



# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA,

SALUD PÚBLICA Y MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: SALUD Y DESARROLLO EN LOS TRÓPICOS

## TESIS DOCTORAL

DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICACIÓN DE  
PATÓGENOS ASOCIADOS A INFECCIONES DE CATÉTERES MEDIANTE  
MALDI-TOF

### DOCTORANDO

Carolina Isabel Moura Micaelo Pinheiro

### DIRECTORES

Profesor Doutor Juan Luis Muñoz Bellido

Profesor Doutor Fernando Sánchez Juanes

SALAMANCA 2023



# VNiVERSIDAD D SALAMANCA

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA,

SALUD PÚBLICA Y MICROBIOLOGÍA MÉDICA

PROGRAMA DE DOCTORADO: SALUD Y DESARROLLO EN LOS TRÓPICOS

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICAÇÃO  
DE PATÓGENIOS ASSOCIADOS A INFEÇÕES DE CATÉTERES ATRAVÉS  
DE EM MALDI-TOF

**Tese para a obtenção de Grau de Doutor**

**Carolina Isabel Moura Micaelo Pinheiro**

## ORIENTADORES

Professor Doutor Juan Luis Muñoz Bellido

Professor Doutor Fernando Sánchez Juanes

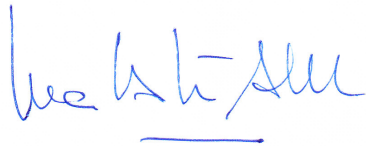
**SALAMANCA 2023**

Los Doctores D. Juan Luis Muñoz Bellido, profesor del Dpto. De Ciencias Biomédicas y del Diagnóstico de la Universidad de Salamanca y D. Fernando Sánchez Juanes, profesor del Dpto. De Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.


**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada: “DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS ASOCIADOS A INFECCIONES DE CATÉTERES MEDIANTE MALDI-TOF” realizada por Carolina Isabel Moura Micaelo Pinheiro, cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que conste y en el cumplimiento de la normativa vigente, firmamos el presente certificado, en Salamanca, a 8 de noviembre de 2023.



Fdo. Dr.D. Juan Luis Muñoz Bellido  
Catedrático  
Universidad de Salamanca



Fdo. Dr. D. Fernando Sánchez Juanes  
Profesor Contratado Doctor  
Universidad de Salamanca

*“Ninguna ciência, en cuanto a ciência, engana; el engano está  
en quien no lo sabe”*

*Miguel de Cervantes*

## AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado às pessoas que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles o meu agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Juan Luis Muñoz Bellido e ao Professor Doutor Fernando Sánchez Juanes pela forma como orientaram o meu trabalho. As notas dominantes da vossa orientação e o saber científico foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Estou grata pela cordialidade com que sempre me receberam, pela forma como entenderam sempre o meu “portunhol” e também pela liberdade de ações que me permitiram, fatos decisivos para que este trabalho contribuisse para o meu desenvolvimento científico e pessoal.

Em segundo lugar agradeço ao Dra. Fátima Madureira Vale, Diretora do Serviço de Patologia Clínica ULS Guarda. Obrigada pela ajuda para a realização deste projeto, pelos bons conselhos, pelas horas de sabedoria transmitida e por permitir sempre o meu desenvolvimento enquanto profissional.

À equipa de Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica e Técnicos Superiores de Saúde do Serviço de Patologia Clínica ULS Guarda, sobretudo à equipa da microbiologia com especial agradecimento à Ana Santos, pelo apoio e pelas horas de dedicação e bons conselhos. Uma muito obrigada, sem a vossa preciosa ajuda seria tudo mais difícil.

Gostaria ainda de agradecer à minha mãe, a minha grande heroína, pois sem ela nada disto era possível. Obrigada pela coragem e determinação que me transmitiste ao longo de toda a minha vida e pelas horas infinitas de disponibilidade e amor para com o Francisco. Obrigado à minha estrelinha que mesmo longe me continua a ensinar o caminho

Ao meu marido, Bruno, obrigada pelo amor, partilha, companheirismo e apoio incondicional, transmitindo-me sempre força, calma e determinação. Sem ti este caminho não seria possível.

E claro, ao meu querido filho, Francisco, que amo incondicionalmente e que dá cor à minha vida, espero doravante compensá-lo pelas horas de atenção e brincadeira que lhe devo. Foi ele o meu grande estímulo nesta caminhada.

## RESUMEN

Los catéteres venosos centrales (CVC) son los dispositivos intravasculares más utilizados en la práctica clínica moderna y son de fundamental importancia para el tratamiento de muchos pacientes. La infección del torrente sanguíneo relacionada con el CVC es una de las principales complicaciones de su uso. La dificultad de diagnosticar infecciones asociadas con el uso de CVC es uno de los problemas que enfrentan los clínicos. En este sentido, la espectrometría de masas MALDI-TOF se presenta como una novedad prometedora para los procedimientos de diagnóstico de Microbiología Clínica, utilizándose para identificaciones directamente a partir de muestras clínicas.

El propósito de este estudio es desarrollar un método que permitiera un diagnóstico etiológico rápido de la infección del catéter, con una sensibilidad y especificidad al menos similar a los métodos de cultivo.

La muestra en estudio incluyó 105 puntas de catéter de individuos con bacteriemia asociada al CVC e ingresados en los servicios de la Unidad Local de Salud de Guarda. El CVC se retiró de los individuos para evaluación/diagnóstico microbiológico. Para el diagnóstico microbiológico de la punta del catéter se evaluaron mediante un método de diagnóstico semicuantitativo, un método cuantitativo y EM-MALDI-TOF.

Los resultados obtenidos indicaron que los resultados positivos del EM MALDI-TOF, con una puntuación superior a 1,7, presentan una excelente correlación con las técnicas convencionales, por lo que pueden asumirse como una técnica de diagnóstico rápido y con una fiabilidad muy alta, tanto a la hora de establecer los criterios de infección y en términos de identificación específica del microorganismo involucrado, lo que contribuirá a orientar las decisiones clínicas, decisiones que se reflejarán en mejores resultados de salud, así como en la reducción de costos asociados a este tipo de infecciones. También son relevantes los resultados obtenidos con *Klebsiella pneumoniae* spp. (22,2%), seguido de *Staphylococcus aureus* (11,1%), *Candida* spp. (10,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,6%) y *Enterococcus* spp. (5,1%).

El diagnóstico rápido y preciso de la infección asociada a CVC es esencial para guiar las decisiones clínicas, garantizar una mejor atención y reducir las tasas de mortalidad y morbilidad, así como los costos asociados con las estancias hospitalarias.

**Palabras clave:** CVC, Infecciones asociadas a catéteres venosos centrales; Bacteriemia; Diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas al CVC; MALDI-TOF



## RESUMO

Os Cateteres Venosos Centrais (CVC) são os dispositivos intravasculares mais utilizados na prática clínica moderna, e de fundamental importância para o tratamento de muitos pacientes. A infecção da corrente sanguínea relacionada com CVC constitui uma das principais complicações do seu uso. A dificuldade de diagnosticar as infecções associadas ao uso de CVC é um dos problemas com que muitos clínicos se deparam. Neste sentido, a espectrometria de massa MALDI-TOF surge como uma promissora novidade aos procedimentos de diagnósticos de Microbiologia Clínica sendo utilizada para identificações diretamente a partir de amostras clínicas

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método que permita um diagnóstico etiológico rápido de infecções associadas a CVC, com sensibilidade e especificidade pelo menos semelhantes aos métodos de cultura.

A amostra em estudo contemplou 105 pontas de cateteres de indivíduos com bacteremia associada a CVC e internados nos serviços da Unidade Local de Saúde da Guarda. Aos indivíduos foi retirado o CVC para avaliação/diagnóstico microbiológico. Para o diagnóstico microbiológico da ponta do cateter estes foram avaliados por método de diagnóstico semi-quantitativo, por método quantitativo e os seus caldos por EM MALDI-TOF.

Os resultados obtidos indicaram que os resultados positivos de EM MALDI-TOF, com uma pontuação superior a 1,7, apresentam uma excelente concordância com as técnicas convencionais, pelo que podem ser assumidos como uma técnica de diagnóstico rápido com uma fiabilidade muito elevada, tanto em termos de estabelecimento do critério de infecção como em termos de identificação específica do microrganismo envolvido o que contribuirá para a orientação de decisões clínicas, decisões essas que se irão refletir em melhores resultados em saúde, bem como na redução de custos associados a este tipo de infecções. Este estudo possibilitou ainda a avaliação da distribuição epidemiológica deste tipo de infecções, verificando-se que a predominância das infecções associadas a CVC por *Staphylococcus* coagulase negativo. Com relevância ainda os resultados obtidos com o isolamento de *Klebsiella*

*pneumoniae* spp. (22,2%), seguindo-se *Staphylococcus aureus* (11,1%), *Candida* spp. (10,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,6%) e *Enterococcus* spp. (5,1%).

O diagnóstico rápido e preciso da infecção associada a CVC é essencial para orientação das decisões clínicas, garantindo melhores cuidados e reduzindo os índices de mortalidade e morbidade, bem como custos associados à permanência hospitalar

**Palavras-chave:** CVC, Infecções associadas a cateteres venosos centrais; Bacteremia; Diagnóstico Microbiológico de infecções associadas a CVC; MALDI-TOF

## ABSTRACT

Central Venous Catheters (CVC) are the most used intravascular devices in modern clinical practice, and are of fundamental importance for the treatment of many patients. CVC-related bloodstream infection is one of the main complications of its use. The difficulty of diagnosing infections associated with the use of CVC is one of the problems that many clinicians face. In this sense, MALDI-TOF mass spectrometry appears as a promising new addition to Clinical Microbiology diagnostic procedures, being used for identifications directly from clinical samples.

The objective of this study was to develop a method that allows a rapid etiological diagnosis of catheter infection, with sensitivity and specificity at least similar to culture methods.

The study sample included 105 catheter tips from individuals with bacteremia associated with CVC and admitted to the services of the Local Health Unit of Guarda. The CVC was removed from the individuals for microbiological evaluation/diagnosis. For the microbiological diagnosis of the catheter tip, they were evaluated using a semi-quantitative method, a quantitative method and their broths by MALDI-TOF MS.

The results obtained indicated that the positive results of EM MALDI-TOF, with a score greater than 1.7, present an excellent correlation with conventional techniques, so they can be assumed as a rapid diagnostic technique with very high reliability, both in terms of establishing the infection criteria and in terms of specific identification of the microorganism involved, which will contribute to guiding clinical decisions, decisions that will be reflected in better health outcomes, as well as in the reduction of costs associated with this type of infections. Also relevant are the results obtained with the isolation of *Klebsiella pneumoniae* spp. (22.2%), followed by *Staphylococcus aureus* (11.1%), *Candida* spp. (10.3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8.6%) and *Enterococcus* spp. (5.1%).

Rapid and accurate diagnosis of CVC-associated infection is essential for guiding clinical decisions, ensuring better care and reducing mortality and morbidity rates, as well as costs associated with hospital stays.

**Key words:** CVC, Infections associated with central venous catheters; Bacteremia; Microbiological diagnosis of infections associated with CVC; MALDI-TOF



# SÍNTESIS

## INTRODUCCIÓN

El uso de dispositivos intravasculares con fines diagnósticos y terapéuticos es cada vez más común, especialmente en pacientes con situaciones clínicas agudas o crónicas graves (Gaynes y Jacob 2021). Su uso para la administración de líquidos intravenosos, hemoderivados, medicamentos y monitorización hemodinámica se ha convertido en un componente esencial de la medicina moderna en pacientes hospitalizados (Gominet, Compain et al. 2017, Guzek, Rybicki et al. 2022). Se estima que el 70% de los pacientes ingresados en un hospital se someten a este procedimiento en algún momento de su estancia (Slobbe, Barzouhiet *al.* 2009, Osório, Oliveira et al. 2023). En España y según datos del programa de estudios sobre prevalencia de infecciones nosocomiales (programa EPINE, <https://epine.es/>), se considera que alrededor del 70% de los pacientes ingresados en hospitales son portadores de uno de estos dispositivos en algún momento y que en el 7% de los pacientes el Dispositivo Intravascular (DIV) utilizado es un catéter venoso central (CVC), colocado temporal o permanentemente (tipo Hickman® o Port-acath®)(Ferrer y Almirante 2014). En este sentido cabe destacar que existen numerosos tipos de catéteres y dispositivos intravasculares con diferentes características y finalidades. Los catéteres arteriales periféricos y los catéteres pulmonares se utilizan por períodos cortos de tiempo. Los primeros son los más utilizados y los que menos complicaciones infecciosas presentan, aunque algunos estudios muestran un aumento de las tasas de infección asociadas a este tipo de dispositivos (Mayer, Greeneet *al.* 2012, Mermelada 2017, Mansilla, Ahufingeret *al.* 2018), estos últimos generalmente están recubiertos de heparina y presentan poco riesgo, y la colonización no es común. Finalmente, los CVC son los que causan la mayoría de las infecciones relacionadas con el catéter (García-Rodríguez, Gómezet *al.* 2010, Almirante y Pahissa 2013, Gaynes y Jacob 2021) y que también requieren más atención por parte de los grupos de infección.

Un CVC es un dispositivo vascular que se inserta percutáneamente a través de un acceso venoso central (subclavio, yugular, femoral o axilar) que se utiliza para inyectar nutrición parenteral, productos sanguíneos o líquidos que

dañarían una vena periférica más pequeña. También se utiliza para hemodiálisis, obtención de productos sanguíneos y medición de la presión venosa central (Gominet, Compaignet *al.* 2017, Guzek, Rybicki et al. 2022). Así, estos son los dispositivos intravasculares más utilizados en hospitales, especialmente en medicina intensiva, ya que facilitan el tratamiento y diagnóstico de pacientes críticos (L. Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Rodrigues, Díaset *al.* 2016, Novosad, Fikeet *al.* 2020, Guzek, Rybicki et al. 2022) y su uso permite el acceso directo desde el ambiente externo al intravascular (Gaynes y Jacob 2021). Sin embargo, el CVC funciona como un cuerpo extraño y su uso presenta varios riesgos, desencadenando muchas veces un proceso inflamatorio en el lugar de inserción y su contacto con el torrente sanguíneo también plantea un riesgo inminente de propagación de microorganismos que pueden desencadenar infecciones sistémicas graves (Slobbe, Barzouhiet *al.* 2009).

La infección relacionada con el CVC es una de las principales complicaciones de su uso y la primera causa de bacteriemia nosocomial primaria (Slobbe, Barzouhiet *al.* 2009). Sin embargo, en cuanto a la terminología de las infecciones asociadas al catéter, ésta también es confusa y se utiliza de forma indiscriminada. En este contexto, es pertinente distinguir los tipos de infecciones asociadas a los catéteres vasculares y sus principales complicaciones. Por ello, los estándares internacionales publicados por el “Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades” (CDC) distinguen dos tipos de infecciones: las complicaciones locales que ocurren en ausencia de bacteriemia, aparentemente porque están asociadas con el propio catéter, y las infecciones del torrente sanguíneo asociadas con los catéteres. Siendo esta última una definición clínica que requiere pruebas de laboratorio específicas que identifiquen el catéter intravenoso como fuente de infección (O’Grady, Alejandro *et al.* 2011). Estas infecciones tienen un origen multifactorial y complejo, siendo varios los factores que contribuyen a que estos dispositivos sean susceptibles a la contaminación. Las tasas de infección relacionadas con CVC varían considerablemente según el tamaño del hospital, los servicios/unidades y el tipo de catéter (O’Grady, Alejandro *et al.* 2011). Además, las tasas de infección también se ven influenciadas por los factores de riesgo intrínsecos de los pacientes, como el tipo y la gravedad de la

enfermedad, así como por los parámetros relacionados con el catéter, es decir, las condiciones y el lugar de inserción. (Cabrero, Robledo et al. 2023). Por tanto, para que se produzca una infección asociada al catéter, los microorganismos deben tener acceso a la superficie intraluminal o extraluminal del CVC, con posterior adhesión y formación de biopelículas, que les permita una infección sostenida con posterior diseminación hematológica. (Donlan y Costerton 2002, Cabrero, Robledo et al. 2023, Refuveille, Josse et al. 2017, Cabrero, Robledo et al. 2023, Francia 2023). La colonización de la punta del CVC precede a la infección, y este acceso puede ocurrir a través de tres vías diferentes: colonización extraluminal, colonización intraluminal y colonización hematológica.

En este sentido, la dificultad para diagnosticar las infecciones asociadas al uso del catéter es uno de los problemas a los que se enfrentan muchos médicos (Aldea Mansilla, Martínez-Alarcón et al. 2019, Blot, Poulakou et al. 2019, Lorente, Lecuona et al. 2022). Esta evaluación se basa inicialmente en la sospecha clínica de infección por cambios en el sitio de inserción de la punta del catéter, es decir, signos clínicos como presencia de dolor, calor, edema, eritema, exudado purulento cerca del sitio de inserción del catéter y signos sistémicos como fiebre, hipotensión y taquicardia. Sin embargo, el cuadro clínico suele ser inespecífico, lo que requiere un diagnóstico de laboratorio para confirmar la infección relacionada con el catéter. (Gominet, Compain et al. 2017, Chaves, Garnacho Montero et al. 2018, Cantón-Bulnes y Garnacho-Montero 2019). En este sentido, el diagnóstico preciso y temprano de la infección del torrente sanguíneo asociada con el uso de catéteres es esencial para guiar las decisiones profesionales, y en las últimas décadas se han desarrollado varias pruebas de diagnóstico para una mejor orientación clínica. (Naomi P. O'Grady, Mary Alexander et al. 2011, Mansilla, Ahufinger et al. 2018, Safdar, Abad et al. 2019, Farina, Cornistein et al. 2019). Estas pruebas se clasifican en términos generales como métodos que requieren la extracción del dispositivo intravascular y son el tema central de esta investigación más detallada, y aquellos que no lo requieren. (Safdar, Abad et al., 2019). En general, aquellos que requieren extracción del dispositivo involucran cultivos cuantitativos (Maki y Sonication) o cualitativos del segmento del catéter,



aquellos que no requieren extracción e involucran hemocultivos pareados o examen de citocentrifugación.

