB e processado de acordo com a metodologia descrita nas análises semi-quantitativa [por sonicação (ponto 2.5.6 b) e qualitativa (2.5.6 c)].

### **2.5.6 Análise semi-quantitativa e qualitativa dos segmentos**

#### **a) Análise semi-quantitativa por rolamento**

A análise por rolamento dos *cuffs* foi realizada de acordo como descrito por Maki et al. (1977), efetuando o rolamento do segmento na superfície de uma placa de BHIA pelo menos dezasseis vezes. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 72 h. De seguida, o *cuff* foi colocado em 4 mL de TSB para a análise semi-quantitativa por sonicação (ponto 2.5.6 b).

### **b) Análise semi-quantitativa por sonicação**

Para a análise semi-quantitativa por sonicação as culturas obtidas (ponto 2.5.2, ponto 2.5.3, ponto 2.5.5 e ponto 2.5.6 a) foram sonicadas (*Sonicor, UltraSonic Bath 50-60 Hz*) durante 5 min. Após a sonicação, 100 µL da suspensão (ou das respectivas diluições efetuadas em NaCl 0,9%) foram espalhados em BHIA. As placas foram incubadas a 37°C durante 18 a 72 h.

### **c) Análise qualitativa**

Para a análise qualitativa do extensor e do segmento externo foram transferidos 100 µL da suspensão obtida após a análise semi-quantitativa (ponto 2.5.6 b) para 4 mL de TSB. De seguida estas suspensões, bem como as obtidas após a análise semi-quantitativa dos *cuffs* e do segmento intraperitoneal (ponto 2.5.6 b) foram incubadas a 37°C durante 18 h a 120 rpm em agitador orbital (N-BIOTEK). Após o período de incubação, cada suspensão foi centrifugada a 7830 rpm durante 10 min (centrífuga 5439 R, Fisher Scientific), o sobrenadante decantado e o sedimento ressuspensão em NaCl 0,9% e posteriormente espalhado em BHIA. As placas foram incubadas a 37°C, durante 18 a 72 h.

## **2.5.7 Avaliação das colónias crescidas em meio de cultura**

A leitura semi-quantitativa das placas foi realizada através da enumeração das UFC e análise morfológica das colónias (cor, tamanho e elevação). Os resultados foram expressos em UFC/segmento. O limite de deteção do método de análise semi-quantitativa é de 4 UFC por extensor e por segmento externo, 1 e 40 UFC por *cuff* para a análise semi-quantitativa por *rolling* e por sonicação, respetivamente e 40 UFC por segmento intraperitoneal. No caso das placas resultantes da análise qualitativa, os resultados foram reportados como crescimento positivo ou negativo.

## **2.5.8 Identificação os microrganismos aderidos a extensores e cateteres de DP**

### **2.5.8.1 Identificação presuntiva dos microrganismos com base em meios de cultura**

A identificação presuntiva dos microrganismos previamente recuperados e isolados (ponto 2.5) foi baseada no seu comportamento em meios seletivos e diferenciais. Para isso, os microrganismos foram repicados em EMBA e MSA e as placas foram incubadas durante 18 a 24 h e 18 a 48 h, respetivamente, a 37°C. Após o período de incubação, em cada meio de cultura



foram avaliados os seguintes parâmetros: crescimento, morfologia das colónias (tamanho e cor) e alteração da cor do meio (quando aplicável).

### 2.5.8.2 Identificação dos microrganismos por MALDI-TOF MS

Para a identificação de microrganismos através da técnica de MALDI-TOF MS, as amostras são dissolvidas e co-cristalizadas numa matriz, geralmente um ácido orgânico (Lewis et al., 2000). De seguida, as moléculas das amostras são ionizadas e vaporizadas através da incidência de um feixe de um laser. As moléculas ionizadas são aceleradas e separadas de acordo com a massa/carga, e quando chegam ao detetor o seu tempo de deslocamento é registado, gerando um espectro de massa no processador de dados. Este espectro é tratado e comparado com espectros de espécies conhecidas armazenados numa base de dados, permitindo a identificação dos microrganismos (Marvin et al., 2003). Numa análise de MALDI-TOF MS as células podem ser utilizadas intactas, sem uma preparação prévia da amostra (Bizzini et al., 2010). No entanto, alguns autores sugerem que a realização de um pré-tratamento das amostras, por exemplo com ácido fórmico, especificamente para os fungos, permite aumentar a eficiência da técnica (Santos et al., 2011, Pinto et al., 2011).

Para a sua identificação os microrganismos obtidos nas análises anteriores (ponto 2.5.6 e ponto 2.5.7) foram cultivados em TSA sangue. Para a calibração externa do MALDI-TOF MS foi utilizada a estirpe *E. coli* DH5- $\alpha$ , cedida pela Micoteca da Universidade do Minho, *IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering*, cultivada em LBA. Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24 h.

A identificação dos microrganismos foi efetuada, numa primeira abordagem, pelo método direto (Haigh et al., 2011), que consistiu na transferência de uma colónia para um poço da placa de MALDI-TOF MS (FlexiMass). De seguida, foram colocados 0,5  $\mu$ L de solução matriz 2,5-ácido dihidroxibenzóico (DHB) [com uma concentração de 75 mg/ml de DHB (Sigma) em etanol [Sigma]/água/acetoneitrilo (Sigma) [1:1:1] com 0,03% (v/v) ácido trifluoroacético (Sigma)]. Para cada microrganismo foram realizadas três réplicas dependentes. A identificação foi considerada válida para percentagens de confiança superiores a 85% em pelo menos duas das réplicas realizadas. Para percentagens inferiores a 85% os microrganismos foram novamente testados, utilizando uma segunda abordagem que consistiu num pré-tratamento da amostra com ácido fórmico (Haigh et al., 2011, Santos et al., 2011). A metodologia utilizada foi realizada de

acordo como descrito por Santos et al. (2011), com as seguintes modificações. Resumidamente, uma colónia foi transferida para um *ependorf*, e em seguida foram adicionados 3 µL de ácido fórmico a 70% (v/v) (Sigma). A suspensão celular obtida foi vortexada e sonicada durante 5 min num banho de ultra-sons. De seguida foram colocados 0,5 µL desta suspensão no poço da placa do MALDI-TOF MS e deixada a secar à temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 0,5 µL da solução de matriz DHB. Para cada microrganismo foram realizadas três réplicas dependentes.

As amostras foram analisadas num MALDI-TOF MS Axima™ Confidence (Shimadzu) equipado com um laser de nitrogénio com radiação de emissão a 337 nm. Os espectros foram obtidos no intervalo de massas de 2000 a 20000 Da em modo linear (Santos et al., 2011). Cada espectro foi gerado com base em pelo menos 50 pulsos de laser por réplica. Os espectros de massa gerados foram analisados com o *software* SARAMIS™ (Anagnos TecmbH).

## **2.6 Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas e biofilmes de bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas recuperadas de cateteres de diálise peritoneal**

Os ensaios realizados para a avaliação do efeito das soluções de DP no crescimento microbiano na forma planctónica e em biofilme foram realizados de acordo como o descrito por Harrison et al. (2010). Para cada ensaio foram utilizadas duas placas de 96 poços de poliestireno, especificamente para a avaliação: i) do número de células planctónicas e de biofilme cultiváveis (ponto 2.6.2.1); e ii) da biomassa total (ponto 2.6.2.2).

Primeiramente, foi realizado o revestimento dos poços. Para tal, foram adicionados 150 µL de cada uma das condições a avaliar, a saber: TSB (controlo positivo), NaCl (controlo negativo) e cada uma das soluções de diálise peritoneal (ponto 2.2) aos poços das placas. Adicionalmente, foram adicionados aos poços das placas os brancos correspondentes a cada condição. A cada uma das condições foi adicionado 1% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco) (Wagner et al., 2011). Foram realizadas quatro réplicas de cada uma das condições testadas. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h em condições estáticas com 5% CO<sub>2</sub>, que representam as condições fisiológicas na cavidade peritoneal (Wilcox et al., 1990). Paralelamente, os isolados clínicos utilizados (ponto 2.1) foram cultivados em TSA e incubados a 37°C durante 24 h.

### 2.6.1 Preparação do inóculo

Após o período de incubação, os poços das placas foram lavados com NaCl 0,9%, e em seguida, foi preparado um inóculo a partir das colónias crescidas em TSA (ponto 2.6), em NaCl 0,9% até uma concentração equivalente a 1.0 da escala de Mcfarland (correspondente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL). Finalmente, foram realizadas as diluições apropriadas em TSB, NaCl 0,9% e em cada uma das soluções de DP a fim de se obter um inóculo final de  $1 \times 10^7$  UFC/mL. Por último, as placas de poços foram inoculadas com 150  $\mu$ L das suspensões celulares resultantes e dos respectivos brancos e incubadas a 37°C durante 24 h em condições estáticas com 5% CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, a partir do inóculo preparado foi removida uma alíquota de 100  $\mu$ L, que foi diluída serialmente em NaCl 0,9%, com o objetivo de avaliar o número de UFC e confirmar a concentração do inóculo final. Para tal foi utilizado o método da gota, que consistiu na distribuição de quatro gotas de 10  $\mu$ L das diluições em TSA. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 h. Para cada ensaio foram realizadas quatro réplicas dependentes.

### 2.6.2 Recuperação da fração das células planctónicas e do biofilme

Após o período de incubação (ponto 2.6.1), o sobrenadante (obtido de uma das placas), correspondente à fração de células planctónicas, foi cuidadosamente recolhido, sonificado durante 5 min e diluído serialmente em NaCl 0,9%. As suspensões resultantes foram reservadas para a análise do número de células cultiváveis (ponto 2.6.2.1). Em seguida, as placas contendo os biofilmes foram cuidadosamente lavadas com NaCl 0,9%, com o objetivo de remover as células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de TSB *Tween* para a recuperação do biofilme. Após a sonicação (20 min em banho de ultra-sons), os poços foram raspados e a suspensão recolhida, correspondente à fração de células do biofilme, foi diluída serialmente em NaCl 0,9%. As suspensões resultantes foram reservadas para a análise do número de células cultiváveis do biofilme (ponto 2.6.2.1). Finalmente, a placa de 96 poços foi reservada para a realização do controlo do procedimento de raspagem através de coloração por violeta cristal 1% (v/v) (ponto 2.6.2.2).

O sobrenadante correspondente à placa reservada para a avaliação da biomassa total (ponto 2.6) foi descartado e os poços foram lavados cuidadosamente com NaCl 0,9% para a posterior avaliação da biomassa total por coloração por violeta cristal 1% (v/v) (ponto 2.6.2.2).

### 2.6.2.1 Avaliação do número de células cultiváveis

Para a determinação do número de UFC das células planctônicas e o biofilme foi utilizado o método da gota de acordo com o descrito no ponto 2.6.1. Foram realizados dois ensaios independentes com quatro réplicas para cada uma das condições testadas.

### 2.6.2.2 Avaliação da biomassa total por coloração violeta cristal 1% (v/v)

Para a avaliação da biomassa total por coloração violeta cristal 1% (v/v), as placas de 96 poços, obtidas no ponto 2.6.2, foram deixadas a secar durante 60 min a 60°C. Em seguida, foram adicionados 150 µL de cristal violeta 1% (v/v) (Merck) durante 5 min. Após esse período, o violeta cristal foi removido e os poços foram lavados com água destilada duas vezes e deixados a secar durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 150 µL de etanol (Sigma) para dissolver o violeta cristal. Por último, foram removidos 100 µL da solução obtida e foi lida a absorvância a 570 nm (Tecan, Sunrise<sup>TM</sup>) (Kwasny and Opperman, 2010). Foram realizados dois ensaios independentes com quatro réplicas para cada uma das condições testadas.

## 2.7 Análise estatística

Para a avaliação do efeito das soluções de DP estudadas em culturas planctônicas e biofilmes de bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas foi efetuado o teste *Kruskal-Wallis*. Este teste foi realizado com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). A análise estatística foi realizada com recurso ao software GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 (2007) para o *Windows*.

### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação da eficácia do álcool 70% (v/v) como agente desinfetante

Como a superfície extraluminal dos extensores e segmentos externos está em contacto com a flora normal da pele foi necessário realizar a sua descontaminação com álcool 70% (v/v) (ponto 2.5.2). Assim, e tendo em conta que a eventual presença de microrganismos cultiváveis aderidos à superfície extraluminal destes segmentos pode representar uma fonte de contaminação, considerou-se necessário avaliar a eficácia álcool na erradicação dos microrganismos. Esta avaliação foi realizada com base na redução logarítmica do número de UFC antes e após o processo de descontaminação (ponto 2.5.2). Os resultados obtidos para a descontaminação destas amostras sugerem que o álcool a 70% é eficaz na erradicação de microrganismos cultiváveis (Tabela 6), tendo sido obtido um máximo de redução logarítmica de 2,8 e 2,7 para os extensores e segmentos externos, respetivamente. Adicionalmente, é importante referir nas amostras para as quais foram detetados microrganismos após o processo de descontaminação não foram observadas culturas intraluminais positivas (pontos 2.5.2 e 2.5.3).