La identificación de microorganismos aislados por los métodos descritos anteriormente se puede realizar utilizando métodos bioquímicos convencionales y a través del sistema EM MALDI-TOF. EM MALDI-TOF es una herramienta robusta para la identificación fenotípica de microorganismos a través del análisis de proteínas constituyentes de la pared celular y proteínas ribosomales, aumentando su confiabilidad en comparación con otras técnicas fenotípicas convencionales. La secuencia y el tamaño de las proteínas ribosómicas están altamente conservados entre diferentes especies bacterianas y, por lo tanto, se utilizan para identificar tipos individuales de bacterias (Bellido, Castaño et al. 2012, Vrioni, Tsiamis et al. 2018). El espectro generado por EM se interpreta como “huellas dactilares” de un taxón específico, discriminando especies de microorganismos estrechamente relacionadas. Esta metodología ofrece ventajas significativas como alta sensibilidad, velocidad de análisis, capacidad de identificar múltiples analitos y requiere solo pequeñas cantidades de muestra. Las aplicaciones clínicas de MALDI-TOF EM para aislados bacterianos aumentan constantemente, desde la identificación de especies y bacteriemia, hasta las aplicaciones más prometedoras en el futuro: detección de resistencia antimicrobiana y tipificación microbiana para estudios epidemiológicos (Karas y Hillenkamp 1988, Ferreira, Vega et al. 2010, Bellido y Buitrago 2015, Castaño, Juanes et al. 2016). En caso de urgencia clínica, es posible identificar el microorganismo patógenos directamente de muestras biológicas (muestras de orina, sangre, exudados, caldos, etc.) (Ferreira, Sánchez-Juanes et al. 2011, Bellido, Castaño. et al. 2012, Bellido y Buitrago 2015, Barberino, Silva et al. 2017, Haider, Campanero et al. 2023). Esta utilidad pasa por poder ser utilizado directamente en muestras clínicas, principalmente urocultivos y hemocultivos. En el primer caso se ha utilizado en combinación con diferentes métodos de diagnóstico de infecciones urinarias con resultados satisfactorios. En el caso de su uso en hemocultivos positivos, los porcentajes de identificación directa son elevados, especialmente en bacterias Gram-negativas, y la orientación terapéutica inmediata es sin duda su aporte más valioso. Cabe señalar que la tecnología MALDI-TOF tiene, a priori, un

inconveniente para su uso global en muestras directas: aunque puede ser un método de diagnóstico muy específico, no es un método especialmente sensible, ya que requiere una cantidad considerable de proteínas. para obtener perfiles fiables. Esto hace que, en muchas muestras en las que la concentración de microorganismos o la cantidad de muestra que se puede obtener es pequeña (LCR, líquido articular, líquido peritoneal...), su sensibilidad sea baja. Existe, sin embargo, la posibilidad de superar esta limitación, al menos parcialmente, mediante una breve incubación en medio líquido, lo que aumentaría significativamente su sensibilidad y seguiría suponiendo un importante ahorro de tiempo en el diagnóstico (Bellido y Buitrago 2015). Por tanto, aunque faltan estudios que sistematicen estos protocolos, es posible que esta estrategia ofrezca valores de sensibilidad más atractivos, con ganancias de velocidad aún considerables. Así, si la hipótesis propuesta revela un nuevo método automatizado, sencillo, robusto, de bajo coste y con capacidad de discriminación y reproducibilidad similar a las técnicas convencionales, aunque sólo sea para algunos grupos de microorganismos, estaremos ante un avance muy importante en el diagnóstico de estas infecciones, principalmente porque contribuirá a orientar las decisiones clínicas, decisiones que se reflejarán en mejores resultados de salud, así como en la reducción de costes asociados a este tipo de infecciones.

El objetivo principal de este estudio fue desarrollar un método que permita un diagnóstico etiológico rápido de la infección del catéter, con una sensibilidad y especificidad al menos similar a los métodos de cultivo, pero con una velocidad similar a los métodos de tinción.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Caracterización de muestras**

Este estudio se llevó a cabo en el Servicio de Patología Clínica (SPC) del Hospital Sousa Martins (HSM), de la Unidad Local de Salud de Guarda (ULSG), en colaboración con la Unidad de Proteómica (UP) del Instituto de

Investigaciones Biomédicas de Salamanca (IBSAL) de la Universidad de Salamanca, siendo la ULSG una organización líder y de referencia en la prestación de atención sanitaria a la comunidad y la UGP una unidad de referencia internacional en el campo de la investigación de la expresión de proteínas. Consistió en la evaluación/diagnóstico microbiológico de 105 puntas de catéter retiradas de individuos ingresados en los servicios de la ULSG, con sospecha de infección asociada a CVC y respectivos hemocultivos. La muestra se recopiló durante 5 años (2018-2023). Se incluyeron en este estudio los dispositivos intravasculares extraídos de 108 individuos con sospecha clínica de infección asociada a CVC y respectiva confirmación de laboratorio de acuerdo con las normas y estándares establecidos por los CDC para este tipo de infecciones. Los criterios de exclusión fueron, cumplir con los criterios definidos para el diagnóstico de CRBSI por los CDC (O'Grady, Alejandro *et al.* 2011), todas las muestras de personas sospechosas de estar infectadas, pero que no fueron recolectadas ni enviadas al Servicio de Microbiología hemocultivos de sangre periférica junto con el dispositivo intravascular.

La recolección de muestras se realizó de forma aséptica y antes de la administración de antimicrobianos, se extrajo el CVC y se cortó su porción terminal (aproximadamente 5 cm) y se colocó en un recipiente estéril de boca ancha. Acompañando a este dispositivo intravascular hay un frasco de hemocultivo obtenido de una vena no cateterizada, ubicada distal al punto de inserción del catéter. Para garantizar una mayor positividad, los hemocultivos se recogieron fuera del pico de fiebre del individuo.

### **Procesamiento de productos biológicos.**

El diagnóstico microbiológico de la punta del catéter se realizó mediante métodos de diagnóstico semicuantitativos y cuantitativos. Para detectar la colonización extraluminal (método semicuantitativo/Maki), la punta distal del catéter se sembró sobre la superficie de un agar sangre (agar Columbia con 5% de sangre de oveja (GS, (Biomérieux® 2023), #30), y con ayuda de unas pinzas estériles se realizó el deslizamiento, rodando al menos 4 veces sobre la superficie de la placa. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 a 48 horas

a 37°C en condiciones aeróbicas. Después de la incubación, las colonias se cuantificaron, según criterios estandarizados por los CDC considerando el criterio de positividad: un umbral de 15 o más unidades formadoras de colonias (UFC) por placa es indicativo de colonización (Maki, Weise et al. 1977, O'Grady, Alexander et al. 2011, Almirante y Pahissa 2013, Mansilla, Ahufinger et al. 2018 para detectar la colonización intraluminal (Método cuantitativo/Sonicación). La punta del catéter se introdujo en 10 ml de caldo Tood Hewitt (BD® 2023), n.° 221714), se sonicó durante 1 minuto a 40 KHz y 125 W (BANDELIN® Bactosonic, n.° 3291), seguido de agitación (IKA® Vortex 4 digital, n.° 14019) durante 15 segundos. Posteriormente se preparó una dilución 1:100 en solución salina y se homogeneizó. A partir del caldo original y de la dilución 1:100 se inoculó un GS mediante la técnica de siembra cuantitativa, incubándose el cultivo durante 18 a 24 horas a 37°C y en aerobiosis. El punto de corte establecido fue  $\geq 10^2$  UFC/segmento, permitiendo así distinguir entre el origen de la infección y el de la colonización (O'Grady, Alexander et al. 2011, Gomet, Compain et al. 2017, Mansilla, Ahufinger et al. 2018). Se incubó el caldo Tood Hewitt sonicado (BD® 2023), #221714) y después de 6 horas de incubación (t=6h) se eliminó una pequeña cantidad en un tubo cónico de 1,5 µL (Eppendorf®, #0030120086) para su posterior análisis por EM. -MALDI-TOF

Este dispositivo intravascular se acompaña de un frasco de hemocultivo (BD® 2023), #442193) obtenido de una vena no cateterizadas se incubó durante 5 días en el sistema automatizado de detección microbiana BD BACTEC™ (BD® 2023), #442296), De los hemocultivos positivos, un GS y un Polyvitex Chocolate Agel (PVX, (Biomérieux® 2023)#27) a través de la técnica cualitativa.

La caracterización fenotípica de los aislados bacterianos se realizó a partir de la evaluación de sus características macroscópicas, microscópicas (tinción de Gram) y bioquímicas, la cual se realizó de forma manual y/o automatizada, utilizando el equipo VITEK® 2 Compact (Biomérieux®, #15/30/60).

## **Métodos proteómicos para la identificación bacteriana: EN MALDI-TOF**

Con el objetivo de identificar los microorganismos presentes en muestras biológicas (Caldo Todd Hewitt (BD®2023), #221714) que contiene el CVC y se sonicó después de la incubación de 6 horas) se utilizó el sistema de identificación MALDI-TOF/TOF Autoflex III® (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania), que utiliza métodos de espectrometría de masas para medir un perfil de proteína para que un microorganismo sea reconocido como un patrón de identificación único. Los espectros se adquirieron con el software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) y luego se procesaron utilizando el software Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania). La preparación de la muestra consistió en centrifugar 1,5 ml de caldo CVC, durante 30 s a 2000 xg. Luego, el sobrenadante resultante se centrifugó nuevamente durante 5 min a 15.500 xg para recolectar el sedimento bacteriano, que se lavó con agua calidad LC-MS. (LiChrosolv®, Millipore) y una pequeña cantidad de bacterias transferidas directamente a los pocillos de las placas objetivo MALDI (Bruker Daltonics®, #1840380) formando una fina película para su posterior identificación. Las mediciones se realizaron en el sistema de identificación MALDI-TOF/TOF Autoflex III® (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania) y los espectros obtenidos se procesaron con el software MALDI Biotyper y FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemania)

Las identificaciones MALDI-TOF se clasifican en: Confiable a nivel de especie: cuando el puntaje en la comparación entre el perfil del microorganismo problema y la base de datos es mayor o igual a 2; Confiable a nivel de género: cuando el puntaje es mayor o igual a 1,7 y menor a 2; Poco fiable: cuando la puntuación es inferior a 1,7, en este caso se considera un fallo de identificación.

### **Tratamiento estadístico**

Las variables cuantitativas fueron descriptivas utilizando valores de media y desviación estándar. Las variables cualitativas fueron descriptivas mediante frecuencias absolutas y relativas simples. La evaluación de la coincidencia de los métodos diagnósticos se realizó considerando: (i) detección de picos; y (ii)

los microorganismos identificados en las muestras en las que el EM MALDI-TOF confirmó el mismo agente etiológico de bacteriemia identificado por métodos convencionales. La preparación de los datos se realizó utilizando Microsoft Excel (v. 16). El análisis estadístico de los datos y la construcción de gráficos se realizaron utilizando IBM SPSS v.29.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudiaron 105 pacientes con bacteriemia asociada a infección de catéter venoso central (CVC), de acuerdo con los criterios generalmente aceptados. Por tanto, todos los pacientes tenían un aislado en hemocultivo coincidente con, al menos, uno de los métodos convencionales de estudios de infección de CVC (Maki o sonicación).

De los 105 pacientes, 57 (54,3%) fueron varones y 48 (55,2%) fueron mujeres. La edad media global de los pacientes fue de  $72,5 \pm 13,5$  años, siendo de  $71,3 \pm 14,1$  años en varones (intervalo: 45-93 años) y de  $73,6 \pm 12,4$  años en mujeres (intervalo: 47-94 años).

Los principales servicios de origen fueron Medicina (40 pacientes, 38,1%), UCI (20 pacientes, 19%) COVID (18 pacientes, 17,1%) y Cirugía (12 pacientes, 11,4%).

En todos los catéteres se consiguió aislamiento de microorganismos al menos por uno de los métodos. En 95 casos (90,5%) de los casos se consiguió aislamiento por ambos métodos, en 8 casos sólo mediante la técnica de Maki (7,6%) y en 2 casos sólo mediante la técnica de sonicación (1,9%).

Dentro de los 95 casos en que se detectaron microorganismos por ambos métodos, la identificación de los microorganismos fue, al menos, parcialmente coincidente, en todos los casos. No obstante, en algunos de los casos la coincidencia fue sólo parcial. En cinco casos (4,8%), se detectaron dos microorganismos mediante la técnica de Maki, y sólo uno por sonicación, mientras que en 3 casos (2,9%) se dio la circunstancia inversa. Solamente en dos

casos se aislaron 3 microorganismos diferentes en alguno de los dos métodos, y en ninguno de ellos fueron los tres coincidentes con los aislados obtenidos en el hemocultivo, con lo que su significación clínica es discutible.

Los microorganismos aislados con mayor frecuencia aparecen reflejados en la Tabla 1

Tabla 1 - Isolamentos Bacterianos obtidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo

Microorganismo	Método Semi-Quantitativo (Maki)		Método Quantitativo (Sonicação)	
	n	f (%)	n	f (%)
<i>Bacilos Gram Positivo</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Candida albicans</i>	7	5,5	7	5,9
<i>Candida glabrata</i>	2	1,6	2	1,7
<i>Candida lusitaniae</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Candida parapsilosis</i>	2	1,6	2	1,7
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	1	0,9	1	0,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	3,1	3	2,6
<i>Enterococcus faecium</i>	3	2,3	3	2,6
<i>Escherichia coli</i>	4	3,2	3	2,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	18,9	26	21,9
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1,6	2	1,7

Microorganismo	Método Semi-Quantitativo (Maki)		Método Quantitativo (Sonicación)	
	n	f (%)	n	f (%)
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	8,7	13	10,9
<i>Raoultella</i> spp.	1	0,8	1	0,8
<i>Serratia marcescens</i>	3	2,3	2	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	9,4	13	10,9
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	23	18,1	19	16,0
SNC - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	18,9	18	15,1
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>100</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Tabla 1 - Isolamientos Bacterianos obtenidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo (Continuación)

La especie individual más frecuentemente aislada fue *Klebsiella pneumoniae* (25 aislamientos), seguida de *Staphylococcus epidermidis* (22 aislamientos) *Staphylococcus aureus* (14 aislamientos) y *Pseudomonas aeruginosa* (13 aislamientos).

No obstante, ha de considerarse que, si se tienen en cuenta, de manera agrupada, todos los estafilococos no productores de coagulasa, incluyendo tanto *S. epidermidis* como otras especies y aislados identificados únicamente a nivel de grupo como “estafilococos no productores de coagulasa”, estaríamos hablando de 42 aislados, lo que les convertiría claramente en el grupo de agentes etiológicos aislado con mayor frecuencia.



El resto de las enterobacterias, excluyendo *K. pneumoniae*, constituyen en cambio un grupo de agentes etiológicos mucho menos prevalente, ya que suponen, en conjunto, solamente 12 aislados.

A este respecto, hay que reconocer que una de las debilidades del estudio es la de no haber podido utilizar la EM MALDI-TOF también para los aislados crecidos en placa de agar tanto a partir de los catéteres como de los hemocultivos, lo que en muchos casos ha impedido una identificación más exacta de los microorganismos, en especial de los Gram positivos.

Dentro de los Gram positivos, no se aisló ningún miembro del género *Streptococcus*. Después del grupo heterogéneo de los estafilococos no productores de coagulasa y de *S. aureus*, aparece el género *Enterococcus*, con 3 aislados de *Enterococcus faecalis* y 3 aislados de *Enterococcus faecium*.

Merece también resaltarse la prevalencia de las levaduras del género *Candida*, de las que se produjeron 12 aislamientos, predominando, como era esperable, *C. albicans*, que constituyó el 58,3% (7/12 aislados) de los aislamientos de levaduras.

En cuanto a la utilización de la EM MALDI-TOF como método alternativo a la metodología clásica para detectar la presencia de microorganismos en los catéteres presuntamente infectados, varias pruebas previas al planteamiento del estudio permitieron establecer como periodo de incubación más útil, como paso previo a la realización de la espectrometría de masas, un tiempo de incubación de 6 horas. Incubaciones más cortas reducían notablemente el número de resultados positivos, e incubaciones más largas no aportaban un incremento significativo del número de positividades, y reducían la ganancia de tiempo en el diagnóstico, principal ventaja del método.

Ha de tenerse en cuenta que la EM MALDI-TOF, como método de detección e identificación de microorganismos, es un método extremadamente específico, pero no es método especialmente sensible, ya que se requieren cantidades de proteína relativamente importantes

para tener resultados adecuados. En este sentido, salvo en catéteres muy intensamente colonizados o infectados, la cantidad de microorganismos obtenidos mediante la sonicación inicial será, en la gran mayoría de los casos, insuficiente para conseguir una identificación fiable, por lo que el periodo previo de incubación se hace imprescindible para conseguir una mayor carga proteínica y, por tanto, mejores resultados en la identificación.

De los 105 catéteres venosos estudiados, se hallaron picos proteicos en la EM MALDI-TOF compatibles con la posible presencia de microorganismos, tras las 6 horas de incubación, en 83 muestras (79%). En las 22 muestras restantes, a pesar de haberse identificado microorganismos tanto en el cultivo de los catéteres como en hemocultivo, no se detectaron proteínas, en la ventana de cocientes masa/carga utilizada, en una cantidad significativa, por lo que no fue posible identificar microorganismo alguno.

Dentro de las muestras en las que se consiguió obtener picos de proteínas, la correlación entre la identificación obtenida por los métodos bacteriológicos convencionales y la identificación obtenida por EM MALDI-TOF varió notablemente en función del *score* obtenido.

Así, se obtuvieron *scores* inferiores a 1,5 puntos en 42 muestras (44,6% del total, 50,6% de las muestras en que se obtuvieron picos proteicos). De estas 42 muestras, solamente 8 (15,4%) mostraron correlación con la identificación bacteriológica convencional a nivel de especie y otras 8 a nivel de género (15,4%). Por tanto en las muestras con *score* <1,5 puntos, la correlación global a nivel, al menos, de género, fue solamente del 30,8%.

A este respecto, ha de tenerse en cuenta que la posibilidad de que puedan existir infecciones de catéter mixtas, es decir, infecciones en las que esté implicado más de un microorganismo, supone un inconveniente adicional para la utilidad de la EM MALDI-TOF en este diagnóstico. Aunque existe software específico para diagnosticar, a nivel etiológico, infecciones mixtas mediante EM MALDI-TOF, lo cierto, en nuestra experiencia, es que este software puede funcionar adecuadamente

cuando se trata de infecciones en que las poblaciones bacterianas están cuantitativamente equilibradas, pero cuando hay un predominio claro de alguna de las especies, tiende a obviar muy frecuentemente las poblaciones minoritarias.

En este caso, 11 de las 42 muestras con score  $<1,5$  (26,2%) tenían en alguno de los métodos diagnósticos o en ambos un aislamiento de más de un microorganismo, lo que contribuye de manera importante a estos malos resultados. También ha de tenerse en cuenta que, de los 11 estudios de catéter en los que se obtuvo más de un microorganismo en el estudio convencional, solamente en dos (18,2%) se obtuvieron esos mismos microorganismos en el hemocultivo, lo que permite poner en cuestión la trascendencia clínica de la mayoría de estos estudios cuando se aísla más de un microorganismo.

En todo caso, aun descartando los cultivos de catéter con cultivo mixto, y considerando solamente los 31 cultivos monobacterianos, la correlación fue del 19,4% a nivel de especie, y un 19,4% adicional a nivel de género, lo que supone una correlación global del 38,8%, que sigue siendo una correlación pobre, y que refleja una utilidad clínica de la EM-MALDI-TOF, en estos casos con score  $<1,5$ , muy limitada.

En 14 casos (14,9% de los casos con detección de picos, y 13,3% del total), se halló un score entre 1,5 y 1,7. En estos casos, la correlación global fue del 57,1%, con un 50% de correlación a nivel de especie y un 7,1% adicional a nivel de género. En este caso, se observaron 3 muestras con cultivos bacterianos mixtos (21,4%) pero en los tres casos, uno de los microorganismos aislados coincidió con el reportado en la EM MALDI-TOF.

Por otra parte, en la línea de los casos anteriores, no es habitual que los cultivos mixtos observados en el estudio de los catéteres se reproduzcan en el hemocultivo. En este grupo, los tres pacientes con cultivo mixto tuvieron, sin embargo, un hemocultivo monobacteriano. En los tres casos, el microorganismo hallado en el hemocultivo coincidió con el detectado en la EM-MALDI TOF.

Dados los datos globales de los tres pacientes, lo más probable es que, aunque en los catéteres se hallasen efectivamente los dos microorganismos, ya que aparecen tanto en la muestra procesada por el método de Maki como en la muestra procesada por sonicación, uno de ellos sea un contaminante, lo que justificaría que no se hallase en el hemocultivo, y que se detectase en la EM MALDI-TOF ya que, al tratarse de una contaminación, muy probablemente la carga bacteriana fuera muy inferior a la del microorganismo realmente procedente del hemocultivo, por lo que la EM habría dado prevalencia al microorganismo más abundante, por los mismos motivos que se han aducido más arriba con respecto al manejo de los cultivos polimicrobianos que hace la EM MALDI-TOF.

Los mejores resultados se obtienen con valores de score en la EM MALDI-TOF a partir de 1,7. Tanto en los 18 casos con valores entre 1,7 y 2, como en los 20 casos con valores >2 (40,5% de total de estudios con picos proteicos, 36,2% del total de casos estudiados), la correlación con los métodos clásicos fue del 100% a nivel de especie, bien con el aislado observado en los métodos clásicos cuando el estudio reflejó una etiología monobacteriana, bien con uno de ellos cuando la etiología observada mediante la metodología clásica fue polimicrobiana.

Es interesante señalar que, como en los casos anteriores, cuando se producen cultivos mixtos, normalmente sólo uno de los aislados aparece también en el hemocultivo, y éste se suele correlacionar con lo hallado en la EM MALDI-TOF.

En el caso de los estudios con una EM MALDI-TOF con un score >1,7, se registraron cultivos polimicrobianos en algunos de los estudios bacteriológicos en 9 casos (23,7%). En cinco de estos casos, a pesar de la presencia de más de un microorganismo en alguno de los estudios de catéter o en ambos, solamente se detectó un microorganismo en hemocultivo, siempre coincidente con uno de los aislados del catéter, y coincidente también con el identificado mediante EM MALDI-TOF.

Sin embargo, en 4 estudios se detectaron 2 o incluso 3 microorganismos tanto en los estudios de catéter como en el hemocultivo,

coincidentes en todos los casos. Como se ha mencionado antes, en todos estos casos se identificó un solo microorganismo en la EM MALDI-TOF, también coincidente en todos los casos con uno de los aislados tanto del catéter como de los hemocultivos.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, la infección del catéter venoso central, de acuerdo con los datos obtenidos, afecta de manera similar a ambos sexos, afecta preferentemente a pacientes con edad avanzada, y afecta principalmente, como era esperable, a pacientes de los servicios de Medicina, UCI y Cirugía. La alta prevalencia en pacientes de áreas COVID es, con toda probabilidad, una característica circunstancial asociada a periodo durante el que se han obtenido las muestras.

Pese a que el método de Maki y el de sonicación recogen preferentemente la colonización de áreas diferentes del catéter, en la práctica los resultados son similares, ya que en el 95% de los casos se detectó colonización por ambos métodos. No obstante, sigue siendo recomendable utilizar ambos métodos, ya que en 7,6% de los casos se detectó colonización exclusivamente extraluminal, y en un 1,9% exclusivamente intraluminal.

Los microorganismos hallados con mayor frecuencia se encuentran dentro de los márgenes de lo esperable, con un claro predominio de los estafilococos coagulasa negativa, seguidos por enterobacterias, principalmente *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Es llamativa la alta prevalencia de levaduras, corroboradas por el hemocultivo, ya que con 12 aislados se colocan en una prevalencia muy próxima a la de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

En lo que se refiere al objetivo principal del estudio, es decir, la posibilidad de la utilización de la EM MALDI-TOF como un método rápido para identificación de microorganismos causantes de infección del CVC, se

ha de concluir que, aunque puede ser un método útil en cuanto que puede permitir un diagnóstico más rápido de la etiología, y por tanto instaurar una terapia empírica más orientada, tiene limitaciones considerables.

En primer lugar, sólo un 80% de las muestras ofrecen algún resultado en la EM MALDI-TOF, mientras cerca del 20% carecen absolutamente de picos proteicos.

En segundo lugar, de las muestras en las que se detectan picos proteicos con un score inferior a 1,7, menos del 50% ofrecen un resultado que se correlacione con los métodos convencionales y con el hemocultivo, por que no deben ser tenidos en cuenta a la hora de hacer una aproximación diagnóstica ni terapéutica. Existe un aspecto que no se ha tenido en cuenta a la hora de diseñar el trabajo, y que vistos los resultados podría ser interesante abordar, y es el hecho de si estos score bajos, aunque no sean fiables a la hora de establecer un diagnóstico etiológico, sí lo pudieran ser para ayudar a hacer un diagnóstico simplemente cualitativo de infección del CVC. A estos efectos, sería necesario estudiar un grupo de pacientes en los que se haya sospechado una infección de CVC pero no se hayan producido aislamiento, para corroborar si la detección de proteínas que correspondan a la ventana de detección de la EM MALDI-TOF, aunque sea a niveles bajos, se corresponde o no con la existencia de infección.

Las EM MALDI-TOF positivas, con score superior a 1,7, muestran una excelente correlación con las técnicas convencionales, por lo que podrían asumirse como técnica de diagnóstico rápido con una alta muy fiabilidad tanto a nivel de establecer el criterio de infección, como a nivel de la identificación específica del microorganismo concreto implicado.

La única limitación que habría que tener en cuenta es la posibilidad de infecciones de catéter mixtas. El software actualmente disponible, aunque permite una identificación muy fiable de especies individuales, por el momento tiene muchas más dificultades para identificar infecciones mixtas, de modo que, en aquellos casos en que se produzcan , alguno de

los microorganismos podría no ser detectado hasta tener los resultados del cultivo.

## INDÍCE

	Pág.
<b>CAPÍTULO I -INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>1.Dispositivos intravasculares: catéter venoso central.....</b>	<b>14</b>
1.1    Infecciones asociadas a catéteres venosos centrales .....	15
1.1.1    Factores de riesgo .....	18
1.2    Fisiopatología.....	20
1.3    Microbiología de las infecciones asociadas a CVC.....	23
1.3.1    Principales patógenos .....	23
1.3.2    Colonización de catéteres venosos centrales por biopelícula microbiana .....	25
1.4    Diagnóstico microbiológico en CVC.....	29
1.4.1    Técnicas que no requieren la retirada del CVC.....	30
1.4.2    Técnicas que requieren la retirada del CVC .....	32
1.4.2.1    Métodos de cultivo semicuantitativos .....	33
1.4.2.2    Métodos de cultivo cuantitativos. ....	35
1.4.3    Identificación de microorganismos aislados. ....	37
1.4.4    Recomendaciones específicas para el diagnóstico microbiológico de infecciones asociadas a catéteres intravasculares. ...	37
1.5    Epidemiología.....	39
1.6    Estrategias de prevención .....	43
<b>2. Espectrometría de Masas MALDI-TOF en microbiología .....</b>	<b>45</b>
2.1    Fundamentos de la técnica.....	49
2.2    MALDI-TOF y tipificación microbiana .....	53
2.3    El uso de MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de bacteriemia... ..	59
<b>CAPITULO II-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO III -MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>



3.1	Ubicación del estudio .....	68
3.2	Caracterización de muestras .....	68
3.2.1	Los criterios de inclusión y exclusión .....	68
3.3	Recogida de productos Biológicos. ....	69
3.4	Procesamiento de productos biológicos. ....	69
3.4.1	Detección de colonización extraluminal (Método semicuantitativo/Maki) .....	69
3.4.2	Detección de colonización intraluminal (Método cuantitativo/Sonicación).....	70
3.4.3	Cultura de sangre .....	70
3.5	Caracterización fenotípica .....	71
3.6	Identificación bioquímica automatizada .....	71
3.7	Métodos proteómicos para la identificación bacteriana: EM MALDI-TOF .....	72
3.7.1	Preparación de la muestra.....	73
3.7.2	Separación de especies moleculares según su relación masa/carga. ....	74
3.7.3	Análisis de espectros y valoración de resultados. ....	74
3.8	Aislados bacterianos en estudio. ....	75
3.9	Tratamiento estadístico.....	76
<b>CAPÍTULO IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		<b>78</b>
4.1	Caracterización de la muestra de estudio.....	78
4.2	Evaluación de la colonización CVC: Métodos convencionales ....	79
4.3	infecciones asociadas con cvc: EM MALDI-TOF.....	88
<b>CAPÍTULO V-CONCLUSIÓN.....</b>		<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>103</b>

## ÍNDICE

	Pág.
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1. Dispositivos Intravasculares: Cateter Venoso Central.....	14
1.1 Infecções associadas a Cateteres Venosos Centrais.....	15
1.1.1 Fatores de Risco.....	18
1.2 Fisiopatologia.....	20
1.3 Microbiologia das infecções associadas a CVC .....	23
1.3.1 Principais agentes patogénicos .....	23
1.3.2 Colonização de Cateteres Venosos Centrais por Biofilme Microbiano .....	25
1.4 Diagnóstico microbiológico em cvc.....	29
1.4.1 Técnicas que não requerem a remoção do CVC .....	30
1.4.2 Técnicas que requerem a retirada do CVC .....	32
1.4.2.1 Métodos de cultura Semi-quantitativo .....	33
1.4.2.2 Métodos de cultura Quantitativo .....	35
1.4.3 Identificação dos microrganismos isolados.....	37
1.4.4 Recomendações específicas para o diagnóstico microbiológico de infecções associadas a cateteres intravasculares .....	37
1.5 Epidemiologia.....	39
1.6 Estratégias de Prevenção .....	43
2 Espectrometria de Massa MALDI-TOF em microbiologia.....	45
2.1 Fundamento da Técnica.....	49
2.2 MALDI-TOF e tipagem microbiana .....	53
2.3 O uso do MALDI-TOF no diagnóstico rápido de bacterémias .....	59
<b>CAPÍTULO II - JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DE ESTUDO .....</b>	<b>.64</b>
<b>CAPÍTULO III -MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>.68</b>

3.1	Local do estudo .....	68
3.2	Caracterização da amostra .....	68
3.2.1	Critérios de inclusão e exclusão .....	68
3.3	Colheita dos produtos biológicos .....	69
3.4	Processamento dos produtos biológicos .....	69
3.4.1	Deteção de colonização extralumial (Método semi-quantitativo/ <i>Maki</i> ) .....	69
3.4.2	Deteção de colonização intralumial (Método quantitativo/ <i>Sonicação</i> ) .....	70
3.4.3	Hemocultura .....	70
3.5	Caracterização fenotípica .....	71
3.6	Indentificação bioquímica automatizada .....	71
3.7	Métodos proteómicos de identificação bacteriana: MALDI-TOF .	72
3.7.1	Preparação da amostra.....	73
3.7.2	Separação de espécies moleculares conforme sua relação massa/carga .....	74
3.7.3	Análise dos espectros e valorização de resultados .....	74
3.8	Isolados bacterianos em estudo.....	75
3.9	Tratamento estatístico .....	76
<b>CAPITULO IV -RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>		<b>78</b>
4.1	caracterização da população em estudo .....	78
4.2	avaliação da colonização dos CVC: Métodos Convencionais .....	79
4.3	infecções associadas a cvc: EM MALDI-TOF .....	88
<b>CAPITULO V -CONCLUSÃO</b> .....		<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		<b>103</b>

## ÍNDICE DE FIGURA

	Pág.
Figura 1 Microscopia Eletrónica de Varredura de Biofilme. A) Biofilme na superfície de um CVC (Lebeaux, Chauhan et al. 2013); B) Biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i> na superfície de um CVC (Pozo and Patel 2013) .....	29
Figura 2 - Gráfico representativo de Distribuição Epidemiológica de Infecções associadas a CVC no período de 2003 a 2010 (Fonte: adaptado de Mansilla, Ahufinger et al. 2018).....	43
Figura 3 - Esquema representativo da técnica MALDI-TOF (Engel, Prabutzki et al. 2022). .....	52
Figura 4 - Gráfico representativo dos isolamentos bacterianos obtidos pelo método semi-quantitativo e quantitativo .....	86

## ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela 1- ICSRC por 1000dias de CVC, em UCI Adultos 2008-2016 (Fonte: DGS/PPCIRA 2017 - Programa de Vigilância Epidemiológica UCI).....	42
Tabela 2 - Pontuação obtida pelo software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha).....	75
Tabela 3 - Caracterização da amostra.....	78
Tabela 4 - Isolamentos Bacterianos obtidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo .....	81
Tabela 4 - Isolamentos Bacterianos obtidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo ( Continuação) .....	82
Tabela 5 -Microrganismo isolados a partir da Hemocultura Periférica enviada juntamente com o CVC .....	83

## SIGLAS E ACRÓNIMOS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ATCC - American Type culture collection

BGN-NF - Bacilos gram-negativos não fermentadores

DHB - Ácido di-hidroxibenzoico

DGS - Direcção Geral de Saúde

BZ - Bacteremia zero

CDC - Center for Disease Control and Prevention

CLABSI- Infecção da Corrente Sanguínea associada a linha Central

CLSI - Clínical and Laboratory Standards Institute

ICSRC - Infecção da Corrente Sanguínea associada a Cateteres

CVC- Cateter Venoso Central

DP - Desvio padrão

EM - Espectrometria de Massa

EPS - Substância polimérica extracelular

f - Frequências Relativas

Fc - Fragmento cristalizável

FDA - Food and Drug Administration

GS - Gelose Columbia + 5% Sangue de Carneiro

HCCA - ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico

HSM - Hospital Sousa Martins

IDSA -Sociedade Americana de Doenças Infeciosas Americana

IBSAL - Instituto de Investigação Biomédica de Salamanca

INCS - Infecção nosocomial da corrente sanguínea

INSA - Instituto Nacional De Saúde Doutor Ricardo Jorge

LCR - Líquido Cefaloraquídeo

MALDI - Matrix-assisted laser desorption/ionization

Md - Mediana

n - Frequências absolutas

NHSN - National Healthcare Safety Network

PNCI - Programa Nacional de Controlo de Infeção

PPCIRA - Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e de Resistências aos Antimicrobianos

PVC - Policloreto de Vinilo

PVX - Gelose Chocolate Polyvitex

SEIMC - Sociedade Española Enfermedades *Infecciosas* Microbiología Clínica

SEMICYUC - Sociedade Espanhola de Medicina Intensiva Critica e Unidades Arterias Coronarias

SPC - Serviço de Patologia Clínica

SPSS - Statistical Pacjage for the Social Science

TOF - Time-of-Flight

UCI - Unidade de Cuidados Intensivos

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

ULSG - Unidade Local de Saúde da Guarda

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

X - Média aritmética



# CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO



## INTRODUÇÃO

### 1. DISPOSITIVOS INTRAVASCULARES: CATETER VENOSO CENTRAL

A utilização de dispositivos intravasculares com fins de diagnóstico e terapêutico é cada vez mais frequente, especialmente em pacientes com situações clínicas agudas ou crônicas graves (Gaynes and Jacob 2022). A sua utilização para a administração de fluidos endovenosos, produtos sanguíneos, medicamentos e monitorização hemodinâmica, tornou-se um componente essencial da medicina moderna em pacientes hospitalizados (Gominet, Compain et al. 2017, Guzek, Rybicki et al. 2022). Estima-se que 70% dos pacientes admitidos em hospital, são submetidos a este procedimento durante algum momento da sua estadia (Slobbe, Barzouhi *et al.* 2009, Osório, Oliveira *et al.* 2023). Em Espanha e de acordo com os dados do programa de estudos sobre a prevalência de infeções nosocomiais (programa EPINE, <https://epine.es/>), considera-se que cerca de 70% dos pacientes internados em hospitais são portadores de um destes dispositivos em algum momento e que em 7% dos pacientes o Dispositivo intravascular (DIV) utilizado é um cateter venoso central (CVC), colocado de forma temporária ou permanente (tipo Hickman® ou Port-acath®)(Ferrer and Almirante 2014). A este propósito refira-se, que existem numerosos tipos de cateteres e dispositivos intravasculares com características e finalidades distintas. Os cateteres arteriais periféricos e os cateteres pulmonares utilizam-se por curtos períodos de tempo. Os primeiros são os mais utilizados e os que menos apresentam complicações infecciosas embora alguns estudos evidenciem taxas de infeção crescentes associadas a este tipo de dispositivos (Mayer, Greene *et al.* 2012, Mermel 2017, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018), os segundos são geralmente revestidos com heparina e oferecem pouco risco, não sendo habitual sua colonização. Por fim, os CVC são aqueles que causam a maioria das infeções relacionadas com cateteres (García-Rodríguez, Gómez *et al.* 2010, Almirante and Pahissa 2013, Gaynes and Jacob 2022) e que também requerem mais atenção por parte das comissões de infeção.