**Tabela 6** - Resultados obtidos para a descontaminação dos extensores e segmentos externos

Amostras (n)	Redução logarítmica <sup>1</sup> (média±desvio padrão)	Erradicação total dos microrganismos (%)
Extensor (36)	1,9 ± 0,9	61
Segmento externo (14)	0,72 ± 0,96	71

<sup>1</sup>Em 22 dos extensores e 10 dos segmentos externos não foram recuperados microrganismos após o processo de descontaminação com álcool 70%. Assim, para o cálculo do valor da redução logarítmica foi considerado o valor 0,5 para todos os valores de 0 (microrganismos não detectados). Adicionalmente, quando observado o crescimento confluyente dos microrganismos (UFC >300) foi considerado o valor 1500 UFC.

### 3.2 Recuperação, isolamento e identificação de microrganismos aderidos a extensores e cateteres permanentes de DP

Um dos objetivos deste estudo consistiu na caracterização da composição microbiológica de biofilmes associados a extensores e cateteres permanentes de DP, através da utilização de métodos de cultura semi-quantitativos e qualitativos (ponto 2.5.2 a ponto 2.5.7). Adicionalmente, os microrganismos recuperados das amostras foram identificados com recurso à técnica de MALDI-TOF MS (ponto 2.5.8).

#### 3.2.1 Extensores

Os resultados obtidos através da análise semi-quantitativa e qualitativa de 63 extensores de DP (Figura 2) revelaram a presença de microrganismos em 11% das amostras. Na Tabela 7 são apresentados os resultados relativos às amostras em que foram detetados microrganismos pela análise microbiológica.

No que respeita à densidade celular encontrada nos extensores, a análise semi-quantitativa permitiu detetar em 8% das amostras entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$  e entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5 \text{ UFC}/\text{segmento}$  apenas para a amostra 283. Foi possível verificar que a análise qualitativa permitiu a deteção de microrganismos na amostra 212 e 227, para as quais a análise semi-quantitativa se encontrou abaixo do limite de deteção (Tabela 7).

Como evidenciado na Tabela 7, a análise microbiológica dos extensores permitiu a recuperação de 9 isolados clínicos. Todos os microrganismos identificados por MALDI-TOF MS (n=8) são bactérias, das quais 50% correspondem a bactérias Gram-positivas. Dentro das bactérias Gram-positivas identificadas, *M. luteus* foi a bactéria predominante (50%). Relativamente às bactérias Gram-negativas, a mais comum foi a bactéria *Sphingomonas* spp. (50%). Dos isolados recuperados, o microrganismo relativo à amostra 227 não foi identificado por MALDI-TOF MS. Adicionalmente, não foi possível obter uma identificação presuntiva deste isolado, através dos meios seletivos e diferenciais utilizados.

**Tabela 7** – Resultados obtidos pela análise semi-quantitativa e qualitativa em extensores para os quais foram detetados microrganismos através da análise microbiológica

ID	Análise semi-quantitativa	Análise qualitativa
	(UFC/extensor) <sup>1</sup> (Microrganismo)	(Positiva/Negativa) (Microrganismo)
212	(+) <i>Sphingomonas</i> spp.	Negativa
	(-)	Positiva ( <i>Burkholderia</i> spp.)
221	(+) <i>M. luteus</i>	Negativa
227	(-)	n.i.
241	(+) <i>D. acidovorans</i>	Negativa
	(+) <i>Sphingomonas</i> spp.	
242	(+) <i>S. epidermidis</i>	Negativa
283	(+++) <i>E. faecalis</i>	Negativa
286	(+) <i>M. luteus</i>	Negativa

ID- Identificação da amostra; n.i. – não identificado; (-): inferior ao limite de deteção (< 4 UFC/extensor); (+): 1 ≤ UFC/extensor ≤ 100; (++) 100 < UFC/extensor ≤ 300; (+++): 300 < UFC/extensor ≤ 3×10<sup>5</sup>.

### 3.2.2 Cateteres permanentes

Neste trabalho foram analisados todos os segmentos disponíveis de 28 cateteres permanentes de DP, especificamente: 26 segmentos externos, 23 *cuffs* intermédios, 28 *cuffs* internos e 28 segmentos intraperitoneais. Na Figura 4 estão representados os resultados, em termos de distribuição, diversidade e densidade celular dos microrganismos, relativos aos cateteres permanentes em que foram detetados microrganismos pela análise microbiológica.

No que diz respeito à distribuição dos microrganismos nos diferentes segmentos do cateter permanente, os resultados mostram que a análise microbiológica efetuada permitiu a deteção de microrganismos, em pelo menos um dos segmentos, em 24 cateteres permanentes (correspondente a 86% do total dos cateteres permanentes) (Figura 4). Considerando os cateteres permanentes para os quais foram detetados microrganismos, pode-se verificar que em 21% dos cateteres foram detetados microrganismos em todos os segmentos analisados (amostras 224, 230, 272 e 281 e 304) (Figura 4). Adicionalmente, 25% dos cateteres permanentes encontram-se exclusivamente colonizados num dos segmentos (amostras 238, 243, 244, 269, 291, 307) (Figura 4). De notar que para as últimas amostras mencionadas o segmento colonizado foi o *cuff* intermédio ou o *cuff* interno. De facto, na Figura 4, torna-se evidente que os segmentos mais comumente colonizados são os *cuffs*, tendo sido isolados

deste segmento do cateter permanente 58 isolados clínicos (correspondente a 71% do total dos isolados clínicos).

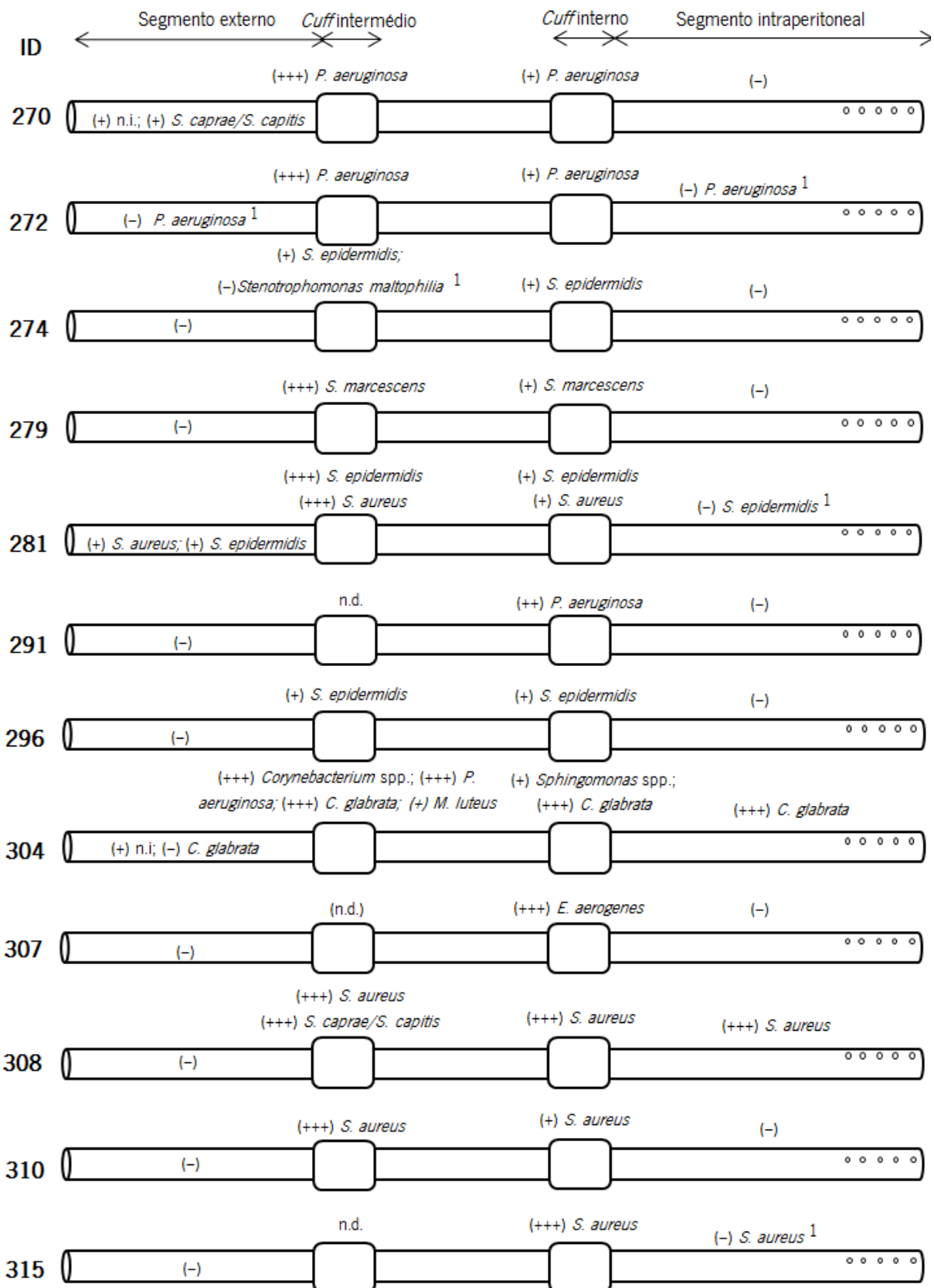
Relativamente à densidade celular, e considerando todos os segmentos externos analisados (n=26), a partir da análise semi-quantitativa obtiveram-se em 19% das amostras entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$ . Especificamente, para a amostra 224 a análise semi-quantitativa permitiu detetar entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$ . A análise semi-quantitativa encontrou-se abaixo do limite de deteção para 77% dos segmentos externos. No caso dos *cuffs* intermédios (n=23), através da análise semi-quantitativa foi observada uma densidade celular entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$  em 13% das amostras, entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$  UFC em 48% das amostras e entre  $3 \times 10^5 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^8$  em 9% das amostras. Especificamente, para a amostra 212 foram obtidas entre  $100 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 300$ . A análise semi-quantitativa encontrou-se abaixo do limite de deteção em 26% dos *cuffs* intermédios. Considerando o *cuff* interno (n=28), foram obtidos em 43% das amostras entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$  UFC/segmento, em 7% das amostras entre  $100 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 300$  UFC/segmento, em 21% das amostras entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$  UFC/segmento e para a amostra 245 entre  $3 \times 10^5 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^8$ . A análise semi-quantitativa encontrou-se abaixo do limite de deteção em 25% dos *cuffs* internos. Finalmente, em 14% dos segmentos intraperitoneais (n=28) foram detetadas entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$  UFC/segmento. Adicionalmente, nas amostras 224 e 237 foram obtidas entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$  UFC/segmento e entre  $100 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 300$  UFC/segmento, respetivamente. A análise semi-quantitativa encontrou-se abaixo do limite de deteção para 79% dos segmentos intraperitoneais.

A técnica de MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 75 dos 82 isolados clínicos recuperados dos cateteres permanentes. As espécies maioritariamente detetadas foram bactérias (93%), das quais 67% correspondem a bactérias Gram-positivas. Dentro das bactérias Gram-positivas, as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas, foram as mais comumente detetadas, correspondendo a 38%. De referir, no entanto, que dentro das bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, a bactéria *S. epidermidis* foi a mais comum (89%). Considerando ainda as bactérias Gram-positivas, foram detetadas espécies de *S. aureus* (28%), seguidas das espécies de *Corynebacterium* (13%), *M. luteus* (11%), *Bacillus* (6%) *Streptococcus* e *Enterococcus* (2% cada). Relativamente às bactérias Gram-negativas, as bactérias da espécie *P. aeruginosa* foram as mais comuns (74%), seguidas das bactérias



*Sphingomonas spp.* e *S. marcescens* (9% cada). No que respeita às espécies de leveduras identificadas, que representam 7% dos isolados clínicos, foram detetadas espécies de *Candida* não *albicans*, nomeadamente *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Considerando cada um dos segmentos do cateter permanente (Figura 4), os resultados obtidos permitem observar que a espécie *S. epidermidis* foi a bactéria Gram-positiva mais comumente detetada (30% dos *cuffs* intermédios, 25% dos *cuffs* internos e 12% dos segmentos intraperitoneais) e a espécie *P. aeruginosa* foi a bactéria Gram-negativa predominante (14% dos segmentos externos, 30% *cuffs* intermédios, 21% dos *cuffs* internos e 12% dos segmentos intraperitoneais). Relativamente à identificação presuntiva dos sete isolados clínicos não identificados por MALDI-TOF MS, os meios seletivos e diferenciais utilizados possibilitaram a identificação presuntiva de três isolados ao nível da espécie, *S. aureus* (amostras 225 e 237) e *S. epidermidis* (amostra 270) e um isolado ao nível do género, *Staphylococcus* (amostra 213). Por outro lado, para três isolados relativos às amostras 237 e 244 e 304 não foi possível obter uma identificação presuntiva através dos meios seletivos e diferenciais utilizados.