Um CVC trata-se de um dispositivo vascular inserido de forma percutânea através dum acesso venoso central (subclávias, jugulares, femorais ou axilares) usado para injetar nutrição parenteral, produtos sanguíneos ou fluidos que prejudicariam uma veia periférica menor. É também usado para hemodiálise, obter produtos sanguíneos e medir a pressão venosa central (Gominet, Compain *et al.* 2017, Guzek, Rybicki *et al.* 2022). Assim, trata-se dos dispositivos intravasculares mais utilizados em meio hospitalar sobretudo em medicina intensiva, uma vez que facilitam o tratamento e o diagnóstico do paciente crítico (L. Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Rodrigues, Dias *et al.* 2016, Novosad, Fike *et al.* 2020, Guzek, Rybicki *et al.* 2022) e a sua utilização permite o acesso direto do meio exterior ao intravascular (Gaynes and Jacob 2022). No entanto, o CVC funciona como um corpo estranho e a sua utilização apresenta vários riscos, desencadeando muitas vezes um processo inflamatório no local de inserção e o seu contacto com a corrente sanguínea oferece também um risco eminente de disseminação de microrganismos que podem desencadear infeções Sistémicas graves (Slobbe, Barzouhi *et al.* 2009).

### 1.1 INFECÇÕES ASSOCIADAS A CATETERES VENOSOS CENTRAIS

A infeção relacionada com CVC constitui uma das principais complicações do seu uso e a primeira causa de bactériemia nosocomial primária (Slobbe, Barzouhi *et al.* 2009). No entanto, no que concerne à terminologia de infeções associadas a cateteres, também esta é confusa e usada de forma indiscriminada. Neste contexto revela-se pertinente destingir os tipos de infeções associadas a cateteres vasculares e as suas principais complicações. Desta forma, as normas internacionais publicadas pelo “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) distinguem dois tipos de infeções: as complicações locais que ocorrem na ausência de bacteremia aparentemente por estarem associadas ao próprio cateter e as infeção da corrente sanguínea associada a cateteres (ICSRC) sendo que esta ultima trata-se de uma definição clínica que exige testes laboratoriais específicos que identificam o cateter

intravenoso como fonte de infecção (O'Grady, Alexander *et al.* 2011). Assim, as definições para ambos os tipos de complicações incluem:

a) Cateter colonizado: a colonização do CVC envolve presença significativa de microrganismos na porção endoluminal ou superfície externa do cateter, mas sem bacteremia (infecção sistêmica concomitante) (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018). Esta contaminação pode ter origem na flora normal da pele, e ocorre durante a inserção ou por migração ao longo do cateter, bem como através de contaminação cruzada associada à manipulação por equipas multidisciplinares (Trautner and Darouiche 2004, Gaynes and Jacob 2022, Osório, Oliveira *et al.* 2023);

b) Flebite: presença de sinais inflamatórios, nem sempre de origem infecciosa, numa curta e limitada porção do trajeto vascular ou em redor do orifício de saída do cateter de implementação venosa;

c) Infecção do orifício de entrada: presença de eritema, dor, tumefação ou induração do cateter inflamatório nos últimos centímetros de pele ou tecidos circulantes ao ponto de entrada do cateter vascular. Pode ainda associar-se a outros sinais de infecção, como febre e exsudação com ou sem evidência de bacteremia;

d) Infecção do túnel subcutâneo: presença de inflamação, eritema ou induração de mais de 2cm de diâmetro do orifício de entrada do cateter tunelizados, com ausência de Hemoculturas positivas;

e) Infecção da bolsa de dispositivo ou reservatório - infecção do leito subcutâneo do dispositivo de implementação intravascular, com frequência associada a inflamação, eritema ou endurecimento da bolsa. Pode produzir-se por rutura espontânea e drenagem exsudativa ou fracamente purulenta, podendo ainda ocorrer necrose da pele que o recobre. Ocorrer com ou sem bacteremia associada;

f) Bacteremia relacionada com cateter vascular - deteção do mesmo microrganismo na cultura da ponta do cateter e em pelo menos uma hemocultura de sangue extraída de uma veia periférica (Fortún 2008, Mermel, Allon *et al.* 2009, O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018).

De entre os tipos de infeções acima mencionados, neste trabalho de investigação focamo-nos especialmente nas bacteriemias relacionadas com o CVC. O termo bacteremia refere-se a bactérias viáveis no sangue e trata-se de um fenómeno de grande relevância, em que o laboratório clínico assume um papel preponderante no diagnóstico (Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018). São distinguidos dois tipos de bacteremia, a primária e a secundária (Silva, Oliveira *et al.* 2009, Mermel 2017). A primeira define-se por ter a sua origem no próprio sistema circulatório ou pela entrada direta de microrganismos na corrente sanguínea, através de agulhas, infusões contaminadas, cateteres ou outros dispositivos vasculares. A segunda, bacteremia secundária, ocorre através da drenagem de pequenos vasos sanguíneos ou linfáticos, seguindo para a corrente circulatória como consequência de um foco de infeção definido em outros locais do organismo (Silva, Oliveira *et al.* 2009, Mermel 2017).

A bacteremia relacionada com o cateter trata-se de uma bacteremia primária que é confirmada sempre que ocorre a deteção do mesmo microrganismo (género, espécie e semelhante resistência antimicrobiana) na cultura da ponta do cateter e em pelo menos uma hemocultura periférica (obtida preferencialmente por punção direta de uma veia periférica), num paciente com suspeita, mas ao qual se excluíram outros diagnósticos etiológicos (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018). Na ausência de confirmação microbiológica com evidências indiretas pode considerar-se diagnóstico provável quando o quadro clínico não desaparece nas 48 horas seguintes à retirada do cateter (Almirante and Pahissa 2013). No entanto, quando os mecanismos de resposta imune falham ou ficam sobrecarregados, a bacteremia torna-se uma infeção da corrente sanguínea que pode evoluir para vários espetros clínicos e é diferenciada como septicémia (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019).

Em suma, tal como referido precedentemente, o CVC é um sistema intravascular indispensável na prática clínica diária. No entanto, se por um lado em muitas situações clínicas os benefícios do seu uso são relevantes, por outro, desde há algum tempo, é também apontado como um importante fator de risco em infeções da corrente sanguínea, sobretudo em infeções de natureza hospitalar, com taxas de bacteremia substancialmente mais elevadas do que nos doentes sem cateter (Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019, Zanoni, Pavone

*et al.* 2021). Estima-se que 49% das bacteriemias hospitalares estão relacionadas com estes dispositivos (Slobbe, Barzouhi *et al.* 2009, Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019). Em Portugal, o estudo mais recente envolvendo vários hospitais avaliou a taxa de incidência da infeção nosocomial da corrente sanguínea (INCS) associado a CVC e verificou uma taxa de incidência de 2,7 % por 1.000 dias de cateteres (Sato, Nakamura *et al.* 2017, Ruegg, Faucett *et al.* 2018, Osório, Oliveira *et al.* 2023), um valor superior ao registado em 2016 de 1,7 (Rodrigues, Lebre *et al.* 2017). Estes dados são em muito semelhantes a realidade em Espanha em que um grupo de investigadores estima para 2029 uma taxa de incidência da INCS associado a CVC de aproximadamente 1,18 episódios/1000 internamentos (Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019). De notar que estas taxas resultam, na maioria das vezes, em prolongamento do período de internamento, elevada morbilidade e mortalidade e aumento dos custos associados à permanência hospitalar (Saint, Veenstra *et al.* 2000).

Estas infeções tem uma origem multifatorial e complexa, existindo diversos fatores que contribuem para tornar estes dispositivos suscetíveis à contaminação. Os fatores de risco, a fisiopatologia, a microbiologia e a epidemiologia das infeções intravasculares a serão ainda abordados ao longo deste capítulo.

### **1.1.1 Fatores de Risco**

Atualmente vários são os estudos desenvolvidos em torno dos determinantes patogénicos associados as infeções provocadas pelo uso de CVC. Sabe-se e considerando-se a importância epidemiológica e clínica destas infeções que conhecer os fatores de risco pode contribuir para estruturar protocolos clínicos e estabelecer medidas preventivas eficazes no cuidado ao paciente portador de CVC.

São vários os determinantes patogénicos descritos na bibliografia associados ao desenvolvimento deste tipo de infeções, determinantes esses que vão desde os fatores relacionados com o paciente como a idade avançada, patologias

subjacentes, tempo de hospitalização, cateterização da veia jugular, neutropenia, nutrição parentérica total e estado de imunossupressão (Lorente, Henry *et al.* 2005, Tao, Jiang *et al.* 2015, Gaynes and Jacob 2022, Cabrero, Robledo *et al.* 2023) até aos fatores relacionados com o dispositivo propriamente dito tais como o tipo de material do cateter, tamanho, diâmetro, número de lumens, local de inserção, duração de cateterização, condições de inserção, frequência de manipulação e técnicas de higienização e assepsia (Rodrigues, Dias *et al.* 2016, Zanoni, Pavone *et al.* 2021, Gaynes and Jacob 2022). Outros fatores podem também aumentar o risco de infeção incluindo a trombose do cateter, o cateterismo repetido, o aumento da manipulação do cateter e a presença de um foco infeccioso em outro local do organismo (Cabrero, Robledo *et al.* 2023).

No que concerne ao hospedeiro sabe-se, por exemplo, que a presença de proteínas de adesão (fibrina, fibronectina) forma uma rede em torno do cateter potenciando o desenvolvimento de microrganismos em biofilme e que pacientes com contagens absolutas de neutrófilos inferiores a 100 células/mm<sup>3</sup> parecem oferecer maior risco de bacteremia.

No que respeita aos determinantes patogénicos relacionados com o dispositivo, são quatro os determinantes sobre os quais recaem mais investigações e os que maior apresentam risco de infeção: o tipo e material que constitui o cateter, o local de colocação e a duração da cateterização. Assim, todos os tipos de cateteres intravasculares apresentam riscos significativos, uma vez que um determinado tipo de cateter poderá estar associado a um risco aumentado de infeção se for preferencialmente utilizado em pacientes mais gravemente doentes ou vulneráveis (L. Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Rodrigues, Dias *et al.* 2016, Novosad, Fike *et al.* 2020, Guzek, Rybicki *et al.* 2022, Gaynes and Jacob 2022). Quanto ao material que o constitui, alguns materiais, por exemplo, apresentam irregularidades na sua superfície que facilitam a adesão microbiana de certas espécies, isto é, torna-os especialmente vulneráveis à colonização e subsequente infeção. Desta forma, a modificação das propriedades da superfície do biomaterial tem também demonstrado ser uma estratégia eficaz no controlo da capacidade dos microrganismos em formar biofilme (Donlan 2002, Flemming and Wingender

2010a). Por exemplo, a formação de biofilme ocorre mais facilmente nas superfícies dos cateteres de elastómero de silicone do que nos cateteres de poliuretano (Hagau *et al.* 2009). De referir que também devido à formação da bainha de fibrina, estes últimos estão associados a um menor risco de infeção quando comparados com os silásticos. Por outro lado, alguns materiais são mais trombogénicos, uma característica que também facilita a sua colonização e infeção (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Cabrero, Robledo *et al.* 2023).

A localização dos CVCs é também importante. A infeção relacionada ao cateter é geralmente mais comum em cateteres inseridos na veia femoral e, provavelmente em menor grau, nas veias jugulares interna em comparação com a veia subclávia (Siqueira, Hueb *et al.* 2011). Por último, a duração da caracterização tem sido considerada um importante fator de risco para infeção uma vez que cateterizações mais longas oferecem maiores riscos. Nos países europeus mais desenvolvidos, utilizam-se preferencialmente cateteres de poliuretano para procedimentos de curta duração e cateteres tunelizados de silicone quando está previsto um internamento mais longo (Mermel 2017).

Em suma, como referido anteriormente, várias são as investigações que reportam a importância do estudo destes dispositivos com o objetivo de criar estratégias de modificação das suas características com resultados positivos no controlo de infeções associadas, no entanto, não foi ainda possível definir quais as condições que mais eficazmente reduzem o risco e a incidência de infeção sistémica.

## 1.2 FISIOPATOLOGIA

As taxas de infeções relacionadas com o CVC variam consideravelmente conforme a dimensão do hospital, os serviços/unidades e tipo de cateter (O'Grady, Alexander *et al.* 2011). Acresce ainda que as taxas de infeção são também influenciadas, como referido anteriormente, por fatores de risco intrínseco dos doentes, como o tipo e gravidade da doença, assim como pelos parâmetros relacionados com o cateter, nomeadamente as condições e o local

de inserção (Cabrero, Robledo *et al.* 2023). Desta forma, para que ocorra uma infecção associada a cateter é necessário que os microrganismos tenham acesso à superfície intraluminal ou extraluminal do CVC, com subsequente adesão e formação de biofilme (conjunto de células microbianas associadas a uma superfície e envolto numa matriz extracelular autoproduzida), permitindo-lhes uma infecção sustentada com posterior disseminação hematogénea (Donlan and Costerton 2002, Cabrero, Robledo *et al.* 2023, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Cabrero, Robledo *et al.* 2023, França 2023). Por conseguinte, a colonização da extremidade do CVC precede a infecção, e este acesso pode ocorrer através de três vias diferentes: a) Colonização por via extraluminal: migração da microflora cutânea do doente ao longo do trajeto subcutâneo, com colonização da ponta do CVC; b) Colonização via intraluminal: contaminação do lúmen ou das conexões, geralmente relacionado com a sua manipulação; c) Colonização por via hematogénea: a partir de um foco séptico distante (Safdar and Maki 2004, Trautner and Darouiche 2004, Farina, Cornistein *et al.* 2019, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

No que concerne ao mecanismo de infecção por via extraluminal esta inicia-se pela formação de uma matriz biológica resultante da adesão e colonização dos microrganismos seguindo-se, dependendo das espécies, a adesão de moléculas específicas ao material inerte (Donlan and Costerton 2002, Osório, Oliveira *et al.* 2023, Ahn, Kim *et al.* 2023). Numa primeira fase, a implementação do cateter compromete a barreira protetora da pele, fornecendo uma rota direta para contornar a primeira linha de imunidade. Os microrganismos podem assim contaminá-lo ao longo da superfície externa, logo durante a inserção inicial (Gominet, Compain *et al.* 2017; Ahn, Kim *et al.* 2023). Além disso, após a inserção, a superfície externa do cateter é rapidamente coberta com proteínas do paciente que facilitam a adesão microbiana (Yousif, Jamal *et al.* 2015). Há também evidências de que o próprio material inerte/abiótico implantado causa muitas vezes atenuação local da resposta imune, proporcionando assim, um local fértil para a formação de biofilme microbiano (Yousif, Jamal *et al.* 2015, Reichembach *et al.*, 2017) Em qualquer das situações, a formação de um biofilme bacteriano ou fúngico associado ao cateter é um processo progressivo e natural após a colonização inicial (Yousif, Jamal *et al.* 2015, Gominet,



Compain *et al.* 2017, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

Alguns autores referem ainda a existência de uma forte correlação entre a colonização intensa da pele e a colonização do cateter com subsequente infecção associada ao mesmo, especialmente em dispositivos intravasculares de curta duração (Vineet Chopra, O'Horo *et al.* 2013, Yousif, Jamal *et al.* 2015). Quando a cateterização é de curta duração as infecções da corrente sanguínea são geralmente de origem cutânea no sítio de inserção oferecendo, desta forma, acesso extraluminal e ocasionalmente intraluminal. Quando a cateterização é de longa duração, verifica-se que a colonização intraluminal é o principal mecanismo de infecção (Naomi P. O'Grady, Mary Alexander *et al.* 2011, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

Na contaminação intraluminal ou *hub*, o processo infeccioso poderá surgir através da flora endógena do paciente ou pela flora exógena do profissional, sendo que os organismos inoculados na *hub* migram ao longo do lúmen interno do cateter (Gaynes and Jacob 2022). Esta colonização aumenta progressivamente com o tempo e torna-se predominante após 30 dias da colocação de dispositivos de longa duração.

Assim, para cateteres não tunelizados de curto prazo, a superfície dérmica geralmente serve como fonte de contaminação microbiana. Para cateteres tunelizados subcutaneamente, e quanto maior o tempo de permanência do cateter no local, o *hub* e a superfície luminal são frequentemente implicados como a via de inoculação. Além disso, como os esforços para prevenir a contaminação da superfície externa são cada vez mais usados, a colonização do *hub* parece ser, atualmente, a via de infecção mais proeminente (Rupp and Karnatak 2018, Safdar, Abad *et al.* 2019).

Relativamente à disseminação hematogénica, esta pode ocorrer durante uma infecção originada em outro foco. Sendo mais provável de ocorrer em pacientes gravemente doentes ou naqueles com cateteres de longo prazo (Safdar and Maki 2004, Rupp and Karnatak 2018, Safdar, Abad *et al.* 2019).

Por fim, quanto à contaminação da solução perfundida, os microrganismos podem contaminar a infusão por vários mecanismos: durante o

processo de fabricação, durante a preparação da solução ou por via de contaminação retrógrada de um cateter contaminado ou manipulação por profissionais de saúde (Gaynes e Jacob, 2022). Deve-se suspeitar de infecções relacionadas com o fluido de infusão quando ocorre infecção num paciente de baixo risco que recebe uma solução intravenosa, ou quando há um grupo de infecções primárias em que se identifica a presença de uma estirpe incomum, geralmente bacilos Gram-negativo (Braun, Hussein *et al.* 2014). Esta via é a fonte mais rara de infecção e, geralmente, causa infecções epidémicas (Safdar, Abad *et al.*, 2019).

### 1.3 MICROBIOLOGIA DAS INFEÇÕES ASSOCIADAS A CVC

#### 1.3.1 Principais agentes patogénicos

Nas últimas décadas, são vários os estudos sobre os agentes etiológicos das infeções associadas a CVC. Antes da década de 1980, os microrganismos Gram-negativos eram os microrganismos predominantes associados às infeções da corrente sanguínea. Desde então, os aeróbios gram-positivos (por exemplo, *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus*) e espécies de *Candidas* têm aumentado a sua importância relativa. Assim, os microrganismos que produzem com mais frequência este tipo de infeções são aqueles cujo seu habitat natural é a pele. Aproximadamente 60% das infeções são produzidas por diferentes espécies de *Staphylococcus* comensais ainda que outros microrganismos como os bacilos Gram-negativo e diferentes espécies do género *Candida* estejam também envolvidos (Guzek, Rybicki *et al.* 2022, Ahn, Kim *et al.* 2023). Desta forma, os microrganismos que mais frequentemente causam infeções relacionadas a este tipo de dispositivos são os *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus* (60% de todas as infeções), *Bacilos Gram-negativo* (20%) e leveduras (10%) (Almirantea, Limónb *et al.* 2012, Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019, Guzek, Rybicki *et al.* 2022, Ahn, Kim *et al.* 2023).

Outros estudos documentam igual distribuição microbiológica, referindo também que este tipo de infecções são causadas por *Enterococcus* spp. (15,2%), *Candida* spp. (13,3%), *Klebsiella* spp. (8,4%), *Escherichia coli* (5,4%), *Enterobacter* spp. (4,4%) e *Pseudomonas* spp. (4%) (Weiner, Webb *et al.*, 2016; Zaroni, Pavone *et al.*, 2021). Os relatórios das entidades oficiais de vigilância nos Estados Unidos e na Europa documentam também distribuição semelhante com *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e espécies de *Cândida*, que representam a maioria das infecções, tendo estes microrganismos uma ampla tendência para uma maior resistência antimicrobiana entre os agentes patogénicos (Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Almirant and Pahissa 2013, Ferrer and Almirante 2014).

Desta forma, os *Staphylococcus* coagulase negativo são os agentes mais predominantes, tratam-se de microrganismos muitas vezes subestimados e cuja a identificação de espécies distintas não é incluída em muitos laboratórios clínicos. Apenas o *S. aureus* por se tratar de um microrganismo patogénico ganhou grande interesse e foi minuciosamente analisado. Os SCN apresentam mecanismos de patogénese muito relevantes, tais como a presença de adesinas de superfície, parede celular, membrana citoplasmática, cápsula ou formação de *slime*, uma substância de natureza mucopolissacarídica que aumenta exponencialmente a sua capacidade de adesão a superfícies. Esta substância também lhes confere uma grande capacidade de proteção face a agregações externas, quer do sistema imunitário do hospedeiro quer da ação dos antibióticos, dificultando a entrada na célula bacteriana e condicionando a sua eficácia (Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Almirante and Pahissa 2013, Gökçen, Vilcinskas *et al.* 2013, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018).

A predominância de espécies do género *Staphylococcus*, comuns na flora cutanêa, reflete a observação de que as infecções por CVC são mais frequentemente atribuíveis à contaminação extraluminal (Ong, Bonten *et al.* 2015 , Weiner, Webb *et al.* 2016, Novosad, Fike *et al.* 2020).

Os microrganismos como o *Staphylococcus* coagulase negativo, (especialmente *Staphylococcus epidermidis*), *Staphylococcus aureus*, a

*Pseudomonas aeruginosa* e a *Candida* spp. possuem uma substância polimérica extracelular constituída por exopolissacárido que permite o desenvolvimento do biofilme, sendo este considerado um dos seus principais fatores de virulência e que desenvolvemos detalhadamente no ponto seguinte (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019, Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Kırmusaoğlu 2016,). A referir, que os cateteres de curta duração podem ser colonizados por qualquer um dos microrganismos acima mencionados, enquanto que na maioria dos cateteres de longa duração, prevalece a colonização por *Staphylococcus* coagulase negativo, especialmente *Staphylococcus epidermidis*, com uma percentagem superior a 90% (Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019, Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Kırmusaoğlu 2016, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

### 1.3.2 Colonização de Cateteres Venosos Centrais por Biofilme Microbiano

Os microrganismos que aderem a dispositivos médicos podem assim tornar-se a causa de infeções persistentes visto que, geralmente, estes microrganismos crescem em biofilme (Rimondini *et al.*, 2005, Belbase, Pant *et al.* 2017, Osório, Oliveira *et al.* 2023). Entende-se por biofilme comunidades biológicas com um elevado grau de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais e se caracterizam pela adesão a superfícies vivas ou inertes. Segundo vários autores, 65% de todas as infeções nos países desenvolvidos são causadas por microrganismos associados em biofilmes (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, França 2023). Na formação de biofilme intervêm não só microrganismos com capacidade para produzir a matriz extracelular de exopolissacáridos, como também microrganismos capazes de cooperar para uma ação coordenada mediante um processo de comunicação química designado por “*quorum-sensing*” (Almirante and Pahissa 2013, Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, França 2023, Belbase, Pant *et al.* 2017). Geralmente a sua patogenicidade é ampliada por duas características: resistência ou tolerância aos antimicrobianos e pela

incapacidade do hospedeiro reagir contra o microrganismo, daí que infecções deste tipo apresentem grande relevância clínica (Weiner, Webb *et al.*, Belbase, Pant *et al.* 2017, Osório, Oliveira *et al.* 2023)

No caso particular dos biofilmes que se formam nos cateteres vasculares, a adesão inicial da bactéria a depende da interação com a superfície do material, incluindo as forças de *van der Waals*, interações eletrostáticas e hidrofóbicas (Donlan and Costerton 2002, Flemming and Wingender 2010a, Gominet, Compain *et al.* 2017). Estas forças também influenciam a adesão das proteínas sobre a superfície do cateter. De notar, que a maioria dos biomateriais plásticos usados para fabricar os cateteres intravasculares são hidrofóbicos, facilitando, desta forma, a adesão inicial (Donlan and Costerton 2002, Flemming and Wingender 2010a, Gominet, Compain *et al.* 2017).

Muitas bactérias têm também componentes hidrofóbicos na sua superfície. Ora, quando duas superfícies hidrofóbicas interagem num ambiente aquoso, a tendência é aderir à superfície devido à remoção da molécula de água entre si. Esta adesão bacteriana inicial, que é não específica e é reversível, é seguida de adesão específica, mediada por adesinas, que fixam os microrganismos à superfície do biomaterial. Segue-se a sua multiplicação e a formação da matriz extracelular que mantém o biofilme unido, sendo que como referido anteriormente, conduz a uma adesão irreversível à superfície do cateter (Donlan and Costerton 2002, Flemming and Wingender 2010a, Gominet, Compain *et al.* 2017, Diaz 2018 Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018). Esta matriz extracelular é composta por água, polissacarídeos, proteínas, Ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular e lípidos, que fornece estabilidade mecânica ao biofilme, melhora a sua capacidade de adesão aos cateteres e forma uma rede tridimensional coesa de polímeros que permite a comunicação intercelular no seu interior (Lima e Sena, 2017; Yousif, Jamal *et al.*, 2015, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018). Uma vez estabelecido o biofilme maduro, os microrganismos isolados podem dispersar, causando infecção e disseminando-se para outros locais do organismo. Essa probabilidade aumenta no caso de se verificarem condições ambientais desfavoráveis ao seu crescimento, como o esgotamento de nutrientes (Lima e

Sena, 2017, Yousif, Jamal *et al.* 2015, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018, França 2023).

Desta forma, a adesão microbiana à superfície do cateter depende não só das características físico-químicas, que incluem a rugosidade da superfície, hidrofobicidade e interações eletrostáticas, como também das propriedades da célula microbiana, nomeadamente, presença de adesinas (fímbrias, flagelos ou polissacarídeos) associadas à superfície ou presença de proteínas que ajudam a ancorar a célula na superfície do cateter (Donlan and Costerton 2002, Flemming and Wingender 2010a, Gominet, Compain *et al.* 2017, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018) (Fig. 1).

Os biofilmes sobre cateteres podem ser compostos por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. As bactérias comumente isoladas incluem os Gram-positivo: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase* negativos (*Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*), e os Gram-negativo: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Donlan and Costerton 2002, Hashem, Elazab *et al.* 2017, Gaynes e Jacob, 2022, Osório, Oliveira *et al.* 2023). De notar, a grande capacidade de adaptação em diversos tipos de substratos, ambientes e a sua diversidade metabólica, tornam estes microrganismos distintos dos isolados sendo que cada microrganismo apresenta especificidade e características únicas que lhes permitem crescer em comunidade. Por exemplo, a maioria das infeções deste dispositivo é causada, como referido ao longo deste trabalho de investigação, por *Staphylococcus* que detém um sistema “*quorum-sensing*” que permite a comunicação célula-a-célula e a regulação de numerosos fatores de virulência e colonização. O sistema regulador de gene acessório de *Staphylococcus* tem designado um papel central na patogenicidade de *Staphylococcus*, particularmente de *S. aureus* (Fig. 1). O seu gene regulador acessório (*agr*) do sistema “*quórum sensing*” de diminui a expressão de diversas proteínas de superfície celular e aumenta a expressão de muitos fatores de virulência secretados na transmissão do crescimento exponencial para a fase estacionária do desenvolvimento do biofilme. Além disso, o *quorum-sensing* está também envolvido no

desenvolvimento interação tanto por bactérias Gram-positivas como por Gram negativas, incluindo por exemplo, a *Pseudomonas aeruginosa*.

Estes microrganismos apresentam também a capacidade de produzir “slime” (matriz polianiónica extensa e difusa que circunda as células) sobre a superfície do cateter alterando dessa forma a sua superfície e tornando-a modificada pela adsorção da água, albumina, lípidos, complemento de moléculas de matriz extracelular, fibronectina, sais orgânicos, etc. Esses componentes macromoleculares, presentes no sangue, como as proteínas fibronectina, fibrinogênio, vitronectina, colagênio, aminina e elastina aderem à superfície do cateter, modificando-a e mediando a adesão de *S. epidermidis* ao cateter (Arciola *et al.*, 2012, Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Almirante and Pahissa 2013, Gökçen, Vilcinskas *et al.* 2013, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018).

No caso dos gram negativos, são as adesinas denominadas fímbrias que medeiam as funções de virulência relacionadas à adesão ao cateter. Estas adesinas são muito importantes na adesão inicial e durante esta fase promovem também a formação de microcolônias o que tornam o biofilme mais denso e estruturado (Laverty, Gorman *et al.* 2014). Por último, no caso dos fungos, estes podem desenvolver-se em fluido de hiperalimentação (o fluído usado na nutrição parenteral) e também aderem facilmente às proteínas de matriz extracelular, tais como fibrinogênio e fibronectina (Íñigo and Pozo 2018).

Deste modo, têm-se desenvolvido cada vez mais estudos de sensibilidade a antimicrobianos contra os microrganismos organizados em biofilme, uma vez que certos antibióticos se revelam mais eficazes que outros frente a bactérias que se desenvolvem desta forma (Gominet *et al.*, 2017, Hashem, Elazab *et al.* 2017, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, França 2023, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

No que concerne aos dispositivos médicos, a probabilidade de adquirir infecção é imperativa ao seu uso, daí que estudos de precisão de diagnóstico microbiológico e resistência antimicrobiana se revelem de fato pertinentes para a prática clínica com melhores resultados em saúde.

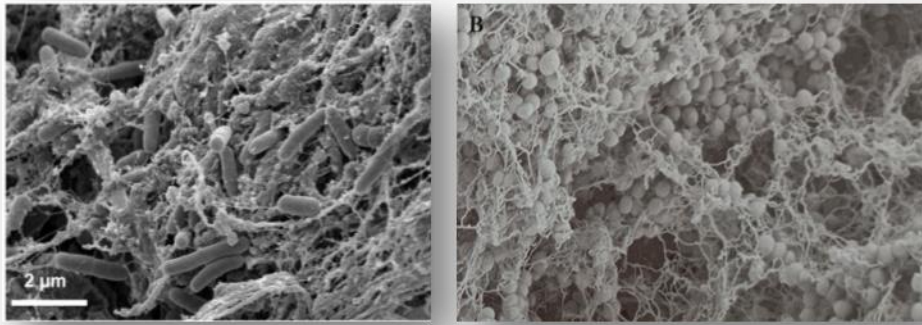


Figura 1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Biofilme. A) Biofilme na superfície de um CVC (Lebeaux, Chauhan et al. 2013); B) Biofilme de *Staphylococcus aureus* na superfície de um CVC (Pozo and Patel 2013)

#### 1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EM CVC

A dificuldade em diagnosticar as infecções associadas ao uso do cateter é um dos problemas com que muitos clínicos se deparam (Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Blot, Poulakou *et al.* 2019, Lorente, Lecuona *et al.* 2022) Essa avaliação baseia-se inicialmente na suspeita clínica de infecção por alterações do local de inserção da ponta do cateter, ou seja, sinais clínicos como a presença de dor, calor, edema, eritema, exsudato purulento próximo ao local de inserção do cateter, e sinais sistêmicos como febre, hipotensão e taquicardia. No entanto, o quadro clínico é muitas vezes inespecífico o que requer o diagnóstico laboratorial para confirmação de infecção relacionada com o cateter (Gominet, Compain *et al.* 2017, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018, Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019).

O diagnóstico preciso e precoce da infecção da corrente sanguínea associada ao uso de cateteres é essencial para orientar as decisões profissionais, tendo sido desenvolvidos, nas últimas décadas, vários testes de diagnóstico para melhor orientação clínica (Naomi P. O'Grady, Mary Alexander *et al.* 2011, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Safdar, Abad *et al.* 2019, Farina, Cornistein *et al.* 2019). Esses testes são amplamente categorizados como



métodos que requerem a remoção do dispositivo intravascular e alvo de estudo deste trabalho de investigação e por isso mais detalhados, e aqueles que não requerem (Safdar, Abad *et al.*, 2019). Em geral, aqueles que requerem remoção do dispositivo envolvem culturas quantitativas ou qualitativas do segmento do cateter, aqueles que não requerem remoção envolvem hemoculturas pareadas ou exame de citocentrifugação.

Embora existam muitos procedimentos microbiológicos para confirmar o diagnóstico de bacteremia associada a CVCs, não existe um consenso sobre qual é o melhor. O método escolhido dependerá, entre outros fatores, do tipo de cateter, tecnologia disponível no laboratório de microbiologia e do tempo de trabalho do mesmo.

#### 1.4.1 Técnicas que não requerem a remoção do CVC

O diagnóstico microbiológico da ponta do cateter que requer a sua remoção pode ser realizado através por vários métodos: Hemoculturas quantitativas simultâneas; Hemocultura quantitativa de sangue obtido do cateter; Diferença no tempo de positividade das hemoculturas; Coloração do sangue obtido através do cateter com laranja de acridina (+ Gram); zaragatoa endoluminal e cultura de amostras superficiais e de conexão do cateter. As técnicas mais utilizadas, pela sua facilidade e baixo custo económico, são a Hemocultura quantitativa de sangue obtido do cateter e a diferença no tempo de positividade das hemoculturas (Naomi P. O'Grady, Mary Alexander *et al.* 2011, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Safdar, Abad *et al.* 2019, Farina, Cornistein *et al.* 2019).