**Figura 4** - Representação esquemática da distribuição diversidade e densidade celular de microrganismos detetados em cateteres de DP através de cultura microbiológica [Esquema adaptado de (Pihl et al., 2012)] (continuação).

ID- Identificação da amostra; n.d. - não disponível; n.i. - não identificado por MALDI-TOF MS; <sup>1</sup> - detetado apenas pelo método qualitativo; (-) inferior ao limite de deteção; (+) -  $1 \leq \text{ufc/segmento} \leq 100$ ; (++) -  $100 < \text{ufc/segmento} \leq 300$ ; (+++) -  $300 < \text{ufc/segmento} \leq 3 \times 10^5$ ; (++++) -  $3 \times 10^5 < \text{ufc/segmento} \leq 3 \times 10^8$ .

Como evidenciado na Figura 5, a análise qualitativa dos segmentos dos cateteres possibilitou a observação de culturas positivas em 19% dos segmentos externos, 65% dos *cuffs* intermédios, 46% dos *cuffs* internos e 32% dos segmentos intraperitoneais. Especificamente, a análise qualitativa permitiu a deteção de microrganismos em 4% dos segmentos externos (amostra 272), 4% dos *cuffs* internos (amostra 225) e 14% dos segmentos intraperitoneais (amostras 230,272, 281 e 315), para os quais a análise semi-quantitativa se encontrou abaixo do limite de deteção. É importante referir que relativamente à amostra 274, a análise semi-quantitativa permitiu a deteção de microrganismos no *cuff* intermédio, no entanto uma das espécies co-isolada apenas foi recuperada pelo método qualitativo (Figura 4). Comparando os dois métodos de análise semi-quantitativa utilizados para a análise dos *cuffs* (rolamento e sonicação, o rolamento possibilitou a deteção de microrganismos em 72% das amostras, enquanto a sonicação permitiu a deteção de microrganismos em 53% das amostras (Figura 5). Adicionalmente, em 22% das amostras analisadas foram detetados microrganismos exclusivamente por rolamento (Figura 5). Estes resultados evidenciam a importância da utilização das diferentes metodologias de análise microbiológica para a avaliação da distribuição dos microrganismos ao longo do cateter.

**a.**

i) Segmento externo

		Análise qualitativa		
		Positiva	Negativa	
Análise semi-quantitativa	>LD	4	2	6
	<LD	1	19	20
		5	21	26 <sup>1</sup>

ii) *Cuff* intermédio

		Análise qualitativa		
		Positiva	Negativa	
Análise semi-quantitativa	>LD	15	2	17
	<LD	0	6	6
		15	8	23 <sup>2</sup>

iii) *Cuff* interno

		Análise qualitativa		
		Positiva	Negativa	
Análise semi-quantitativa	>LD	12	9	21
	<LD	1	6	7
		13	15	28 <sup>3</sup>

iv) Segmento IP

		Análise qualitativa		
		Positiva	Negativa	
Análise semi-quantitativa	>LD	5	1	6
	<LD	4	18	22
		9	19	28 <sup>4</sup>

**b.**

Rolamento

		>LD	<LD	
		Sonicação	>LD	26
<LD	11		13	24
	37		14	51 <sup>5</sup>

**Figura 5** - Deteção de microrganismos em cateteres de DP através a) método de análise semi-quantitativa e qualitativa; e b) método de análise semi-quantitativa: rolamento e sonicação.

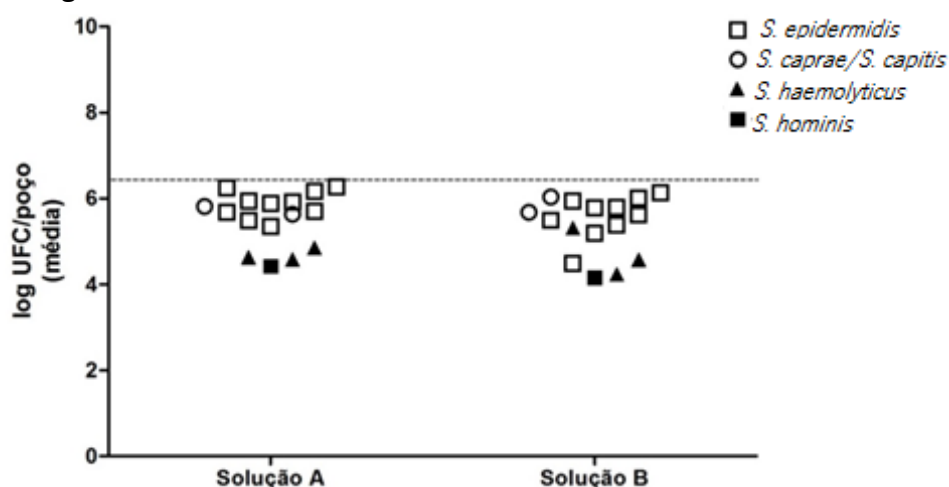
LD – Limite de deteção. <sup>1</sup> Número total de segmentos externos analisados; <sup>2</sup> Número total de *cuffs* intermédios; <sup>3</sup> Número total de *cuffs* internos analisados; <sup>4</sup> Número total de segmentos intraperitoneais; <sup>5</sup> Número total de *cuffs*.

### 3.3 Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas e biofilmes de bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas recuperadas de cateteres de diálise peritoneal

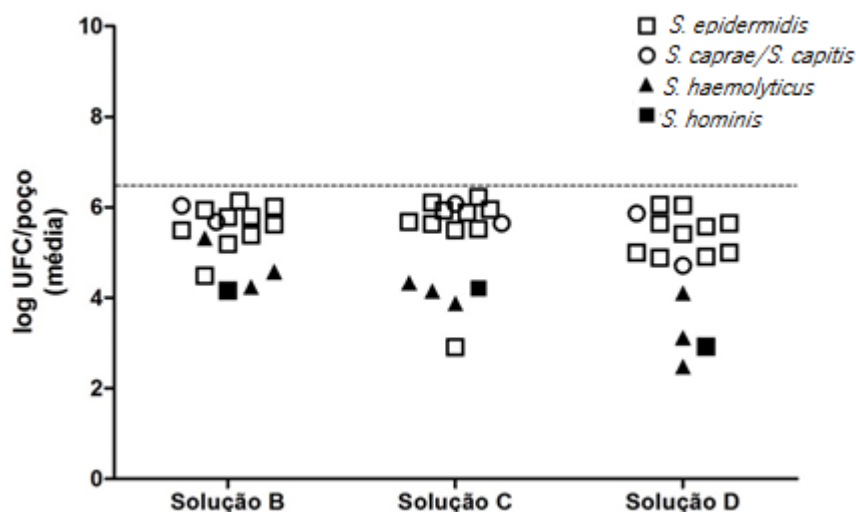
Para a avaliação e comparação da influência das soluções de DP em células planctónicas e na formação de biofilme foram utilizadas quatro soluções (3 soluções biocompatíveis e 1 solução bioincompatível) com diferentes composições em termos: i) do agente osmótico (solução A [icodextrina] e solução B [glucose]); e ii) do tampão (solução B [bicarbonato/lactato], solução C [bicarbonato] e solução D [lactato]) (Tabela 5). Paralelamente, efetuado um controlo positivo (TSB) e um controlo negativo (NaCl 0,9%). Neste estudo foram utilizadas espécies de *S. epidermidis*, *S. caprae/S. capitis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* (Tabela 4).

#### 3.3.1 Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em células planctónicas

O efeito das soluções de DP em células planctónicas foi avaliado em termos do número de UFC. Como se pode verificar nos gráficos das Figuras 6 e 7, o crescimento das bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas foi inibido, em relação ao inóculo inicial, independentemente da composição da solução de DP (Figuras 6 e 7) ( $p > 0,05$ ). Especificamente, as soluções de DP biocompatíveis (solução A, solução B e solução C) promovem uma redução do número de UFC/poço em média inferior a 1 log UFC/poço e a solução bioincompatível (solução D, com tampão lactato) uma redução do número de UFC/poço em média superior a 1 log UFC/poço, o que sugere que as soluções bioincompatíveis têm um efeito inibitório mais acentuado do que as soluções biocompatíveis, embora essas diferenças não sejam estatisticamente significativas.



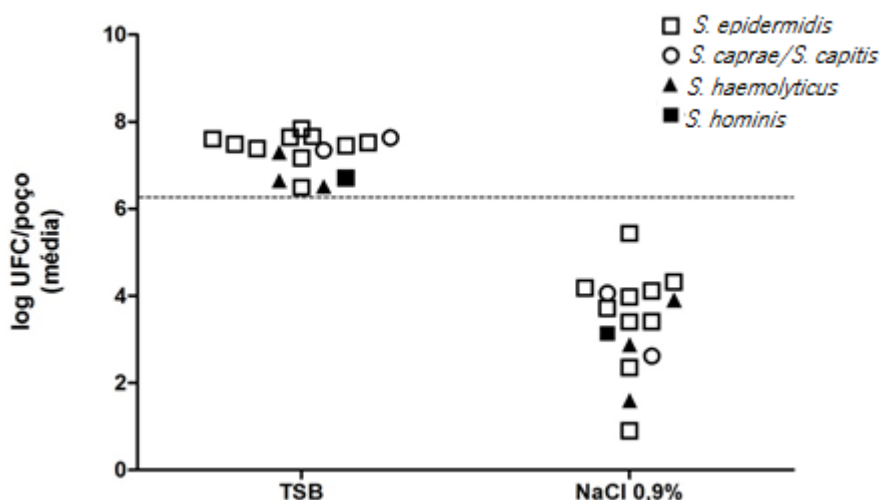
**Figura 6** – Comparação do efeito da solução A (icodextrina) e solução B (glucose) no crescimento planctónico de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial.



**Figura 7** – Comparação do efeito da solução B (bicarbonato/lactato), solução C (bicarbonato) e solução D (lactato) no crescimento planctónico de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial.

No entanto, e como esperado, o meio de cultura utilizado, o TSB, promove o crescimento dos microrganismos (Figura 8), enquanto que o NaCl 0,9% inibe o seu crescimento. Assim, os resultados obtidos mostram que existem diferenças significativas no crescimento dos microrganismos quando utilizado como meio de controlo o TSB ou o NaCl 0,9%, comparativamente às soluções de DP ( $p < 0,05$ ).

Comparando o efeito das soluções de DP nas diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas estudadas, os resultados mostram que as soluções de DP, em especial a solução bioincompatível (solução D), tendem a ter um efeito inibitório mais acentuado para algumas das espécies de *S. haemolyticus* e *S. hominis*, que apresentaram em média reduções do número de UFC/poço superiores a 2 log (Figura 7).



**Figura 8** – Comparação do efeito do controlo positivo (TSB) e controlo negativo (NaCl 0,9%) no crescimento planctónico de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*. A linha tracejada representa o valor médio de UFC/poço do inóculo inicial.

### 3.3.2 Avaliação do efeito das soluções de diálise peritoneal em biofilme

A formação dos biofilmes foi avaliada em termos do número de células cultiváveis e em termos de biomassa total. Os resultados obtidos relativos à influência das soluções de DP na formação de biofilme de bactérias de *Staphylococcus* coagulase-negativas mostram que o número de UFC aderidos aos poços revestidos das placas é elevado (média 5-6 log UFC/poço)(Figuras 9 e 10). Adicionalmente, não foram registadas diferenças significativas na adesão microbiana entre as soluções com diferentes composições ( $p>0,05$ ).

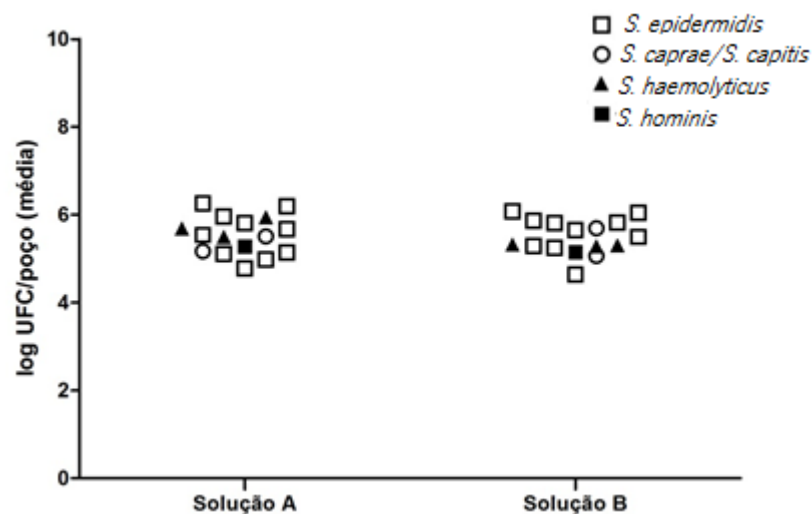


Figura 9 – Efeito da solução A (icodextrina) e solução B (glucose) na formação de biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*.

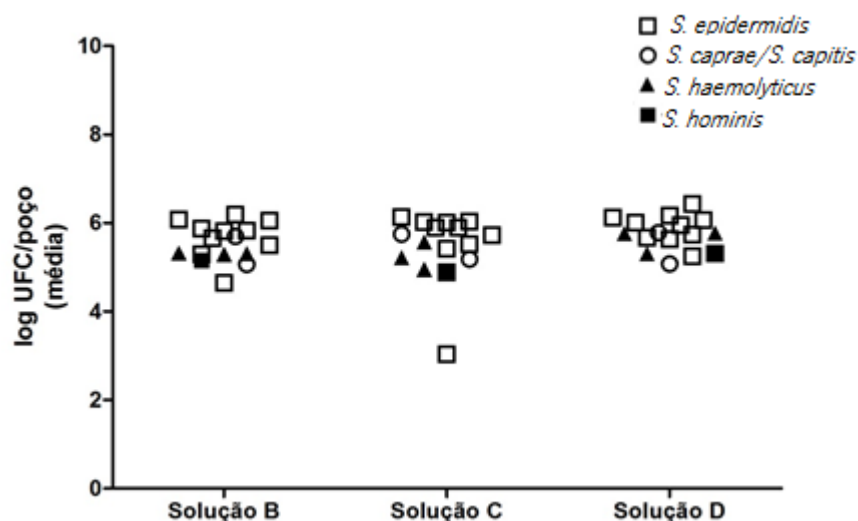
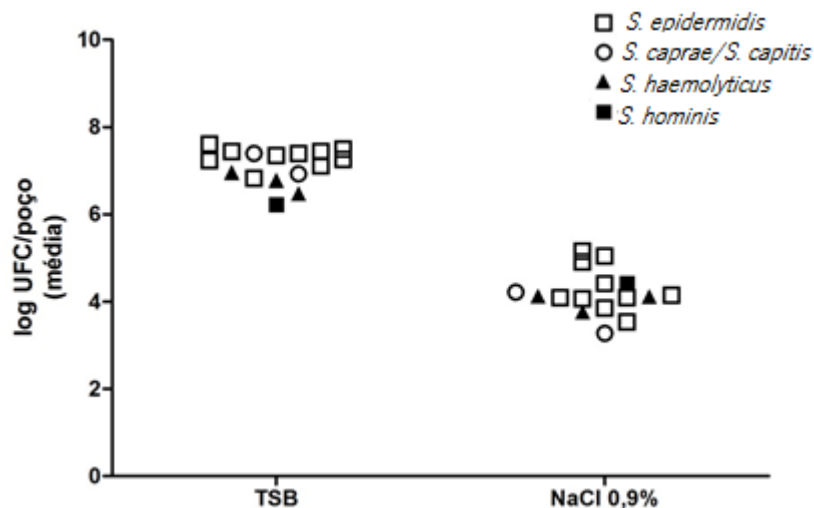


Figura 10 – Efeito da solução B (bicarbonato/lactato), solução C (bicarbonato) e solução D (lactato) na formação de biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*.

No entanto, comparativamente ao controlo positivo (TSB) a adesão celular nas soluções de DP é inferior ( $p < 0,05$ ) (Figura 11). Por outro lado, utilizando como meio de controlo o NaCl 0,9% (controlo negativo) a adesão celular é menor comparativamente às soluções de DP ( $p < 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11** – Comparação do efeito do controlo positivo (TSB) e controlo negativo (NaCl 0,9%) na formação do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis*.

De notar que, relativamente à adesão microbiana das diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas aos poços revestidos das placas, os resultados indicam que os microrganismos apresentam um comportamento semelhante entre si ( $p > 0,05$ ). No entanto, uma das espécies de *S. epidermidis* apresentou uma fraca adesão na solução C, comparativamente aos restantes isolados.

A quantificação da biomassa total mostrou que a biomassa formada pelas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas nas soluções de DP é reduzida (Figuras 12 e 13). Os resultados obtidos indicam que existem diferenças significativas na biomassa produzida pelos microrganismos entre a solução A (média  $DO = 0,01 \pm 0,01$ ) e as soluções B e D (média  $DO = 0,03 \pm 0,01$ ) ( $p < 0,05$ ) (Figura 12), o que sugere que o agente osmótico pode influenciar a formação de biofilme. Por outro lado, considerando as soluções com diferentes tampões, (soluções B, C e D) (Figura 13), os resultados sugerem que não existem diferenças significativas na biomassa produzida pelos diferentes microrganismos ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos sugerem que independentemente da solução de DP avaliada (Figuras 12 e 13), a quantidade de biomassa formada é inferior comparativamente ao observado no controlo positivo (TSB) ( $p < 0,05$ ), e semelhante ao verificado para o controlo negativo (NaCl 0,9%) ( $p > 0,05$ ) (Figura 14).



Não foram registadas diferenças significativas na quantidade de biomassa formada para as diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas nas soluções de DP ( $p>0,05$ ).

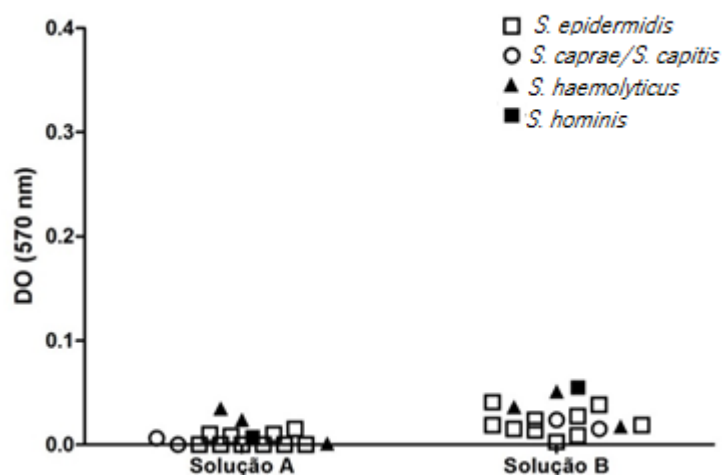


Figura 12 – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* na solução A (icodextrina) e solução B (glucose).

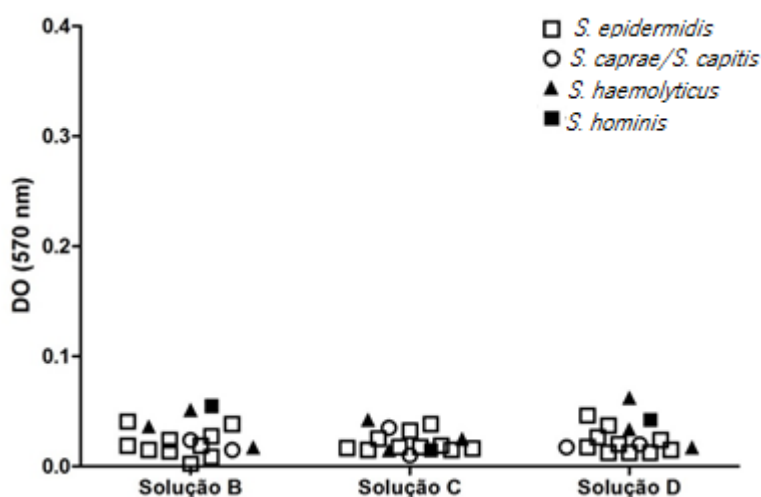


Figura 13 – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* na solução B (bicarbonato/lactato) e solução C (bicarbonato) e solução D (lactato).

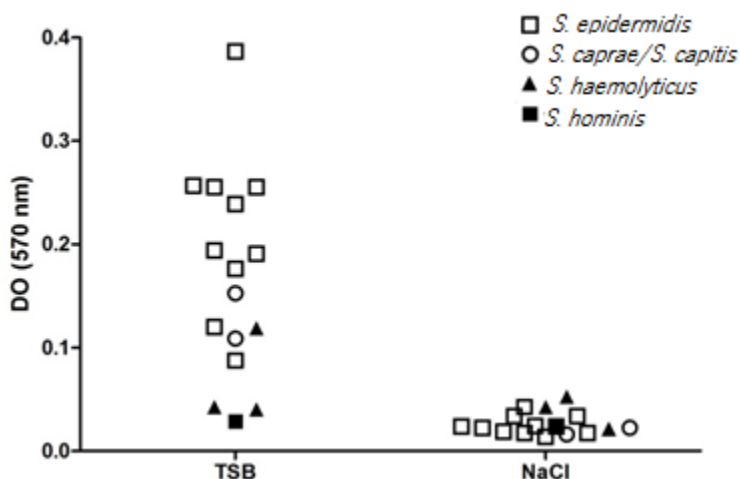


Figura 14 – Biomassa do biofilme de 10 espécies de *S. epidermidis*, 2 espécies de *S. caprae/S. capitis*, 3 espécies de *S. haemolyticus* e 1 espécie de *S. hominis* no TSB (controlo positivo) e NaCl 0,9% (controlo negativo).

## 4. Discussão dos resultados

Apesar das melhorias alcançadas nos últimos anos, as infeções associadas à DP continuam a representar uma causa importante para a falha da técnica (Li et al., 2010). Tem sido sugerido que a capacidade de adesão microbiana às superfícies do cateter de DP, isto é, a formação de biofilme, de alguns microrganismos, nomeadamente bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas, aumenta o risco de ocorrência de peritonites repetidas e recidivantes devido à difícil erradicação dos microrganismos por agentes microbianos (Nessim et al., 2012). No entanto, os estudos relativos à caracterização do biofilme, bem como a avaliação de fatores que influenciem a formação de biofilme, como as soluções de DP são escassos. Neste sentido, o trabalho desenvolvido nesta dissertação teve como primeiro objetivo a investigação de biofilmes microbianos em extensores e cateteres permanentes de DP, através de métodos de cultura microbiológica e identificação microbiana.

Primeiramente, tendo em conta que a superfície extraluminal dos extensores e dos segmentos externos dos cateteres de DP está em contacto com a flora da pele (Figura 2), podendo representar uma fonte de contaminação, foi necessário realizar a descontaminação dessa superfície. Para tal, foi utilizado álcool a 70% como agente desinfetante. Os resultados obtidos (Tabela 6) mostram que o agente desinfetante possibilitou a inativação dos microrganismos para a maior parte dos extensores e segmentos externos analisados. Adicionalmente, não foram detetadas, na posterior análise microbiológica, efetuada para os extensores e segmentos externos, culturas intraluminais positivas. Assim, estes resultados sugerem que o método de descontaminação utilizado é eficaz, tal como foi sugerido por Machado (2012) que observou que este método foi eficiente na inativação dos microrganismos em 80% das amostras analisadas (n= 33). No entanto, e tendo em conta os resultados obtidos (Tabela 6), é importante referir que, após o processo de descontaminação, torna-se essencial no processo de raspagem do biofilme para estas amostras (ponto 2.5.2 e ponto 2.5.3) minimizar o contacto do bisturi com a superfície extraluminal, no sentido de evitar a contaminação com microrganismos que não tenham sido eventualmente inativados pelo método de descontaminação.

Relativamente aos dois métodos de análise microbiológica utilizados, os resultados obtidos sugerem que a análise qualitativa foi importante na deteção de microrganismos para os quais a análise semi-quantitativa se encontrou baixo do limite de deteção (Figura 5). Adicionalmente, os dados obtidos para a análise semi-quantitativa dos *cuffs*, (nomeadamente através de rolamento e sonicação do *cuff*) permitem concluir, à semelhança do que foi sugerido por Machado (2012), que os dois métodos são complementares (Figura 5).

Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que a realização da análise microbiológica através destas diferentes abordagens é importante para a avaliação da colonização dos diferentes segmentos do cateter.

No que diz respeito à identificação (presuntiva) dos microrganismos através da utilização de meios seletivos e diferenciais é possível concluir que os meios utilizados, MSA e EMBA, não permitem obter uma identificação concreta dos microrganismos. Por outro lado, a técnica de MALDI-TOF MS, permitiu a identificação de 33% dos isolados de extensores ao nível do género (2 géneros) e 56% ao nível da espécie (4 espécies); 11% dos isolados dos cateteres de DP ao nível do género (3 géneros) e 80% ao nível da espécie (14 espécies). Tendo em conta o número elevado de isolados clínicos isolados neste trabalho, a utilização deste método possibilitou uma identificação rápida e correta, uma vez que foram identificados a maioria dos isolados. A não identificação dos restantes microrganismos pode estar relacionada com a ausência de espectros de estirpes de referência na base de dados (Seng et al., 2009). A utilização da técnica de MALDI-TOF MS, para a identificação de microrganismos isolados de cateteres de DP, foi descrita pela primeira vez por Machado (2012), que demonstra que a técnica de MALDI-TOF MS possibilitou a identificação de 58% dos microrganismos recuperados dos extensores e 68% dos isolados recuperados dos cateteres de PD.

Os dados obtidos neste trabalho mostram que o MALDI-TOF MS poderá ser considerado uma alternativa viável aos métodos convencionais (bioquímicos) ou moleculares em laboratórios de microbiologia para a identificação de microrganismos, tal como tem vindo a ser sugerido por outros autores (Mellmann et al., 2008, Bizzini et al., 2010).

A análise dos resultados da análise microbiológica de 63 extensores mostra que em apenas 11% das amostras foram detetados microrganismos (Tabela 7). Os estudos disponíveis na literatura, relativos à investigação de biofilmes microbianos em extensores de DP, sugerem

que a presença de microrganismos nestas amostras é reduzida (Verger et al., 1987, Machado, 2012). Enquanto Verger et al. (1987) não detetaram microrganismos em 17 extensores de DP removidos devido a causas infecciosas e não infecciosas, a análise realizada por Machado (2012), permitiu a deteção de microrganismos em 34% de 55 extensores removidos por rotina. A baixa deteção de microrganismos em extensores de DP obtida no presente estudo pode estar fortemente relacionada com o facto de estes serem removidos por rotina a cada 6 meses (Cabralda et al., 1998), podendo constituir um fator preponderante para a prevenção da colonização dos extensores. Adicionalmente, a densidade celular detetada nos extensores de DP (Tabela 7) sugere que a carga microbiana associada a estas amostras é geralmente baixa ( $1 \leq \text{UFC/segmento} \leq 100$ ).

Relativamente às espécies detetadas em extensores de DP (Tabela 7), não se denotou o predomínio de um determinado grupo de microrganismos, tendo sido detetadas percentagens idênticas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por outro lado, no estudo publicado por Machado (2012) as bactérias Gram-positivas foram as mais comumente detetadas, com predomínio da espécie *S. epidermidis*. No estudo foi ainda descrita, à semelhança do que ocorreu no presente trabalho, a deteção de *Sphingomonas spp.*, *D. acidovorans*, *S. epidermidis* e *M. luteus*. Relativamente às bactérias de *E. faecalis* e *Burkholderia spp.* a sua deteção em extensores de DP foi descrita pela primeira vez neste trabalho.

A análise realizada aos cateteres permanentes de DP (Figura 4) sugere, à semelhança do que está descrito na literatura (Tabela 2), que a incidência de colonização microbiana nestas amostras é comum, uma vez que foram detetados microrganismos, em pelo menos um dos segmentos, em 24 dos 28 cateteres analisados. Especificamente, a análise microbiológica através dos métodos semi-quantitativo e/ou qualitativo permitiu a deteção de microrganismos em 27% dos segmentos externos, 74% dos *cuffs* intermédios, 86% dos *cuffs* internos e 36% dos segmentos intraperitoneais (Figura 4). Assim, os resultados obtidos mostram que os cateteres de DP constituem um substrato para a adesão dos microrganismos e consequente formação de biofilme.

Relativamente à densidade celular estimada através da análise semi-quantitativa, e considerando o segmento externo, os resultados obtidos mostram que para a maioria das amostras a densidade celular variou entre  $1 \leq \text{UFC/segmento} \leq 100$  (19%). Por outro lado, a densidade celular dos *cuffs* intermédios variou predominantemente entre  $300 < \text{UFC/segmento}$

$\leq 3 \times 10^5$  (48%), a dos *cuffs* internos entre  $1 \leq \text{UFC/segmento} \leq 100$  (43%) e a dos segmentos intraperitoneais entre  $300 < \text{UFC/segmento} \leq 3 \times 10^5$  UFC/segmento (14%). Assim, estes resultados evidenciam que os *cuffs* intermédios são os elementos do cateter permanente que apresentam uma maior carga microbiana. Adicionalmente, os dados obtidos sugerem que os *cuffs* internos apresentam uma densidade celular, geralmente, inferior à dos *cuffs* intermédios, mas superior comparativamente aos restantes segmentos do cateter (Figura 4). É importante referir que nas amostras 212, 213, 224, 228, 230, 270, 272, 279, 281 e 310 foram detetados os mesmos microrganismos no *cuff* intermédio e no *cuff* interno, no entanto a densidade celular foi sempre inferior neste último segmento (Figura 4). Neste sentido, os resultados sugerem que os *cuffs* podem funcionar como uma barreira à migração de microrganismos ao longo do túnel do cateter (Nessim et al., 2010). De salientar que, à semelhança do que foi demonstrado no presente trabalho, Bayston et al. (1999) e Machado (2012) referiram que os *cuffs* apresentam uma maior densidade celular do que os restantes elementos do cateter. Adicionalmente, Bayston et al. (1999) sugeriram que os *cuffs* apresentam uma maior carga microbiana devido às características do material, o poliéster, que promove uma reação fibrótica, com consequente deposição de células do hospedeiro, proporcionando o ambiente ideal para a adesão microbiana.

Relativamente à diversidade microbiana encontrada nos cateteres de DP este trabalho mostra que as bactérias Gram-positivas foram o grupo de microrganismos mais comumente detetado, à semelhança do que foi descrito noutros estudos (Tabela 2).

Particularmente, no caso dos segmentos externos, os resultados mostram que foram detetadas percentagens iguais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 4). No entanto, este estudo demonstra a importância das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas e *S. aureus* na colonização do segmento externo, uma vez que foram as únicas bactérias Gram-positivas detetadas (Figura 4). Por outro lado, a espécie *P. aeruginosa* foi a única bactéria Gram-negativa detetada neste segmento. Os resultados obtidos estão em concordância com os estudos realizados por Dasgupta et al. (1986), Dasgupta et al. (1987), Pihl et al. (2012) e (Machado, 2012), que reportaram o isolamento de espécies de *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* nestes elementos do cateter. Por outro lado, as bactérias *S. caprae/S. capitis* e *C. glabrata* foram isoladas destes segmentos pela primeira vez neste estudo (Figura 4).

Considerando os *cuffs*, os resultados obtidos indicam que as bactérias Gram-positivas são as mais frequentemente detetadas, nomeadamente as espécies de *S. epidermidis*. A bactéria Gram-negativa predominante foi a espécie *P. aeruginosa*. Estes resultados estão de

acordo com o estudo publicado por Machado (2012), no qual analisou 6 *cuffs* intermédios e 6 *cuffs* internos. À semelhança do que foi observado no presente trabalho, foram publicados estudos que reportam o isolamento de espécies de *S. aureus* (Bayston et al., 1999, Rodríguez-Carmona et al., 2000), *S. epidermidis*, *Corynebacterium*, *P. aeruginosa* (Bayston et al., 1999, Machado, 2012), *S. caprae/S.capitis* e *M. luteus* (Machado, 2012). No entanto, não se encontra descrito na literatura a deteção de espécies de *E. faecalis*, *S. anginosus*, *Bacillus*, *S. maltophilia*, *S. marcescens*, *Sphingomonas*, *E. aerogenes*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, que foram detetados no decurso deste estudo nos *cuffs* dos cateteres.

Finalmente, nos segmentos IP verificou-se, em concordância com o obtido para os restantes segmentos do cateter, a predominância na deteção de bactérias Gram-positivas, em particular da espécie *S. epidermidis*. Adicionalmente, a bactéria *P. aeruginosa* foi a única bactéria Gram-negativa detetada. Os estudos disponíveis relativos ao isolamento de microrganismos em segmentos intraperitoneais sugerem que as espécies de *S. epidermidis* são frequentemente isoladas (Marrie et al., 1983, Dasgupta et al., 1986, Dasgupta et al., 1987, Gorman et al., 1993, Gorman et al., 1994, Pihl et al., 2012, Machado, 2012). No entanto, foram publicados estudos que reportam a deteção, menos frequente de *P. aeruginosa* (Dasgupta et al., 1986, Gorman et al., 1994), *Corynebacterium spp.*, (Bayston et al., 1999, Pihl et al., 2012, Machado, 2012) e *S. aureus* (Dasgupta et al., 1986, Dasgupta et al., 1987, Bayston et al., 1999, Rodríguez-Carmona et al., 2000, Pihl et al., 2012). De referir, no entanto a observação das bactérias *B. pumilus* e *B. licheniformis* pela primeira vez em segmentos intraperitoneais de cateteres de DP.

Tendo em conta que as bactérias tais como, *Staphylococcus* coagulase-negativas, *S. aureus*, *Corynebacterium spp.*, *P. aeruginosa* fazem parte da flora normal da pele (Cogen et al., 2008), a sua recorrente deteção na superfície intraluminal dos extensores e segmentos externos pode estar associada a contaminações pelo toque durante as trocas de solução de DP, com conseqüente entrada dos microrganismos pela via transluminal. Adicionalmente, estas espécies podem entrar através do orifício de saída, isto é ao longo do túnel do cateter pela via periluminal, o que pode explicar a deteção destes microrganismos nos *cuffs* dos cateteres. A título de exemplo, refira-se o estudo publicado por Miller and Findon (1997), no qual foi descrita a diversidade microbiana das mãos (não desinfetadas) dos pacientes de DP, demonstrando a presença de bactérias, tais como, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus*

spp., *Streptococcus* spp. e *Micrococcus* spp., que foram detetadas nos diferentes segmentos dos cateteres analisados no presente estudo. Assim, os resultados obtidos evidenciam o papel importante da flora normal da pele na contaminação dos extensores e cateteres de DP. Adicionalmente, foram detetados no decurso deste estudo outros microrganismos nos cateteres de DP, geralmente menos associados a episódios de peritonites. Por exemplo, em relação à bactéria *Burkholderia* spp. (Tabela 7), foram reportados casos que descrevem a deteção deste microrganismo em episódios de peritonites, embora em situações raras (Wong, 2013, Tong et al., 2013). Por outro lado, a espécie *E. faecalis*, detetada em extensores (Tabela 7) e cateteres permanentes (Figura 4), pertence à flora normal do trato gastrointestinal, e surge várias vezes implicada em episódios de peritonites entéricas, o que sugere que esta bactéria pode ter acedido ao cateter pela via transluminal (Yip et al., 2011). As bactérias ambientais *Sphingomonas* spp. e *S. maltophilia* detetadas nos extensores e nos cuffs dos cateteres de DP (Figura 4) são raramente associadas a episódios de peritonites, (Machuca et al., 2005, Lee et al., 2013), podendo entrar no cateter pela via transluminal ou periluminal. Adicionalmente, estas bactérias apresentam um grau de patogenicidade reduzido (Machuca et al., 2005, Lee et al., 2013). Por outro lado, é importante referir a deteção da bactéria ambiental *S. marcescens* (Hejazi and Falkiner, 1997) nos cuffs de um dos cateteres de DP (Figura 4). Esta bactéria, que pode entrar no cateter pela via transluminal ou periluminal, está associada à ocorrência de peritonites repetidas e consequentemente de difícil tratamento (Hiremath and Biyani, 2006).

Sumariamente, o trabalho desenvolvido sugere que os extensores de DP são raramente colonizados. Por outro lado, a análise efetuada aos cateteres de DP permitiu a deteção de microrganismos na maioria dos cateteres, sendo que as bactérias Gram-positivas são as mais comumente detetadas. Especificamente, as bactérias da espécie *Staphylococcus* coagulase-negativa, com predomínio da espécie *S. epidermidis*, foram as mais detetadas. Os resultados obtidos neste estudo constituem assim um importante contributo para a caracterização etiológica do biofilme associado ao cateter de DP.