A primeira consiste, em realizar-se uma hemocultura através do cateter e considera-se um diagnóstico positivo para contagens superiores a 100 UFC/ml. No entanto, não permite distinguir entre bacteremia relacionada com o cateter e bacteremia de alto grau. A segunda, Diferença no tempo de positividade das hemoculturas, é utilizada recorrendo aos atuais sistemas de hemocultura que permitem identificar no interior do frasco a presença de microrganismos até alcançar um valor de positividade. Isto é possível uma vez que a cada 15min se analisa a presença de fluorescência ou presença de CO<sub>2</sub> (sensor colorimétrico que muda de cinzento para amarelo na presença do CO<sub>2</sub> produzido pelo

crescimento de microrganismos) no interior dos frascos. Esta capacidade pode utilizar-se para comparar diferenças do tempo de crescimento dos microrganismos nas hemoculturas obtidas simultaneamente através de uma veia periférica e do cateter. O diagnóstico definitivo de bacteremia relacionada com cateter estabelece-se quando o sangue obtido através do cateter é positivo 2 horas antes do sangue proveniente da veia periférica. Trata-se de uma metodologia difícil de interpretar se ocorrer administração de antibióticos através do cateter, facto muito comum em UCI (Blot, Schmidt *et al.* 1998, Kite, Dobbins *et al.* 1999, Malgrange, Escande *et al.* 2001 )

Quanto às hemoculturas quantitativas simultâneas trata-se de uma metodologia com uma utilidade muito limitada e a tecnologia lise-centrifugação tem um custo elevado e não disponível em todos os laboratórios (do ponto de vista económico não é viável ter dois sistemas de hemocultura diferentes). Este método consiste em inocular 10ml de sangue (cateter central e veia periférica) num tubo que permite lisar o sangue e após centrifugação semeia-se o sedimento em diferentes meios de cultura que incubam em atmosferas adequadas. Entre as 24 e 48 horas de incubação pode quantificar-se o número de colónias presentes. Quando no sangue obtido através do cateter se observa contagem de colónias 5 vezes superior ao obtido na punção de sangue da veia periférica considera-se que o resultado é preditivo de bacteremia relacionada com o cateter (valor considerado pela IDSA)(Mermel, Farr *et al.* 2001, Manian 2009, O'grady, Alexander *et al.* 2011).

Por último, quanto á zaragatoa endolumial e cultura de amostras superficiais e de conceção do cateter estes métodos são executados passando-se uma zaragatoa nas diferentes superfícies (zona de entrada em redor do cateter) e semeando-a numa placa de gelose de sangue (Blot, Schmidt *et al.* 1998, Kite, Dobbins *et al.* 1999, Malgrange, Escande *et al.* 2001, Mermel, Allon *et al.* 2009, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019).

### 1.4.2 Técnicas que requerem a retirada do CVC

O diagnóstico microbiológico da ponta do cateter que requer a sua remoção pode ser realizado através de três métodos: qualitativo, quantitativo e semi-quantitativo (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018 Farina, Cornistein *et al.* 2019, Lorente, Lecuona *et al.* 2022).

As culturas qualitativas são baseadas na introdução da ponta do cateter num caldo de enriquecimento, em que após incubação é verificada a sua positividade através da avaliação da turvação do meio. Nas culturas positivas é realizada uma subcultura para meio sólido, posterior identificação e antibiograma. Trata-se de uma técnica extremamente simples, o que a torna muito atraente para laboratórios com poucos recursos. No entanto, o seu uso não é aconselhado, pois não apresenta valor preditivo positivo, não sendo também possível saber o grau de colonização do dispositivo (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018).

Os métodos quantitativos e semi-quantitativos permitem conhecer o grau de colonização da amostra em função de um limite definido internacionalmente (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Farina, Cornistein *et al.* 2019). Laboratorialmente o CDC (2011) distingue dois conceitos (O'grady, Alexander *et al.* 2011): colonização e bacteremia relacionada com cateter. Define colonização do cateter como crescimento significativo de microrganismos com uma carga superior a 15 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), utilizando a técnica de sementeira semi-quantitativa do seguimento distal (ponta), do segmento cutâneo ou da conexão do cateter; e define bacteremia relacionada com o cateter quando o doente com CVC apresenta pelo menos uma hemocultura positiva obtida através da veia periférica, manifestações clínicas de infeção (sem presença aparente de outras fontes infecciosas) e cultura microbiológica de cateter positiva (O'grady, Alexander *et al.* 2011, Rupp and Karnatak 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Farina, Cornistein *et al.* 2019). Desta forma, pode ser definido se o resultado é significativo ou não e, portanto, determinar se a colonização do cateter é presumivelmente a causa da infeção.

A técnica semi-quantitativa, Método de *Maki*, baseia-se na avaliação da superfície de colonização, é o método que permite a avaliação da colonização extraluminal; a Técnica de *Cleri* a deteção de colonização endoluminal e o Método de Sonicação é o método que permite a avaliação da colonização de ambas as superfícies do cateter (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Farina, Cornistein *et al.* 2019 Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019, Gaynes and Jacob 2022).

#### 1.4.2.1 Métodos de cultura Semi-quantitativo

O método semi-quantitativo trata-se da técnica mais implementada nos laboratórios de Microbiologia. Consiste em rolar a ponta distal do cateter (4-5 cm) pelo menos quatro vezes sobre a superfície de uma placa de gelose de sangue que posteriormente é incubada durante 24 a 48 horas (*Maki, Weise et al.* 1977).

Este método descrito por *Maki et al.* é considerado o método de referência há mais de 25 anos e converteu-se na técnica de diagnóstico mais estudada (García-Rodríguez, Gómez *et al.* 2010, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019). Se em cultura se obtém valores de pelo menos 15 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/placa considera-se que o cateter está colonizado (*Maki, Weise et al.* 1977, Almirante and Pahissa 2013, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019, Lorente, Lecuona *et al.* 2022). A decisão de estabelecer o ponto de corte neste valor deve-se a um estudo inicial em que a maioria dos pacientes apresentavam contagens superiores a 15 UFC/placa (*Maki, Weise et al.* 1977, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Lorente, Lecuona *et al.* 2022). No entanto, esta técnica apresenta ocasionalmente falsos negativos, sobretudo em pacientes com colonização intraluminal (Bouza, Alvarado *et al.* 2005). Trata-se da limitação mais evidente deste método, sendo apenas possível avaliar a superfície externa do cateter sem ser possível obter informação da colonização interna (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018). Este aspeto tem que se ter em conta quando se tratam de cateteres de longa duração, no qual a colonização endoluminal pode ser a causa de bacteremia. Outra limitação deste método passa pelo uso de apenas

um meio de cultura, o que em caso de infecção por microrganismos mais exigentes pode condicionar o resultado do estudo microbiológico (Martin-Rabadan, Gijon *et al.* 2008, Gominet, Compain *et al.* 2017, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018). De notar que, o diagnóstico de bacteremia relacionado com o cateter só se pode estabelecer quando se recupera o mesmo microrganismo em uma hemocultura proveniente do sangue periférico (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, García-Rodríguez, Gómez *et al.* 2010, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019).

Ao longo dos anos são vários os estudos que avaliam a sensibilidade e especificidade destes métodos. Num estudo prospetivo e randomizado realizado por Bouza, Liñares *et al.* (2004) após a avaliação de 1000 pontas de cateteres de curto e longo prazo conclui-se que a *técnica de Maki* trata-se de um padrão de referência, apesar da introdução dos métodos quantitativos, a especificidade e sensibilidade foi superior a 90%, tanto para cateteres de longa como de curta duração (Bouza, Alvarado *et al.* 2005). Outros estudos originais, e anteriores, analisaram a sensibilidade desta técnica para diagnosticar bacteremias relacionadas com cateteres de longa duração (mais de 30 dias) e também evidenciaram valores de sensibilidade entre 45 a 75% (Raad, Costerton *et al.* 1993). Na *metanálise* realizado por Safdar *et al.* em 2005 encontraram sensibilidade global de 85% e especificidade de 82% para o diagnóstico de BRC. O Valor Preditivo Positivo (VPP) desta técnica é altamente variável (10-75%) de acordo com o tempo de permanência do cateter; é baixa se a prevalência da infecção for baixa, embora melhorasse se apenas fossem colocados cateteres com suspeita clínica de BRC (Safdar *et al.* 2005) Avaliando os resultados semi-quantitativos apresentados por outros investigadores, verificaram-se também ainda valores de sensibilidade e especificidade, respetivamente de 84 a 85% (Almirante and Pahissa 2013). Os trabalhos de investigação mais recentes demonstram que o método semi-quantitativo apresenta uma sensibilidade cerca de 78% e uma especificidade de 90% (Gominet, Compain *et al.* 2017, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018).

Neste sentido, são vários os estudos que suportam a utilização do *Método de Maki* como método de referência para avaliação da colonização extraluminal de cateteres intravasculares. No entanto, com o intuito de melhorar a deteção

de microrganismos que progridem no interior do lúmen do cateter, foi desenvolvido o método quantitativo que permite o diagnóstico também da superfície endoluminal (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018 Chaves, Garnacho-Montero *et al.* 2018; Gominet, Compain *et al.* 2017).

#### 1.4.2.2 Métodos de cultura Quantitativo

Utilizando apenas a técnica anterior, perdem-se muitos dos microrganismos que colonizam a superfície intraluminal. Esta limitação é mais evidente com cateteres de longa duração, nos quais o interior do cateter é o lugar predominante de colonização e a causa de infecções sistêmicas. Neste sentido, têm sido utilizadas várias técnicas que libertam os microrganismos da superfície interna do cateter seguidas de diluições seriadas e que permitem a quantificação dos mesmos: Técnica de Cleri *et al.* em que o segmento intravascular é imerso em 2-10 ml de caldo de enriquecimento e o seu interior do é lavado 3 vezes. Esse caldo é diluído 1/100 e semeado 0,1 ml desta diluição (assim como o caldo não diluído) numa placa de gelose de Sangue (Cleri *et al.* 1990). Técnica de Brun-Buisson *et al* em que a ponta do cateter é coberta com 1 mL de água estéril, agitado no vórtex durante 1 minuto e posteriormente semeando 0,1 mL da suspensão na superfície de uma placa de gelose de Sangue (Brun-Buisson *et al.* 1987). Modificação da Técnica de Cleri utilizada por Liñares *et al.* em que o interior do cateter é inundado ou lavado com 2 mL de caldo de enriquecimento (sem submergi-lo); faz-se uma diluição 1:10 do caldo e semeiam-se 0,1 mL em gelose de Sangue e sonicação (Liñares *et al.*, 1985).

No que respeita a sonicação, em 1990, Sherertz *et al.* descreve pela primeira vez o processo de sonicação, propõe que se introduza a ponta do cateter em 10 ml do caldo de tripticase de soja, sónica-lo durante 1 minuto e agité-lo com um vortex durante 15 segundos. Depois disso, semeia-se 100µl do caldo original e de diluições de 1:10 e 1:100 em gelose de sangue de forma a quantificar o grau de colonização (Sherertz, Radd *et al.* 1990). Diferentes estudos indicam que o ponto de corte superior ou igual a 100 UFC/segmento pode distinguir entre a origem da infecção e colonização (Chaves, Garnacho-Montero *et al.* 2018; Gominet, Compain *et al.* 2017, Lorente, Lecuona *et al.*

2022). O uso da sonicação seguida de agitação no vortex tem a vantagem de permitir libertar os microrganismos tanto da superfície externa, como interna do cateter. Esta técnica mostra-se bastante eficaz, *Safdar et al.* obtiveram um valor de sensibilidade de 83% para este método e um valor de Especificidade de 89% para o diagnóstico de bacteremia relacionada com cateter (*Safdar et al.*, 2005). Atualmente a técnica não sofreu qualquer alteração no seu procedimento. Embora a simplicidade técnica deste método tenha generalizado o seu uso, não devemos esquecer que existem cerca de 15% de bacteremias de origem intraluminal, especialmente em cateteres de longa duração, que podem não ser diagnosticados se se recorrer apenas à cultura semi-quantitativa (*Aldea Mansilla et al.* 2019; *Chaves, Garnacho-Montero, del Pozo, et al.* 2018 *Lorente, Lecuona et al.* 2022). A combinação da *técnica de Maki* com a sonicação ou outras técnicas quantitativas descritas, pode conduzir à redução de todas estas limitações (*Guembe, Martín-Rabadán et al.* 2016, *Aldea Mansilla et al.* 2019 *Lorente, Lecuona et al.* 2022). Desta forma, o diagnóstico laboratorial deve passar pela utilização de métodos semi-quantitativos e métodos quantitativos, garantindo avaliar não só a superfície intraluminal, mas também a superfície extraluminal (*Siegman-Igra, Anglim et al.* 1997, *Bouza, Alvarado et al.* 2005, *Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon et al.* 2019, *Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero* 2019, *Lorente, Lecuona et al.* 2022). De referir que os valores preditivos dos métodos quantitativos ou semi-quantitativos podem variar dependendo do tipo e localização do cateter, da metodologia de cultura utilizada e da fonte de colonização do cateter (*Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon et al.* 2019).

Atualmente, existem múltiplos estudos comparativos entre os dois métodos, os quais evidenciam diferenças entre eles, sendo que alguns deles apresentam diferenças estatisticamente significativas a favor do método de sonicação.

A investigação em torno dos biofilmes associada a infeções da corrente sanguínea associadas ao uso dos cateteres, também deve conduzir a uma reavaliação destes métodos, uma vez que microrganismos como os *Staphylococcus* coagulase negativos que são muitas vezes considerados contaminação por fazerem parte da flora comensal do paciente e do

profissional de saúde, atualmente, e à luz da bibliografia assumem um papel cada vez mais preponderante nas infecções associadas a CVC (Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019, Hashem, Elazab *et al.* 2017)

#### **1.4.3 Identificação dos microrganismos isolados**

A identificação dos microrganismos isolados pelos métodos descritos anteriormente, pode ser feita através dos métodos bioquímicos convencionais e através de sistema EM MALDI-TOF que analisa o perfil proteico (sobretudo proteínas ribossômicas) do microrganismo e a compara com uma base de dados para estabelecer a identificação quanto ao género e à espécie (Clark, Kaleta *et al.* 2013, Bellido and Buitrago 2015, Cantón and García-Rodríguez 2016, Jang and Kim 2018, Haider, Ringer *et al.* 2023). Esta técnica é o foco principal desta investigação e sobre a qual recai o próximo capítulo.

De notar que, se os microrganismos identificados fazem parte da flora normal é possível obter resultados definitivos, se se tratarem de coagulase negativos podem verificar-se dúvidas. Pode também ser usado para o diagnóstico técnicas de biologia molecular que se executam através de DNA bacteriano extraído do sangue do cateter. Trata-se de uma técnica sensível e específica que pode contribuir para diminuir o número de cateteres retirados. São poucos os laboratórios que podem usa-los por se tratar de um método dispendioso.

#### **1.4.4 Recomendações específicas para o diagnóstico microbiológico de infeções associadas a cateteres intravasculares**

O diagnóstico de infeções relacionadas a cateteres é um autêntico desafio, daí que nos últimos anos são várias as diretrizes criadas no sentido de uniformizar o seu diagnóstico. A diretriz de prática clínica da Sociedade de Doenças Infeciosas Americana (IDSA) (Mermel, Farr *et al.* 2001, Manian 2009, O'grady, Alexander *et al.* 2011) sugere um dos seguintes critérios para o diagnóstico definitivo de ICSRC: crescimento do mesmo microrganismo a partir da cultura de um segmento de cateter pelo método semi-quantitativo (>15



UFCs/placa) ou cultura quantitativa pelo método de sonicação ( $10^2$  UFC) e hemocultura periférica obtida percutaneamente; Hemoculturas pareadas obtidas simultaneamente de um lúmen do cateter e sangue periférico atendem aos critérios para ICSRC por hemoculturas quantitativas (3 vezes a contagem de colônias e lúmen do cateter versus periférico) ou diferença de tempo para positividade (diferença de 2 horas no tempo para positividade, lúmen do cateter versus periférico) (Rupp e Karnatak, 2018).

Outras entidades e organizações reguladoras (CDC, National Healthcare Safety Network (NHSN), Instituto Nacional Ricardo Jorge (INRJ), Sociedade Española Enfermedades *Infecciosas* Microbiología Clínica (SEIMC) definiram alguns pontos base no que concerne ao diagnóstico microbiológico deste tipo de infeções, dos quais se destacam: a) Somente cateteres de pacientes com sinais e sintomas de infeção devem ser encaminhados ao laboratório de microbiologia para cultura, não sendo recomendável culturas de vigilância sistemática; b) Em pacientes nos quais o cateter é removido devido a suspeita de bacteremia, pelo menos um par de hemoculturas periféricas deve ser obtido por técnicas assépticas antes do início da antibioterapia; c) O procedimento semi-quantitativo de *Maki* deve ser utilizado como padrão, embora outras técnicas para avaliação da colonização intraluminal e/ou extraluminal possam ser consideradas alternativas; d) Recomenda-se a identificação dos microrganismos relacionados com a infeção associada a CVC quanto ao género, a espécie e padrão de sensibilidade aos antimicrobianos; e) Nos pacientes nos quais se pretende preservar o cateter, recomenda-se o estudo semi-quantitativo da pele e “hubs” devido ao seu VPN; f) As hemoculturas quantitativas diferenciais de sangue, colhidas por todos os lumens do cateter e por veia periférica, são um procedimento recomendado no diagnóstico de ICSRC (O’Grady, Alexander *et al.* 2011, Chaves, Garnacho-Montero *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero 2019).