O segundo objetivo do trabalho desenvolvido nesta dissertação consistiu na avaliação do efeito de soluções de DP, usadas na prática clínica, em culturas plânticas e na formação de biofilme em microrganismos clinicamente relevantes. Em concordância com o que foi demonstrado neste trabalho, e sugerido anteriormente por outros autores (Tabela 2) relativamente

ao tipo de microrganismos associados ao cateter de DP, foi considerado relevante avaliar as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas, nomeadamente *S. epidermidis*, *S. caprae/S.capitis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis*. Adicionalmente, foi considerado importante estudar essencialmente as soluções de DP biocompatíveis, uma vez que os estudos disponíveis relativamente à influência destas soluções, especialmente na formação do biofilme, são escassos (Tabela 3).

Os resultados obtidos sugerem que quando são usadas como meio de crescimento as soluções de DP, o crescimento das células planctónicas é inibido (Figura 6 e Figura 7). Assim, todas soluções de DP testadas apresentam um comportamento bacteriostático, uma vez que a redução logarítmica do número de UFC/poço em relação ao inóculo inicial foi inferior a 3 log (Pankey and Sabath, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho estão assim de acordo com o que tem sido descrito na literatura, que sugere que as soluções de DP inibem o crescimento planctónico de *S. epidermidis* (Verbrugh et al., 1984, Dawson et al., 1985, McDonald et al., 1986, McCormick and Echols, 1987, Tobudic et al., 2011, Tobudic et al., 2012). Adicionalmente, os resultados obtidos permitiram concluir que não existem diferenças significativas no crescimento dos microrganismos entre as soluções com diferentes agentes osmóticos (solução A [icodextrina] e a solução B [glucose]) (Figura 6). Por outro lado, num estudo realizado por Tobudic et al. (2011) que compararam o efeito no crescimento de *S. epidermidis* entre soluções biocompatíveis com diferentes agentes osmóticos (com composição semelhante à solução A e B utilizadas neste estudo), foi demonstrado que as soluções de icodextrina têm um efeito inibitório menos acentuado do que as soluções de glucose.

No entanto, foi observado no presente estudo que a solução D (bioincompatível, com tampão lactato) apresenta um efeito inibitório mais acentuado no crescimento dos microrganismos, comparativamente às soluções biocompatíveis, embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas. Também Tobudic et al. (2011), (Tobudic et al., 2012) compararam o efeito das soluções de icodextrina (solução biocompatível) e glucose (solução bioincompatível, com composição semelhante à solução D utilizada neste estudo) no crescimento de *S. epidermidis* e verificaram que as soluções de icodextrina têm um efeito inibitório menos acentuado no crescimento planctónico deste microrganismo quando comparado com as soluções de glucose (bioincompatível). Relativamente ao efeito do tampão, não existem diferenças significativas no crescimento dos microrganismos entre a solução B (bicarbonato/lactato), solução C (bicarbonato) e a solução D (lactato) (Figura 7), o que está em



concordância com o verificado por Tobudic et al. (2011). Este autor comparou o efeito de soluções com diferentes tampões, especificamente lactato e bicarbonato/lactato (com composição semelhante às usadas neste estudo) no crescimento de *S. epidermidis* e à semelhança do que foi verificado neste trabalho não foram verificadas diferenças significativas entre as diferentes soluções.

Em relação à avaliação da formação de biofilme das diferentes espécies nas soluções biocompatíveis de DP, os resultados obtidos evidenciam a forte tendência das espécies de *Staphylococcus* coagulase–negativas em aderirem aos poços revestidos dos poços (Figura 9 e Figura 10). Este comportamento foi verificado em todas as soluções de DP testadas, não existindo diferenças significativas na adesão microbiana entre as soluções de DP testadas. Até à data não foram publicados estudos que avaliem a capacidade de adesão dos microrganismos e das soluções de DP biocompatíveis estudadas que possibilitem a comparação com os resultados obtidos. No entanto, os estudos disponíveis relativos à influência das soluções de DP bioincompatíveis (com composição idêntica à solução D utilizada neste trabalho) na adesão de *S. epidermidis*, confirmam a capacidade deste microrganismo aderir, especificamente a discos de silicone, utilizando como meio de cultura as soluções de DP bioincompatíveis (Dasgupta et al., 1990, Dasgupta et al., 1994 ).

Os resultados obtidos relativamente à quantificação da biomassa total, sugerem que os microrganismos incubados nas soluções de DP produzem pouca biomassa (Figuras 12 e 13). No entanto, especificamente para a solução A (icodextrina) os resultados obtidos sugerem que os microrganismos produzem menos biomassa comparativamente à solução B e solução D, o que sugere que o agente osmótico pode influenciar a formação de biofilme (Figura 12). Os dados obtidos indicam que as soluções de DP são um meio pouco nutritivo e que conseqüentemente os microrganismos são incapazes de produzir biomassa quando incubados em soluções de DP.

Resumidamente, todas soluções de DP testadas afetam o crescimento das células planctónicas, e apesar de os microrganismos aderirem, a produção de biomassa total é reduzida. Outra das conclusões obtidas neste trabalho é que, de uma forma geral, o efeito das soluções de DP nas suspensões planctónicas, na adesão microbiana e na produção de biomassa total é semelhante para todas as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas.

De referir o entanto que os ensaios realizados *in vitro*, não mimetizam as condições encontradas *in vivo*. Especificamente, a composição da solução de DP é alterada pouco depois de introduzida na cavidade peritoneal (Duwe et al., 1981, Shalit et al., 1985). Adicionalmente, os

estudos disponíveis sugerem que o efluente de DP de soluções bioincompatíveis promove o crescimento das células planctónicas (Tabela 2) e adicionalmente a adesão microbiana é superior no efluente do que na solução de DP (Dasgupta et al., 1994 , Yanagisawa et al., 2004).

## 5. Conclusões e sugestões de trabalho futuro

O trabalho desenvolvido no âmbito desta dissertação teve como primeiro objetivo a semi-quantificação, o isolamento e a identificação de microrganismos associados a extensores e cateteres permanentes de DP. Outro objetivo do trabalho aqui descrito consistiu no estudo do efeito das soluções de DP em células planctónicas e biofilmes de bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas recuperadas de cateteres de DP. Sumariamente, as principais conclusões do estudo realizado são:

- i) A presença de microrganismos na superfície intraluminal dos extensores é reduzida (11% das amostras), variando a carga microbiana entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{extensor} \leq 100$  para a maioria das amostras analisadas. Os microrganismos predominantemente detetados foram as bactérias *M. luteus* e *Sphingomonas* spp..
  
- ii) A presença de microrganismos em cateteres permanentes de DP é frequente, uma vez que foram isolados microrganismos em 86% das amostras. Relativamente aos segmentos externos dos cateteres permanentes a densidade celular variou entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{extensor} \leq 100$  (19%), no entanto a análise semi-quantitativa efetuada encontrou-se abaixo do limite de deteção em 77% das amostras. Nos *cuffs* intermédios foi detetada uma densidade celular entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$  para a maioria das amostras (48%). Relativamente ao *cuff* interno, a densidade celular variou geralmente entre  $1 \leq \text{UFC}/\text{segmento} \leq 100$  para a maioria das amostras (43%). Por último, a densidade celular dos segmentos intraperitoneais variou entre  $300 < \text{UFC}/\text{segmento} \leq 3 \times 10^5$  para 14% das amostras, no entanto a análise semi-quantitativa efetuada encontrou-se abaixo do limite de deteção em 79% das amostras. A densidade celular nos *cuffs* foi superior à observada nos segmentos externos e intraperitoneais do mesmo cateter. Adicionalmente, os *cuffs* dos cateteres são os segmentos mais comumente colonizados. As bactérias mais comumente detetadas nos cateteres permanentes de DP foram as bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativas (com predomínio da espécie *S. epidermidis*) e *P. aeruginosa*.

- iii) Foram isolados dos extensores e cateteres de DP microrganismos que não foram detetados em estudos realizados anteriormente, tais como *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *Burkholderia* spp. e *S. maltophilia*.
- iv) O MALDI-TOF MS permitiu a identificação de 89% dos microrganismos recuperados de extensores e 91% dos microrganismos recuperados de cateteres permanentes de DP.
- v) As soluções de DP biocompatíveis (e bioincompatíveis) têm um efeito inibitório no crescimento de bactérias de *Staphylococcus* coagulase-negativas na forma planctónica.
- vi) Foi avaliado pela primeira vez o efeito de soluções biocompatíveis na regulação da formação de biofilme. As soluções de DP estudadas permitem a adesão de bactérias de *Staphylococcus* coagulase-negativas à superfície dos poços condicionada, no entanto a biomassa total formada é reduzida.
- vii) Adicionalmente, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as soluções de DP testadas têm um efeito semelhante nas diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas estudadas, em células planctónicas e em biofilme.

No sentido de complementar o trabalho realizado, são apresentadas algumas sugestões para trabalho futuro:

- i) Realizar estudos mais aprofundados relativos à investigação de biofilmes associados a cateteres de DP que incluam por exemplo a caracterização detalhada da população envolvida, tais como a causa de remoção do cateter (causa infecciosa ou não infecciosa), o tipo de solução de DP utilizada, modalidade de DP (DPCA ou DPA) e o tipo de terapia antimicrobiana, no sentido de avaliar uma possível relação entre a presença de biofilme associado ao cateter e as infeções em DP.

- ii) Investigar a presença de biofilme microbiano associado aos extensores e cateteres de DP com recurso a técnicas microscópicas, como por exemplo a MCVL, com o objetivo de investigar a presença (e morfologia) de biofilmes ou a presença de microrganismos não cultiváveis através do uso de corantes que permitam determinar a viabilidade celular.
- iii) Avaliar o efeito das soluções de DP em culturas planctónicas e em biofilme de outros microrganismos clinicamente relevantes em DP, tais como *P. aeruginosa* e *S. aureus*.
- iv) Avaliar o efeito do efluente de DP das soluções biocompatíveis em culturas planctónicas e em biofilme de microrganismos clinicamente relevantes.
- v) Avaliar a influência de outros factores que possam influenciar o biofilme, tais como as terapias fibrinolíticas adjuvantes utilizadas na prática clínica.

## 6. Bibliografia

- ANWAR, H., STRAP, J. L. & COSTERTON, J. W. 1992. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 36, 1347-1351.
- ASH, S. R. 1990. Chronic peritoneal dialysis catheters: effects of catheter design, materials, and location. *Semin Dial*, 3, 39-46.
- ASH, S. R. 2003. Interventional nephrology and dialysis: chronic peritoneal dialysis catheters: overview of design, placement, and removal procedures. *Semin Dial*, 16, 323-334.
- BAYSTON, R., ANDREWS, M., RIGG, K. & SHELTON, A. 1999. Recurrent infection and catheter loss in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 19, 550-555.
- BAYSTON, R., FISHER, L. E. & WEBER, K. 2009. An antimicrobial modified silicone peritoneal catheter with activity against both Gram positive and Gram negative bacteria. *Biomaterials*, 30, 3167-3173.
- BEHLAU, I. & GILMORE, M. S. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch Ophthalmol*, 126, 1572-1581.
- BIZZINI, A., DURUSSEL, C., BILLE, J., GREUB, G. & PROD'HOM, G. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 48, 1549-1554.
- BOLAND, T., LATOUR, R. & STUTZENBERGER, F. 2000. Molecular basis of bacterial adhesion. In: AN, Y. & FRIEDMAN, R. (eds.) *Handbook of Bacterial Adhesion*. USA: Humana Press, 1<sup>th</sup> edition.
- BUCHANAN, W., QUINN, M. & HASBARGEN, J. 1994. Peritoneal catheter colonization with *Alternaria*: successful treatment with catheter preservation. *Perit Dial Int*, 14, 91-92.
- BUFFINGTON, M., SEQUEIRA, A., SACHDEVA, B. & ABREO, K. 2012. Peritoneal dialysis catheter placement techniques *Open Urol Nephrol J*, 5, 4-11.
- CABRALDA, T., WADHWA, N. K. & SUH, H. 1998. Use of Amuchina 50% solution versus povidone-iodine 10% solution for transfer-set change in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial*, 14, 142-144.