A referir que Portugal se rege pelas normas internacionais, no entanto, a Direção Geral de Saúde definiu também a Norma 022/2015 que define “feixes de intervenções” de Prevenção de infeções associadas com CVC de forma a uniformizar as orientações (O’Grady, Alexander *et al.* 2011, Chaves, Garnacho-Montero *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019)

## 1.5 EPIDEMIOLOGIA

Como referido anteriormente, os CVC representam um risco maior de infeções relacionadas ao dispositivo do que qualquer outro tipo de dispositivo médico e são as principais causas de morbidade e mortalidade (Slobbe, Barzouhi *et al.* 2009). Também são a principal fonte de bacteremia e septicémia em paciente hospitalizados (Ross, Quesada *et al.*, 2006; Mansilla, Ahufinger *et al.*, 2018; Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.*, 2019). Deste modo, como descrito anteriormente são muitos os fatores que justificam a avaliação epidemiológica deste tipo de infeções. Do ponto de vista epidemiológico são várias as medidas utilizadas para estimar a bacteremia relacionada com o cateter sendo as taxas de prevalência e as taxas de incidências as mais utilizadas. Nos estudos de prevalência são identificadas as infeções, num determinado ponto no tempo, em todo o hospital ou em serviços selecionados. A taxa de prevalência é afetada pela duração do internamento e pela duração das infeções. Este tipo de estudos é simples, fácil e barato. Os estudos de incidência permitem a identificação de novas infeções e requerem a monitorização de todos os doentes de uma população definida durante um período específico de tempo.

À luz da bibliografia vários são os estudos que evidenciam alterações na epidemiologia, não só devido ao aumento de estratégias para diminuir as complicações infecciosas associadas aos CVC, mas também devido à mudança epidemiológica dos agentes produtores de bacteremias relacionadas com estes dispositivos (Ferrer e Almirante, 2014; O'Grady, Alexander *et al.*, 2011; Rupp e Karnatak, 2018, Guzek, Rybicki *et al.* 2022).

Estes estudos incidem sobretudo em UCI uma vez que 80% dos indivíduos internados nesta unidade desenvolvem ICSRC (Tacconelli, Smith *et al.* 2009, Novosad, Fike *et al.* 2020, Gaynes and Jacob 2022, Guzek, Rybicki *et al.* 2022) e incidem não só nas taxas de incidência como também na descrição dos microrganismos isolados. No que respeita a epidemiologia dos microrganismos isolados, um estudo recente desenvolvido por Badia-Cebada, Pujol *et al.* (2019),

verificaram que a taxa de incidência de infecção por *Staphylococcus* coagulase negativo seguiu uma tendência de queda, ao contrário da incidência de bacilos Gram-negativo que tem aumentado significativamente (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019). Também o isolamento de *Staphylococcus aureus* aumentou neste tipo de infecções, sobretudo em cateteres inseridos em salas de emergência, onde a contaminação ocorre sobretudo durante a inserção (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019).

Efetivamente, segundo os dados do CDC e ainda do “*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance de United States*” nos últimos anos os bacilos Gram-negativo são a causa de infecção em mais de 20% de bacteriemias relacionadas com cateteres, o que revela uma mudança epidemiológica nos agentes produtores deste tipo de infecções (Farina, Cornistein *et al.* 2019 ,O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Almirante and Pahissa 2013).

Ainda assim os microrganismos que com mais frequências produzem infecções e bacteriemias relacionadas com cateter são os *Staphylococcus* coagulase negativo e *Staphylococcus aureus* (50-60%), sendo as restantes são produzidas por bacilos Gram-negativo (10 a 20%), *Candida* spp. (5% a 10%) e *Enterococcus* spp. (5% a 10%); outros microrganismos apresentam uma frequência baixa (Blot, Bergs *et al.*, 2014; Braun, Hussein *et al.*, 2014; Garcia-Gasalla, Arrizabalaga-Asenjo *et al.*, 2019; Ripa, Morata *et al.*, 2018; Stuart, Cameron *et al.*, 2013, Guzek, Rybicki *et al.* 2022).

De referir, que quanto aos bacilos Gram-negativo ainda não se encontra bem definido qual o seu incremento neste tipo de infecções o que poderá significar uma mudança de paradigma no seu tratamento empírico, na medida em que o tratamento das bactérias Gram-negativo apenas se reserva para pacientes graves (Almirante and Pahissa 2013, Guzek, Rybicki *et al.* 2022, Ahn, Kim *et al.* 2023).

Quanto às taxas de incidência, estas revelam diferenças entre países e hospitais, o que justifica que estes estudos sejam feitos regularmente e avaliados à luz de cada realidade para que estratégias sejam desenvolvidas de forma a diminuir este tipo de infecções. Analisando a bibliografia verificamos

essas diferenças, num estudo recente de tendência epidemiológica desenvolvido por Badia-Cebada, Pujol *et al.* (2019) verificou-se uma descida da taxa de incidência anual de 0,23 episódios em 1000 dias de cateter em 2007, para 0,13 em 2019. Esta tendência de queda foi principalmente associada à diminuição progressiva da taxa de incidência anual das infeções da corrente sanguínea associada ao uso de CVC (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019). Uma tendência semelhante foi observada no Canadá num estudo efetuado durante 6 anos (Fontela, Platt *et al.* 2012, Gaynes and Jacob 2022). Em 2017, houve 24.265 infeções da corrente sanguínea associadas à linha central relatadas por 3.576 hospitais em unidades de cuidados intensivos dos Estados Unidos para a Rede Nacional de Segurança em Saúde dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Gaynes and Jacob 2022). Em contraste, a incidência agrupada relatada de infeções da corrente sanguínea associada a CVC em 422 UCI de 36 países na América Latina, Ásia, África e Europa de 2004 a 2009 foi substancialmente maior, 6,8 eventos por 1.000 dias de Cateter (Rosenthal, Bijie *et al.* 2012, Gaynes and Jacob 2022). Estas diferenças podem ser justificadas pelos esforços das equipas multidisciplinares na prevenção deste tipo de infeções (Ferrer e Almirante, 2014; O’Grady, Alexander *et al.*, 2011; Rupp e Karnatak, 2018).

Em Portugal, poucos são os estudos a este nível, sendo que, como referido anteriormente, remonta a 2017 o último estudo desenvolvido pela Direção Geral de Saúde (DGS) no âmbito do Programa Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos (PPCIRA) que evidenciou que a taxa de incidência da INCS em serviços de internamento associado a CVC e por 1000 dias de CVC foi de 1,7 em 2016, sendo que nos serviços de Medicina Intensiva apresentava um valor de 0,9 por 1000 dias de CVC reduzindo 57,1% de 2008 a 2016 (Tabela 1). De notar que, o relatório não evidencia quais as principais estirpes isoladas (Saúde 2017)

Tabela 1- ICSRC por 1000dias de CVC, em UCI Adultos 2008-2016 (Fonte: DGS/PPCIRA 2017 - Programa de Vigilância Epidemiológica UCI)

Ano	Infeção relacionada com cateter (CSRCVC) por 1000dias de CVC, em UCI Adultos
2008	2,1
2009	2,2
2010	1,4
2011	1,5
2012	1,0
2013	1,3
2014	1,9
2015	1,3
2016	0,9

A mais recente evidencia nacional refere-se a Cateter Venosos Periféricos (CVP), dispositivo invasivo mais comum nos hospitais portugueses em que Osório, Oliveira *et al.* analisaram 110 pontas de CVP das quais 30% estavam colonizadas. O género mais prevalente foi *Staphylococcus spp.*, com 48,8%. Pertencentes a esse género, as espécies bacterianas isoladas foram *S. aureus* (4,4%), *S. epidermidis* (26,7%), *S. haemolyticus* (11,1%), *S. lentus* (2,2%), *S. warningeri* (2,2%) e *S. xylosus* (2,2%). Outros microrganismos clinicamente relevantes foram encontrados como *Enterococcus spp.* (4,4%), *Escherichia coli* (2,2%), *Klebsiella pneumoniae* (2,2%) (Osório, Oliveira et al. 2023).

Por último, em Espanha, num estudo desenvolvido entre 2003 e 2010 pelo Hospital Geral Universitário Gregorio Marañón de Madrid, os principais microrganismos identificados como agentes etiológicos deste tipo de infeções foram os *Staphylococcus* coagulase-negativo corresponderam a 43,3%, seguidos pelo *Staphylococcus aureus*, correspondendo a 17,3% dos casos. Os Bacilos Gram-negativos constituíram 17%, seguidos de perto pelas leveduras 16%, das quais nos últimos anos foi observado um aumento. Outros microrganismos envolvidos em infeções associadas a CVC foram identificados como *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, e até mesmo espécies anaeróbicas, como *Propionibacterium acnes*. (Mansilla, Ahufinger et al. 2018) (Fig. 2). Em 2020 coincidindo com a segunda onda da pandemia, os valores de incidência de bacteremia primária e bacteremia relacionada a cateter foi de 6,27 e 2,91 episódios por 1.000 dias de CVC (Gallart, Delicado et al. 2022 )

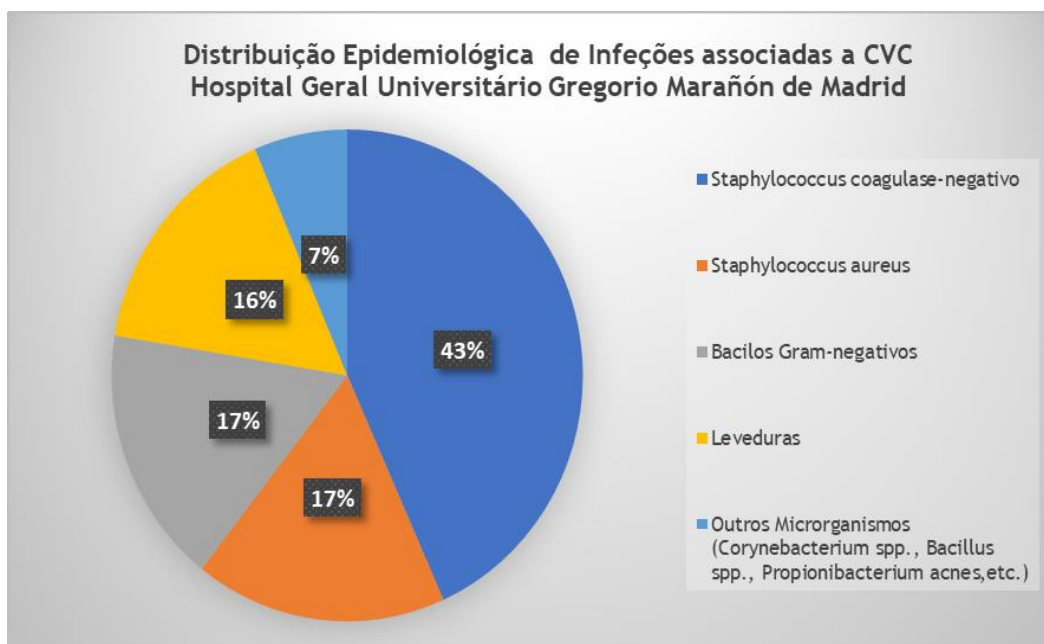


Figura 2 - Gráfico representativo de Distribuição Epidemiológica de Infeções associadas a CVC no período de 2003 a 2010 (Fonte: adaptado de Mansilla, Ahufinger et al. 2018)

A implementação de estratégias preventivas é muito vantajosa tanto a nível económico como para o paciente. Desta forma, existem atualmente diferentes estratégias para evitar o desenvolvimento de microrganismos e,

consequentemente, o desenvolvimento de infecção. De entre as medidas básicas para a prevenção a infecção destacam-se: a correta higienização das mãos e o uso de técnicas assépticas durante a inserção e o cumprimento dos cuidados necessários com os cateteres; a educação sanitária de todos os profissionais sobre indicações para a utilização de cateteres vasculares; a aplicação de corretos procedimentos de inserção e manutenção e aplicação de medidas de controlo de infeções sendo esta última uma estratégia sobretudo preventiva e particularmente importante. Outras medidas preventivas incluem a escolha adequada de locais de inserção de cateteres, a utilização de material apropriado para cada tipo de cateter, a utilização de precauções máximas de barreira para a inserção de cateteres venosos centrais, a substituição de conjuntos de infusão em intervalos apropriados, a correta assepsia de dos locais de inserção e por último a remoção imediata dos cateteres que não são necessários para a infusão de fluidos ou medicamentos (Ferrer & Almirante, 2014).

Neste contexto, em Espanha foi desenvolvido um projeto inovador designado “*Proyecto Bacteremia Zero*” (BZ) com o objetivo de implementar muitas das medidas preventivas anteriormente descritas. Trata-se de um projeto iniciado em 2009 liderado pela Sociedade Espanhola de Medicina Intensiva que conta com o apoio do governo Espanhol e da Organização Mundial de Saúde. O seu principal objetivo passa por reduzir a média nacional e taxa de incidência de bacteremias relacionadas com cateteres em valores a baixo do definido por muitas sociedades científicas. As UCIs que aderiram ao projeto registaram taxas de infeção inferiores que permaneceram abaixo do padrão de qualidade recomendado pela Sociedade Espanhola de Medicina Intensiva Critica e Unidades Arterias Coronarias (SEMICYUC). Segundo os dados analisados pela entidade promotora do projeto verificou-se, que em 2008 se registava uma (media) de 4,89 episódios por mil dias de uso de cateter ao passo que esse valor passou para 2,78 episódios no período de intervenção de 2009-2010, para 2,61 em 2011 e para 2,23 episódios em outubro de 2012. Em 2020, coincidindo com a segunda onda da pandemia, os valores de incidência de bacteremia primária e bacteremia relacionada a cateter foi de 6,27 e 2,91 episódios por 1.000 dias de cateter venoso central (CVC) respetivamente, colocando-nos em números

superiores aos do período anterior ao início do projeto (*Gallart, Delicado et al. 2022*). No entanto, estes dados confirmam a eficácia do programa e a necessidade/ importância de se mudar hábitos e culturas, incrementando as boas práticas em cuidados de saúde. As diretrizes do projeto passam, a semelhança das estratégias descritas anteriormente, por: Higiene adequada das mãos; uso de Clorexidina na preparação da pele; uso de medidas de barreiras durante a inserção dos cateteres (luvas, batas, máscaras, etc.); preferência da via subclávia; retirada dos cateteres não necessários; Manipulação asséptica dos cateteres; higiene corporal diária com clorexidina; utilização de *plugs* com solução antisséptica nos conectores e uso de ultrassom durante a inserção do cateter. De referir que todas estas estratégias apresentam evidências científicas da sua eficácia (*Gallart, Delicado et al. 2022*). Por exemplo, sabe-se que os CVC revestidos com agentes antimicrobianos com sulfadiazina/clorexidina de prata ou minociclina/rifampicina, estão associados a uma diminuição do risco de infeção e que os pensos impregnados com clorexidina impedem que os microrganismos presentes na pele e no local de inserção proliferem e tenham acesso à superfície externa do CVC (O'Grady et al., 2011; Rupp & Karnatak, 2018).

Assim, existem dados extensivos que apoiam utilização destas diretrizes de forma a prevenir estas infeções, diretrizes essas que se irão refletir em menores taxas de mortalidade, morbidade e custos associados.

## 2 ESPECTROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF EM MICROBIOLOGIA

A espectrometria de massa (EM) é uma técnica analítica baseada na separação e deteção de partículas. As primeiras aplicações desta tecnologia surgiram na *análise* de rotina de mistura de hidrogenocarbonetos 40s. Posteriormente, tem sido utilizada para elucidar a estrutura de compostos orgânicos tais como polipéptidos, proteínas e biopolímeros de elevado peso



molecular (Castaño, Juanes *et al.* 2016). Gradualmente a EM foi consolidada como uma técnica analítica qualitativa e quantitativa utilizada para identificar e caracterizar compostos químicos com base nas suas propriedades de massa, isto é, as razões massa/carga ( $m/z$ ) de iões moleculares (Hou, Chuan *et al.* 2019).

A técnica MALDI foi desenvolvida pelos investigadores alemães Franz Hillenkamp e Michael Karas em 1985 que descreveram pela primeira vez o método e suas aplicações (Karas, Bachmann *et al.* 1985). Até então, as técnicas de ionização disponíveis para espectrometria de massa de moléculas biológicas não eram adequadas para esses tipos de moléculas, uma vez que promoviam a fragmentação e destruição durante o processo de ionização. Hillenkamp e Karas descobriram que a incorporação de matrizes orgânicas absorvia a energia do laser, permitindo a ionização eficiente e suave das moléculas, sem o efeito de fragmentação significativo. Essa abordagem revolucionária permitiu a *análise* de diversos compostos biológicos por espectrometria de massa sem a necessidade de etapas complexas de preparação da amostra (Karas, Bachmann *et al.* 1985). Posteriormente, o desenvolvimento da técnica MALDI foi combinado com a deteção de tempo de voo (TOF), emergindo na técnica MALDI-TOF. O princípio básico do TOF é a separação de iões de acordo com a relação massa/carga ( $m/z$ ) em medida do tempo que os iões levam para percorrerem um caminho conhecido até um detetor, permitindo a *análise* precisa da massa das moléculas ionizadas (Jesús Mingorancea, Regueirob *et al.* 2016).