- CALAME, W., HENDRICKX, R. J. B. M., NAMAVAR, F., OE, L. P. & BEELEN, R. H. J. 1995. Effect of glucose in dialysis fluid on antibacterial defence in the peritoneal cavity. *J Infect*, 30, 227-233.
- CAPORALE, N., CALEGARI, L., PEREZ, D. & GEZUELE, E. 1996. Peritoneal catheter colonization and peritonitis with *Aureobasidium pullulans*. *Perit Dial Int*, 16, 97-98.
- CHAUDHARY, K. & KHANNA, R. 2010. Biocompatible peritoneal dialysis solutions: do we have one? *Clin J Am Soc Nephrol*, 5, 723-732.
- CHO, Y., BADVE, S. V., HAWLEY, C. M., WIGGINS, K. J. & JOHNSON, D. W. 2012. Biocompatible peritoneal dialysis fluids: clinical outcomes. *Int J Nephrol*, 1-9.
- CHOI, P. & BROWN, E. A. 2003. Peritoneal dialysis. *Medicine*, 31, 70-73.
- COGEN, A. L., NIZET, V. & GALLO, R. L. 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Brit J Dermatol*, 158, 442-455.
- DASGUPTA, M., LARABIE, M., LAM, K., BETTCHER, K., TYRRELL, D. & COSTERTON, J. 1990. Growth of bacterial biofilms on Tenckhoff catheter discs in vitro after simulated touch contamination of the Y-connecting set in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Nephrol*, 10, 353-358.
- DASGUPTA, M., ULAN, R. A., BETTCHER, K., BURNS, V., LAM, K., DOSSETOR, J. & COSTERTON, J. 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) *Adv Perit Dial*, 6, 102-109.
- DASGUPTA, M., WARD, K., NOBLE, P., LARABIE, M. & COSTERTON, J. 1994 Development of bacterial biofilms on silastic catheter materials in peritoneal dialysis fluid. *Am J Kidney Dis*, 23, 709-716.
- DASGUPTA, M. K. 2000. Exit-site and catheter-related infections in peritoneal dialysis: problems and progress. *Nephrology*, 5, 17-25.
- DASGUPTA, M. K., ANWAR, H. & COSTERTON, J. W. 1992. Bacterial biofilms and peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Int Biodeterior Biodegrad*, 30, 167-176.
- DASGUPTA, M. K., BETTCHER, K. B., ULAN, R. A., BURNS, V., LAM, K., DOSSETOR, J. B. & COSTERTON, J. W. 1987. Relationship of adherent bacterial biofilms to peritonitis in chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 7, 168-173.

- DAWSON, M. S., HARFORD, A. M., GARNER, B. K., SICA, D. A., LANDWEHR, D. M. & DALTON, H. P. 1985. Total volume culture technique for the isolation of microorganisms from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with peritonitis. *J Clin Microbiol*, 22, 391-394.
- DE FREITAS, D. & GOKAL, R. 2005. Sterile peritonitis in the peritoneal dialysis patient. *Perit Dial Int*, 25, 146-151.
- DEMETRIOU, D., HABICHT, A., SCHILLINGER, M., HÖRL, W. H. & VYCHYTIL, A. 2006. Adequacy of automated peritoneal dialysis with and without manual daytime exchange: A randomized controlled trial. *Kidney Int*, 70, 1649-1655.
- DONLAN, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, 33, 1387-1392.
- DONLAN, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8, 881-890.
- DONLAN, R. M. & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15, 167-193.
- DONLAN, R. M., MURGA, R., BELL, M., TOSCANO, C. M., CARR, J. H., NOVICKI, T. J., ZUCKERMAN, C., COREY, L. C. & MILLER, J. M. 2001. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J Clin Microbiol*, 39, 750-753.
- DUNNE, W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*, 15, 155-166.
- DUWE, A. K., VAS, S. I. & WEATHERHEAD, J. W. 1981. Effects of the composition of peritoneal dialysis fluid on chemiluminescence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *Infect Immun*, 33, 130-135.
- ELLAM, T. & WILKIE, M. 2007. Peritoneal dialysis. *Medicine*, 35, 466-469.
- FINKELSTEIN, E. S., JEKEL, J., TROIDLE, L., GORBAN-BRENNAN, N., FINKELSTEIN, F. O. & BIA, F. J. 2002. Patterns of infection in patients maintained on long-term peritoneal dialysis therapy with multiple episodes of peritonitis. *Am J Kidney Dis*, 39, 1278-1286.
- FLANIGAN, M. & GOKAL, R. 2005. Peritoneal catheters and exit-site practices toward optimum peritoneal access: a review of current developments. *Perit Dial Int*, 25, 132-139.
- FRIED, L. & PIRAINO, B. 2009. Peritonitis. In: KHANNA, R. & KREDIET, R. (eds.) *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis*. USA: Springer, 3<sup>th</sup> edition.



- GIACCHINO, F., BELARDI, P., MERLINO, C., AIMINO, M., GARNERI, G., CUFFINI, A. & TULLIO, V. 1997. Treatment of *Fusarium* peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Perit Dial Int*, 17, 403-404.
- GOKAL, R. & MALLICK, N. P. 1999. Peritoneal dialysis. *The Lancet*, 353, 823-828.
- GORMAN, S. P., ADAIR, C. G. & MAWHINNEY, W. M. 1994. Incidence and nature of peritoneal catheter biofilm determined by electron and confocal laser scanning microscopy. *Epidemiol and Infect*, 112, 551-559.
- GORMAN, S. P., JONES, D. S., MAWHINNEY, W. M., MCGOVERN, J. G. & ADAIR, C. G. 1997. Conditioning fluid influences on the surface properties of silicone and polyurethane peritoneal catheters: implications for infection. *J Mater Sci Mater Med*, 8, 631-635.
- GORMAN, S. P., MAWHINNEY, W. M., ADAIR, C. G. & ISSOUCKIS, M. 1993. Confocal laser scanning microscopy of peritoneal catheter surfaces. *J Med Microbiol*, 38, 411-417.
- HAIH, J., DEGUN, A., EYDMANN, M., MILLAR, M. & WILKS, M. 2011. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 49, 3441.
- HARRISON, J. J., STREMIK, C. A., TURNER, R. J., ALLAN, N. D., OLSON, M. E. & CERI, H. 2010. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc* 5, 1236-1254.
- HEJAZI, A. & FALKINER, F. R. 1997. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*, 46, 903-912.
- HERMSEN, E. D., HOVDE, L. B., HOTCHKISS, J. R. & ROTSCHAFER, J. C. 2003. Increased killing of *Staphylococci* and *Streptococci* by daptomycin compared with cefazolin and vancomycin in an in vitro peritoneal dialysate model. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 3764-3767.
- HILTON, R. 2011. Defining acute renal failure. *Can Med Assoc J*, 183, 1167-1169.
- HIMMELFARB, J. & IKIZLER, T. A. 2010. Hemodialysis. *N Engl J Med*, 363, 1833-1845.
- HIREMATH, S. & BIYANI, M. 2006. Technique Survival with *Serratia* peritonitis. *Adv Perit Dial*, 22, 77-76.
- HOTCHKISS, J. R., HERMSEN, E. D., HOVDE, L. B., SIMONSON, D. A., ROTSCHAFER, J. C. & CROOKE, P. S. 2004. Dynamic analysis of peritoneal dialysis associated peritonitis. *ASAIO Journal*, 50, 568-576

- HUANG, J. W., CHU, T. S., WU, M. S., PENG, Y. S. & HSIEH, B. S. 2000. Visible *Penicillium* spp. colonization plaques on a Tenckhoff catheter without resultant peritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Nephrol Dial Transplant*, 15, 1872-1873.
- JOHNSON, D., CLARKE, M., WILSON, V., WOODS, F. & BROWN, F. 2010. Rationale and design of the balANZ trial: A randomised controlled trial of low GDP, neutral pH versus standard peritoneal dialysis solution for the preservation of residual renal function. *BMC Nephrol*, 11, 1-7.
- KAPLAN, J. B. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dental Res*, 89, 205-218.
- KATHURIA, P., TWARDOWSKI, Z. J. & NICHOLS, W. K. 2009. Peritoneal dialysis access and exit-site care including surgical aspects. In: KHANNA, R. & KREDIET, R. (eds.) *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis*. USA: Springer, 3<sup>th</sup> edition.
- KDOQI 2007. KDOQI Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, 49, 12-154.
- KRISTINSSON, K. G., SPENCER, R. C. & BROWN, C. B. 1986. Clinical importance of production of slime by coagulase negative *staphylococci* in chronic ambulatory peritoneal dialysis. *J Clin Pathol*, 39, 117-118.
- KWASNY, S. M. & OPPERMAN, T. J. 2010. Static biofilm cultures of Gram-positive pathogens grown in a microtiter format used for anti-biofilm drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol*, 50, 13A.18.11-13A.18.2.
- LAMEIRE, N., VAN BIESEN, W. & VANHOLDER, R. 2000. The role of peritoneal dialysis as first modality in an integrative approach to patients with end-stage renal disease. *Perit Dial Int*, 20, 134-141.
- LEE, J. U., KIM, J. K., YUN, S. H., PARK, M. S., LEE, N. E., SUN, I. O. & LEE, K. Y. 2013. A case of peritoneal dialysis-associated peritonitis caused by *Sphingomonas paucimobilis*. *Kidney Res Clin Pract*, 32, 78-80.
- LEWIS, J. K., WEI, J. & SIUZDAK, G. 2000. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. In: MEYERS, R. A. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. USA: John Wiley & Sons Ltd, 3<sup>th</sup> edition.
- LI, P. K.-T., SZETO, C. C., PIRAINO, B., BERNARDINI, J., FIGUEIREDO, A. E., GUPTA, A., JOHNSON, D. W., KUIJPER, E. J., LYE, W.-C., SALZER, W., SCHAEFER, F. & STRUIJK, D.

- G. 2010. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update. *Perit Dial Int*, 30, 393-423.
- LOCCI, R., ROMAGNONI, M., BECCARI, M., FAIOLO, S., GRANELLO, E., LISCHETTI, M. G., QUARONI, S. & SCALIA, P. 1984. Massive colonization of an in-dwelling catheter by *Penicillium pinophilum* without peritonitis. *Perit Dial Int*, 4, 243-244.
- LUKOWSKI, K. J., PETERS, G., FINKE, K., LOCCI, R. & PULVERER, G. 1983. Morphological observations on an in-dwelling peritoneal catheter infected with *Candida albicans*. *Perit Dial Int*, 3, 44-45.
- MACHADO, D. 2012. *Investigação dos biofilmes microbianos em cateteres de diálise peritoneal*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho.
- MACHUCA, E., ORTIZ, A. & RABAGLIATI, R. 2005. *Stenotrophomonas maltophilia* peritonitis in a patient receiving automated peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial*, 21, 63-65.
- MAHAJAN, S., TIWARI, S., KALRA, V., BHOWMIK, D., AGARWAL, S., DASH, S. & KUMAR, P. 2005. Effect of local mupirocin application on exit-site infection and peritonitis in an Indian peritoneal dialysis population. *Perit Dial Int*, 25, 473-477.
- MAHAMI, T. & ADU-GYAMFI, A. 2011. Biofilm-associated infections: public health implications *IRJM*, 2, 375-381.
- MAKI, D. G., WEISE, C. E. & SARAFIN, H. W. 1977. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med*, 296, 1305-1309.
- MARRIE, T. J., NOBLE, M. A. & COSTERTON, J. W. 1983. Examination of the morphology of bacteria adhering to peritoneal dialysis catheters by scanning and transmission electron microscopy. *J Clin Microbiol*, 18, 1388-1398.
- MARTINS, M., RODRIGUES, A., PEDROSA, J. M., CARVALHO, M. J., CABRITA, A. & OLIVEIRA, R. 2013. Update on the challenging role of biofilms in peritoneal dialysis. *Biofouling*, 29, 1015-1027.
- MARVIN, L. F., ROBERTS, M. A. & FAY, L. B. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, 337, 11-21.
- MATUSZKIEWICZ-ROWINSKA, J. 2009. Update on fungal peritonitis and its treatment. *Perit Dial Int*, 29, 161-165.
- MCCORMICK, E. M. & ECHOLS, R. M. 1987. Effect of peritoneal dialysis fluid and pH on bactericidal activity of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 31, 657-659.

- MCDONALD, W. A., WATTS, J. & BOWMER, M. I. 1986. Factors affecting *Staphylococcus epidermidis* growth in peritoneal dialysis solutions. *J Clin Microbiol*, 24, 104-107.
- MCGINLEY, K. J., LARSON, E. L. & LEYDEN, J. J. 1988. Composition and density of microflora in the subungual space of the hand. *J Clin Microbiol*, 26, 950-953.
- MCINTYRE, C. W. 2007. Update on peritoneal dialysis solutions. *Kidney Int*, 71, 486-490.
- MCNEELY, D. J., VAS, S. I., DOMBROS, N. & OREOPOULOS, D. G. 1981. *Fusarium* peritonitis: an uncommon complication of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 1, 94-96.
- MELLMANN, A., CLOUD, J., MAIER, T., KECKEVOET, U., RAMMINGER, I., IWEN, P., DUNN, J., HALL, G., WILSON, D., LASALA, P., KOSTRZEWA, M. & HARMSEN, D. 2008. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol*, 46, 1946-1954.
- MILLER, T. & FINDON, G. 1997. Touch contamination of connection devices in peritoneal dialysis—a quantitative microbiologic analysis. *Perit Dial Int*, 17, 560-567.
- MISRA, M. 2005. The basics of hemodialysis equipment. *Hemodial Int*, 9, 30-36.
- MYSZKA, K. & CZACZYK, K. 2012. Mechanisms determining bacterial biofilm resistance to antimicrobial factors. *Antimicrob Agents*, 213-238.
- NESSIM, S. J., BARGMAN, J. M. & JASSAL, S. V. 2010. Relationship between double-cuff versus single-cuff peritoneal dialysis catheters and risk of peritonitis. *Nephrol Dial Transpl*, 25, 2310-2314.
- NESSIM, S. J., NISENBAUM, R., BARGMAN, J. M. & JASSAL, S. V. 2012. Microbiology of peritonitis in peritoneal dialysis patients with multiple episodes. *Perit Dial Int*, 32, 316-321.
- NODAIRA, Y., IKEDA, N., KOBAYASHI, K., WATANABE, Y., INOUE, T., GEN, S., KANNO, Y., NAKAMOTO, H. & SUZUKI, H. 2008. Risk factors and cause of removal of peritoneal dialysis catheter in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial*, 24, 65-68.
- OREOPOULOS, D., THODIS, E. & PARASKEVAS, K. 2008. The promising future of long-term peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol*, 40, 405-410.
- OREOPOULOS, D. G. & TZAMALOUKAS, A. H. 2008. Our war against bacteria in peritoneal dialysis, the last 40 years! *Int Urol Nephrol*, 40, 709-714.

- ORTIZ, A., SANTAMARIA, B. & MONTENEGRO, J. S. 2011. Biocompatible solutions for peritoneal dialysis. *Progress in Peritoneal Dialysis*. Spain: InTech, 1<sup>th</sup> edition.
- PANKEY, G. A. & SABATH, L. D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin Infect Dis*, 38, 864-870.
- PARK, S., KIM, K., JOO, I. & KIM, H. 1996. Scanning electron microscopy studies of peritoneal catheter in CAPD peritonitis due to *Aspergillus fumigatus*. *Perit Dial Int*, 16, 81-83.
- PEPPELENBOSCH, A., VAN KUIJK, W. H. M., BOUVY, N. D., VAN DER SANDE, F. M. & TORDOIR, J. H. M. 2008. Peritoneal dialysis catheter placement technique and complications. *NDT Plus*, 1, 23-28.
- PERRY, S. 1998. Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Mol Biotechnol*, 9, 59-64.
- PETERS, T., POTTER, R., LI, X., HE, Z., HOSKINS, G. & FLESSNER, M. F. 2011. Mouse model of foreign body reaction that alters the submesothelium and transperitoneal transport. *Am J Physiol Renal Physiol*, 300, 283-289.
- PIHL, M., DAVIES, J. R., JOHANSSON, A.-C. & SVENSATER, G. 2012. Bacteria on catheters in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 51, 1-9.
- PINTO, A., HALLIDAY, C., ZAHRA, M., VAN HAL, S., OLMA, T., MASZEWSKA, K., IREDELL, J. R., MEYER, W. & CHEN, S. C. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PloS one*, 6, 257-212.
- PIRAINO, B. 2010. Mupirocin for preventing exit-site infection and peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. Was it effective? *Nephrol Dial Transpl*, 25, 349-352.
- PIRAINO, B., BERNARDINI, J., BROWN, E., FIGUEIREDO, A., JOHNSON, D. W., LYE, W.-C., PRICE, V., RAMALAKSHMI, S. & SZETO, C.-C. 2011. ISPD position statement on reducing the risks of peritoneal dialysis-related infections. *Perit Dial Int*, 31, 614-630.
- PRAKASH B, V. B., KRISHNAPPA G. 2003. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr Sci*, 85, 1299-1307.
- PRASAD, N. & GUPTA, A. 2005. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 25, 207-222.
- QUINTANAR LARTUNDO, J. A., PALOMAR, R., DOMINGUEZ-DIEZ, A., SALAS, C., RUIZ-CRIADO, J., RODRIGO, E., MARTINEZ DE FRANCISCO, A. L. & ARIAS, M. 2011. Microbiological

- profile of peritoneal dialysis peritonitis and predictors of hospitalization. *Adv Perit Dial*, 27, 38-42.
- RAMAGE, G., MARTÍNEZ, J. P. & LÓPEZ-RIBOT, J. L. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*, 6, 979–986.
- RODRIGUES, A. 2010. *Diálise Peritoneal - Uma diálise feita em casa: para quando uma opção?*, Portugal: Lidel, 1ª edição.
- RODRÍGUEZ-CARMONA, A., PÉREZ FONTÁN, M., GARCÍA FALCÓN, T. & VALDÉS CAÑEDO, F. 2000. Prevalence of microbial colonization in removed peritoneal catheters: a prospective study. *Adv Perit Dial*, 16, 276-279.
- SANTOS, C., LIMA, N., SAMPAIO, P. & PAIS, C. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Micr Infec Dis*, 71, 304-308.
- SCHMITT, C. P., BAKKALOGLU, S. A., KLAUS, G., SCHRODER, C. & FISCHBACH, M. 2011. Solutions for peritoneal dialysis in children: recommendations by the European Pediatric Dialysis Working Group. *Pediatr Nephrol*, 26, 1137-1147.
- SCHMITT, C. P., VON HEYL, D., RIEGER, S., ARBEITER, K., BONZEL, K. E., FISCHBACH, M., MISSELWITZ, J., PIEPER, A.-K., SCHAEFER, F. & GROUP, F. T. M. E. P. P. D. S. 2007. Reduced systemic advanced glycation end products in children receiving peritoneal dialysis with low glucose degradation product content. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 2038-2044.
- SEELEY, R., STEPHENS, T. & TATE, P. 2005. *Anatomia & Fisiologia*. Portugal: Lusodidacta, 1ª edição.
- SEKKARIE, M., HOLMES, C., RANJIT, U. & KAUFFMAN, C. 1991. Grossly visible fungal colonization of a Tenckhoff catheter. A case report and literature review. *Perit Dial Int*, 11, 85-87.
- SENG, P., DRANCOURT, M., GOURIET, F., LA SCOLA, B., FOURNIER, P.-E., ROLAIN, J. M. & RAOULT, D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49, 543-551.
- SHALIT, I., WELCH, D. F., SAN JOAQUIN, V. H. & MARKS, M. I. 1985. In vitro antibacterial activities of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* in peritoneal dialysis fluid. *Antimicrob Agents Chemother*, 27, 908-911.

- SHARMA, R., FARMER, C. K., GRANSDEN, W. R. & OGG, C. S. 1998. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis due to *Cylindrocarpon lichenicola* infection. *Nephrol Dial Transpl*, 13, 2662-2664.
- SOUMYA, E. A., KORAICHI, I. S., MADANI, K., HASSAN, L. & FATIMA, H. 2012. Scanning Electron Microscopy (SEM) and environmental SEM: suitable tools for study of adhesion stage and biofilm formation. *Scanning Electron Microscopy*. Croatia: InTech, 1<sup>th</sup> edition.
- SWARTZ, R., MESSANA, J., HOLMES, C. & WILLIAMS, J. 1991. Biofilm formation on peritoneal catheters does not require the presence of infection. *ASAIO Journal*, 37, 626-634.
- SZETO, C.-C., KWAN, B. C.-H., CHOW, K.-M., LAU, M.-F., LAW, M.-C., CHUNG, K.-Y., LEUNG, C.-B. & LI, P. K.-T. 2008. Coagulase Negative *Staphylococcal* peritonitis in peritoneal dialysis patients: review of 232 consecutive cases. *J Am Soc Nephrol*, 3, 91-97.
- THODIS, E., PASSADAKIS, P., LYRANTZOPOULOS, N., PANAGOUSTOS, S., VARGEMEZIS, V. & OREOPOULOS, D. 2005. Peritoneal catheters and related infections. *Int Urol Nephrol*, 37, 379-393.
- TOBUDIC, S., KRATZER, C., POEPL, W., VYCHYTIL, A. & BURGMANN, H. 2011. Impact of various peritoneal dialysis solutions on the growth of common bacterial and yeast pathogens. *Perit Dial Int*, 31, 688-692.
- TOBUDIC, S., POEPL, W., KRATZER, C., VYCHYTIL, A. & BURGMANN, H. 2012. Comparative in vitro antimicrobial activity of vancomycin, teicoplanin, daptomycin and ceftobiprole in four different peritoneal dialysis fluids. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 1327-1334.
- TONG, Y., DOU, L. & WANG, C. 2013. Peritonitis due to *Burkholderia gladioli*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 77, 174-175.
- TRAUTNER, B. W. & DAROUICHE, R. O. 2004. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Arch Intern Med*, 168, 842-850.
- VARGEMEZIS, V., PASSADAKIS, P., LIAKOPOULOS, V., KRIKI, P. & KANTARTZI, A. 2004. Fungal colonization of peritoneal catheter with persistently sterile cloudy effluent, in the absence of clinical findings of fungal peritonitis. *Perit Dial Int*, 24, 81-84.
- VARGEMEZIS, V. & THODIS, E. 2001. Prevention and management of peritonitis and exit-site infection in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transpl*, 16, 106-108.
- VERBRUGH, H. A., KEANE, W. F., CONROY, W. E. & PETERSON, P. K. 1984. Bacterial growth and killing in chronic ambulatory peritoneal dialysis fluids. *J Clin Microbiol*, 20, 199-203.

- VERGER, C., CHESNEAU, A.-M., THIBAUT, M. & BATAILLE, N. 1987. Biofilm on Tenckhoff catheters: a negligible source of contamination. *Perit Dial Int*, 7, 174-178.
- VON GRAEVENITZ, A. & AMSTERDAM, D. 1992. Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Rev*, 5, 36-48.
- WAGNER, C., AYTAC, S. & HÄNSCH, G. M. 2011. Biofilm growth on implants: bacteria prefer plasma coats. *Int J Artif Organ*, 34, 811-817.
- WEGMANN, F., HEILESEN, A. M. & HORN, T. 1988. Tenckhoff catheter penetrated by *Aspergillus Fumigatus*: a case report. *Perit Dial Int*, 8, 281-284.
- WILCOX, M. H., SMITH, D. G., EVANS, J. A., DENYER, S. P., FINCH, R. G. & WILLIAMS, P. 1990. Influence of carbon dioxide on growth and antibiotic susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* cultured in human peritoneal dialysate. *J Clin Microbiol*, 28, 2183-2186.
- WILLCOCKS, L. & SMITH, K. G. C. 2003. Renal transplantation. *Medicine*, 31, 73-77.
- WITOWSKI, J., KORYBALSKA, K., WISNIEWSKA, J., BREBOROWICZ, A., GAHL, G. M., FREI, U., PASSLICK-DEETJEN, J. & JÖRRES, A. 2000. Effect of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function. *J Am Soc Nephrol*, 11, 729-739.
- WONG, W. W. 2013. Melioidosis and peritoneal dialysis related peritonitis *Med J Malaysia* 68 179-180.
- XU, G., TU, W. & XU, C. 2010. Mupirocin for preventing exit-site infection and peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transpl*, 25, 587-592.
- YANAGISAWA, N., LI, D. & LJUNGH, A. 2004. Protein adsorption on ex vivo catheters and polymers exposed to peritoneal dialysis effluent. *Perit Dial Int*, 24, 264-273.
- YIP, T., TSE, K.-C., NG, F., HUNG, I., LAM, M.-F., TANG, S., LUI, S.-L., LAI, K.-N., CHAN, T.-M. & LO, W.-K. 2011. Clinical course and outcomes of single-organism *Enterococcus* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*, 31, 522-528.
- ZIMMERMAN, S. W., O'BRIEN, M., WIEDENHOEFT, F. A. & JOHNSON, C. A. 1988. *Staphylococcus aureus* peritoneal catheter-related infections: a cause of catheter loss and peritonitis. *Perit Dial Int*, 8, 191-194.