O uso da EM em Microbiologia foi descrito pela primeira vez em 1975 quando Anhalt e Fenseaul usaram esta técnica para identificação bacteriana mas a sua aplicação melhorou significativamente em 1988 quando a técnica MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) foi descrita como um método de ionização útil para a descrição de grandes biomoléculas, uma vez que a matriz permite a cristalização da amostra e subsequente ionização sem degradação da mesma. (Anhalt and Fenselau 1975, Karas and Hillenkamp 1988, Castaño, Juanes *et al.* 2016). Atualmente, esta poderosa técnica analítica é amplamente utilizada para identificar e analisar moléculas, como proteínas,

péptidos, lípidos e outros compostos orgânicos (Engel, Prabutzki *et al.* 2022). Assim, nos últimos anos, a EM MALDI-TOF deixou de ser uma tecnologia completamente alheia aos procedimentos diagnósticos de Microbiologia Clínica para ser, antes de mais, uma promissora novidade, e quase sem solução de continuidade, um procedimento completamente integrado na atividade clínica diária de um laboratório de Microbiologia (Bellido and Buitrago 2015, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Jesús Mingorancea, Regueirob *et al.* 2016). Em 2009, foi publicado o que provavelmente foi o artigo chave para dar a conhecer aos especialistas envolvidos no diagnóstico de doenças infecciosas as possibilidades da EM MALDI-TOF. E quase um ano depois, publica-se em Espanha o primeiro artigo em que foi feita uma avaliação global da utilidade EM MALDI-TOF para a identificação de microrganismos de origem clínica (Ferreira, Vega *et al.* 2010, Jesús Mingorancea, Regueirob *et al.* 2016, Bizzini, Durussel *et al.* 2010). Desde então, o número de publicações sobre aplicações clínicas da EM MALDI-TOF aumentou exponencialmente, especialmente no que diz respeito à identificação de diferentes grupos de microrganismos a partir de culturas. Desta forma, este sistema surge como uma ferramenta robusta para a identificação fenotípica de microrganismos através da *análise* das proteínas constituinte da parede celular e de proteínas ribossomais, aumentando a sua confiabilidade quando comparada a outras técnicas fenotípicas convencionais. O espectro gerado é interpretado como “impressões digitais” de um *taxon* específico, discriminando espécies de microrganismos estreitamente relacionadas. Esta metodologia tem-se mostrado de grande relevância para a investigação em microbiologia clínica, por se tratar de uma técnica rápida, econômica e eficaz (Ferreira, Vega *et al.* 2010, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Jesús Mingorancea, Regueirob *et al.* 2016, Bizzini, Durussel *et al.* 2010).

Desta forma, a EM MALDI-TOF tem a sua aplicação em diferentes campos, como proteómica, *análise* de lípidos, *análise* de hidratos de carbono, identificação de microrganismos e muito mais. Assim, é amplamente utilizada em investigação biomédica, diagnóstico clínico, descoberta de novos fármacos e controle de qualidade em indústrias farmacêuticas e de alimentos. Devido à sua alta sensibilidade, velocidade de *análise*, capacidade de identificação de múltiplos analitos e necessidade pouca quantidade de amostra, esta técnica é

uma ferramenta valiosa em muitas áreas da ciência e da medicina (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Bizzini, Durussel *et al.* 2010).

Atualmente, a técnica MALDI-TOF é amplamente utilizada em laboratórios de investigação e clínicas em todo o mundo (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Ashfaq, Da'na *et al.* 2022). Nos últimos 10-15 anos, o MALDI-TOF começou a ser utilizado rotineiramente como método de identificação de primeira linha em laboratórios de Microbiologia (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Bizzini, Durussel *et al.* 2010) A identificação de microrganismos (como bactérias e fungos ) por métodos fisiológicos, serológicos, bioquímicos e quimiotaxonômicos requer muito esforço, recursos e tempo (Haider, Ringer *et al.* 2023) e esse diagnóstico inclui a avaliação da forma da colônia e a aplicação de testes fenotípicos e bioquímicos, especialmente no caso de fungos, que são geralmente determinados com base nas suas distintas formas microscópicas e macroscópicas, ou seja , a maioria das técnicas microbiológicas convencionais continuar a basear-se em princípios e evidências que requerem o crescimento do microrganismo, o que faz com que a identificação possa demorar de horas a várias semanas após o recebimento da amostra. Além disso, estas técnicas têm limitações óbvias de aplicabilidade e fiabilidade sobretudo quando se trata de microrganismos que crescem com dificuldade, ou não crescer em todos os meios de cultura, ou que apresentam uma atividade bioquímica limitada(Bellido, Castaño *et al.* 2012) Apesar dos recentes métodos genômicos (hibridização DNA-DNA, 16s rRNA, razão G+C, reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e fluorescência de hibridização *in situ* ), serem confiáveis e também cada vez mais usados em detrimento dos métodos convencionais , essas técnicas são demoradas e dispendiosas e requerem ampla experiência para se obter uma identificação precisa (Ashfaq, Da'na *et al.* 2022).

Em suma, a tecnologia MALDI-TOF oferece muitas vantagens em comparação com as técnicas microbiológicas e moleculares convencionais principalmente devido ao elevado grau de rapidez, simplicidade, certeza, custo-benefício (Bellido and Buitrago 2015). Esta tecnologia tem a capacidade de identificar vários tipos diferentes de microrganismos e, portanto, possui o potencial de substituir outros métodos de identificação. Neste sentido, métodos de

identificação bacteriana precisos e rápidos são cada vez mais necessários e é neste contexto que surge a pertinência deste trabalho de investigação.

## 2.4 FUNDAMENTO DA TÉCNICA

O princípio básico da espectrometria de massa MALDI-TOF envolve a ionização das moléculas de interesse. A amostra é misturada com uma matriz de absorção de laser, que geralmente consiste numa molécula de matriz de baixa massa molecular que absorve a energia do laser e transfere-a para as moléculas-alvo. A matriz e a amostra são depositadas numa placa ou alvo de MALDI. Seguidamente, um pulso de laser de alta energia é aplicado na amostra, resultando na vaporização da matriz e das moléculas-alvo. Durante esse processo de ionização, os analitos são carregados positivamente (ou negativamente) e são acelerados por um campo elétrico em direção a um detetor de massa. Os iões resultantes são separados de acordo com sua relação massa/carga ( $m/z$ ) sendo detetados e registados pelo espectrómetro de massa. Uma vez que o tempo que os iões demoram a percorrer o caminho até o detetor é proporcional à sua massa, é possível a identificação e *análise* precisa da composição molecular de uma amostra. Assim, a técnica MALDI-TOF baseia-se em três princípios fundamentais: (i) ionização por laser, (ii) matriz de absorção e (iii) deteção de tempo de voo. Em detalhe:

(i) Ionização por laser: A primeira etapa da técnica MALDI-TOF envolve a ionização das moléculas através de uma fonte de dessorção (feixe de laser) que recai sobre uma solução ácida alcoólica de amostra associada a uma substância matriz, a qual é responsável por absorver a radiação e a transferir para a amostra. Por sua vez esta converte uma substância sólida ou líquida não volátil em iões gasosos e sua lenta evaporação permite que a amostra cristalize lentamente e que as suas proteínas sejam desta forma distribuídas uniformemente sob a superfície da sonda (Castaño, Juanes *et al.* 2016, Engel, Prabutzki *et al.* 2022). Assim, quando o pulso de laser de alta energia atinge a amostra, que idealmente consiste apenas em co-cristais da matriz e do analito,

a sua energia é absorvida principalmente pela matriz que é vaporizada, transportando moléculas de analito intactas numa fase gasosa. Durante o processo de expansão desta nuvem de gás, os iões (por exemplo,  $H^+$  e  $Na^+$ ) são trocados entre a matriz e o analito. De notar que nesta fase a escolha da matriz, que está presente em grande excesso relativamente à quantidade de analito (recomendado um excesso de 100 a 100.000 vezes), revela-se essencial para o sucesso da técnica (Castaño, Juanes *et al.* 2016, Engel, Prabutzki *et al.* 2022).

(ii) Matriz de absorção: A seleção da matriz é crucial no sucesso experimental da técnica, uma vez que uma correta seleção leva à incorporação do analito e formação de cristais de forma mais adequada (Marvin, Roberts *et al.* 2003). Trata-se de uma substância orgânica de baixa massa molecular, miscível com a amostra e capaz de absorver a energia do laser. Derivados do ácido ciânico são frequentemente utilizados, como por exemplo o  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinamico ácido por serem solúveis em solventes orgânicos tais como acetilnitrilo e ácido trifluoroacético (Castaño, Juanes *et al.* 2016). A sua lenta evaporação permite não só o desenvolvimento de cristais homogêneos do analito permitindo que as proteínas se encontrem melhor distribuídas do que quando são colocadas diretamente na superfície da sonda (Vorm, Roepstorff *et al.* 1994, Castaño, Juanes *et al.* 2016) mas também uma melhor eficiência de ionização do mesmo (Simke, Fischer *et al.* 2022).

(iii) Deteção de tempo de voo: Após a ionização, os iões resultantes são acelerados por um campo elétrico e direcionados em direção ao espectrómetro de massa. O detetor utilizado é o TOF, o qual se baseia no princípio de que partículas com a mesma energia cinética, mas massas diferentes, percorrerão diferentes distâncias num determinado tempo. Os iões gerados geralmente possuem carga única (positiva) e ao sofrerem ionização adquirem uma energia cinética. A maioria dos iões, como referido anteriormente, são de carga única daí que os seus restantes parâmetros como a massa e a carga permaneçam constantes. Assim, a relação massa / carga ( $m / z$ ) é normalmente resultante da massa iónica. De notar que para iões que apresentam a mesma energia cinética a sua velocidade variará em proporcionalidade inversa à sua massa. Portanto, partículas maiores migram de forma mais lenta que partículas mais

pequenas. No analisador de massa (TOF) ocorre a aceleração dos iões por ação de um pulso elétrico que os separa de acordo com o tamanho ao longo de um tubo de vácuo para um detetor na extremidade desse tubo (Fenselau and Demirev 2001, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Oviano and Bou 2019). O tempo que leva para os iões percorrerem o caminho até o detetor, como referido anteriormente, é proporcional à sua massa, permitindo a identificação e *análise* da composição molecular da amostra. Assim, partículas maiores, com menor velocidade, levarão mais tempo para percorrer todo o tubo e chegarão ao detetor mais tarde do que partículas menores. O analisador de massa ideal é aquele capaz de distinguir entre pequenas diferenças de massa e também aquele que é capaz de permitir a passagem de um número suficiente de iões para produzir uma corrente facilmente mensurável. Posteriormente, o computador associado ao EM recebe essa informação e gera um espectrograma, ou seja, um gráfico onde a abundância dos picos de cada espécie iónica é representada tendo em conta a sua relação massa / carga. O pico mais alto é conhecido como pico base e recebe um valor relativo de 100%. A intensidade dos restantes picos será determinada por comparação da intensidade do pico base, o ião não fragmentado é denominado ião molecular. A referir, que os espectros de massa podem ser adquiridos automaticamente, um método que oferece maior desempenho, mas é menos reproduzível, ou manualmente, onde o utilizador da tecnologia pode especificar valores limite de vários parâmetros, como número de disparos, intensidade do pico base, limite mínimo, resolução, relação sinal-ruído, seleção de faixa de pico de massa, etc. Tudo isso é necessário no algoritmo de aquisição do espectro (Zhang, Borrer *et al.* 2014)

Um esquema simplificado dos processos que ocorrem num espectrómetro de massa MALDI-TOF é representado na Figura 3 (Engel, Prabutzki *et al.* 2022).

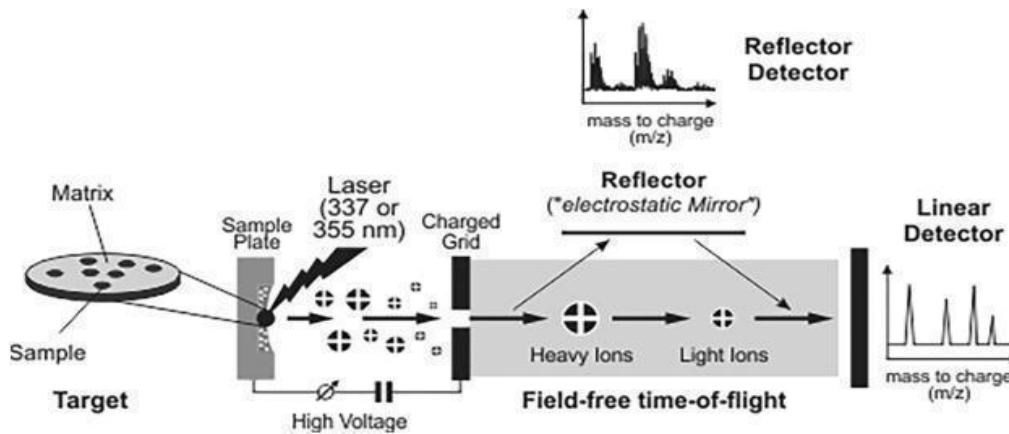


Figura 3 - Esquema representativo da técnica MALDI-TOF (Engel, Prabutzki et al. 2022).

No que concerne à microbiologia, para a identificação de microrganismos são utilizados péptidos/proteínas carregados positivamente com massa molecular entre 2.000 e 20.000  $m/z$  (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Vrioni, Tsiamis *et al.* 2018). A sequência e o tamanho das proteínas ribossômicas são altamente conservados entre diferentes espécies bacterianas e, portanto, são utilizadas para identificar tipos individuais de bactérias. Para permitir a identificação rápida, precisa, fácil e confiável do microrganismo, é necessário preparar de forma correta a amostra. A maioria das amostras bacterianas são separadas e cultivadas em meio sólido, sendo uma única colônia selecionada e espalhada diretamente formando uma película fina na matriz do MALDI, utilizando o ácido ciano-4-hidroxicinâmico como matriz (este solvente é capaz de extrair proteínas da maioria das bactérias). No entanto, *Mycobacterium spp.* e fungos filamentosos geralmente requerem métodos de extração em várias etapas para garantir a qualidade do proteoma biológico. O método de extração etanol-ácido fórmico é sugerido para remover a cápsula destas espécies. No caso de urgência clínica, realiza-se a identificação do microrganismo patogênicos diretamente de amostras biológicas (amostras de urina, sangue, exsudados, caldos, etc) (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Bellido and Buitrago 2015, Barberino, Silva *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023). Para este tipo de amostras é necessária uma purificação adicional, de forma a separar o microrganismo patogênico das células

hospedeiras, péptidos e proteínas (Sánchez-Juanes and González-Buitrago 2019).

A técnica MALDI-TOF oferece vantagens significativas, como alta sensibilidade, velocidade de *análise*, capacidade de identificação de múltiplos analitos e requer apenas pequenas quantidades de amostra. Assim sendo, é uma técnica amplamente utilizada em diversas áreas, como proteômica, *análise* de lípidos, controle de qualidade, e diagnóstico clínico. As aplicações clínicas do EM MALDI-TOF para isolados bacterianos está a aumentar constantemente, desde a identificação de espécies e bacteremia, às aplicações mais promissoras no futuro: detecção de resistência antimicrobiana e tipagem microbiana para estudos epidemiológicos (Karas and Hillenkamp 1988, Ferreira, Vega *et al.* 2010, Bellido and Buitrago 2015, Castaño, Juanes *et al.* 2016).

## 2.5 MALDI-TOF E TIPAGEM MICROBIANA

Os laboratórios de microbiologia clínica assumem atualmente um papel crucial na identificação de microrganismos em amostras clínicas uma vez que a identificação de espécies bacterianas pode orientar a antibioterapia na maioria das doenças infecciosas. Historicamente a confirmação da identificação microbiana depende de uma serie de metodologias convencionais nomeadamente: Metodologia baseada na coloração e morfologia; Crescimento microbiológico em meio de cultura; Técnicas bioquímicas e antigénicas com consequente *análise* bioquímica e metabólica dos microrganismos e Testes de sensibilidade antimicrobiana (Clark, Kaleta *et al.* 2013, Jang and Kim 2018). No entanto, nas últimas décadas, alguns destes testes não têm apresentado desenvolvimentos tecnológicos significativos e continuam a basear-se em princípios e evidências que requerem o crescimento do microrganismo, o que faz com que a identificação possa ser atrasada de horas a várias semanas após o recebimento da amostra. Além disso, estas técnicas continuam a apresentar óbvias limitações de aplicabilidade e fiabilidade sobretudo no que concerne a microrganismos que crescem com dificuldade, ou não crescer em todos os meios



de cultura, ou apresentam uma atividade bioquímica limitada (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Jang and Kim 2018, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021).

Neste contexto, a EM MALDI-TOF surge atualmente na prática clínica como um importante aliado na identificação de uma ampla gama de isolados bacterianos clínicos com diferentes condições de cultura. Trata-se de um método que permite a identificação bacteriana com uma alta fiabilidade e num curto período de tempo. (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Bellido and Buitrago 2015, Hou, Chiang-Ni *et al.* 2019, Haider, Ringer *et al.* 2023, Andrew E. Clark, Kaleta *et al.* 2013). Neste sentido, nos últimos anos vários estudos tem sido publicados demonstrando a eficácia da tecnologia MALDI-TOF para identificar estirpes bacterianas isoladas de amostras clínicas (Clark, Kaleta *et al.* 2013, Hou, Chiang-Ni *et al.* 2019) sendo que muitos deles avaliam a sua eficácia quando comparada aos métodos convencionais e outros avaliam-na quando comparada com os métodos moleculares, esses sim considerados métodos de referência na identificação bacteriana.

Esta tecnologia distingue assim uma grande variedade de microrganismos, entre os quais os microrganismos patogénicos mais frequentes, como bactérias gram positivas, Bacilos gram negativos fermentadores e não fermentadores, bactérias anaeróbias, leveduras e fungos filamentosos. De referir que as proteínas ribossomais de todas estas bactérias apresentam valores de massa na ordem de 2.000 a 20.000 Da, e estão carregadas positivamente, o que favorece a sua medição com a EM MALDI-TOF e confere ainda maior robustez à identificação (Mellmann, Cloud *et al.* 2008). Desta forma, percorrendo a bibliografia é possível suportar o anteriormente descrito uma vez que vários estudos evidenciam a eficácia desta tecnologia nos grupos de microrganismos referidos. Vejamos, em 2009 Ulrich Eigner e seus colaboradores analisaram 1116 isolados clínicos e 108 “*American Type culture collection*” (ATCC) por EM MALDI-TOF verificando que foram corretamente identificadas 93,5% das estirpes ATCC e 95,2% dos isolados clínicos, sendo que os resultados foram comparados aos sistemas convencionais de identificação fenotípica e as discrepâncias resolvidas por sequenciação de 16 S rDNA. As corretas identificações foram superiores a 90% no caso de Enterobacterales (95,5%), *Staphylococcus* (99,5%), *Enterococcus* (100%) e *Streptococcus* (93,7%),

e apresentaram valores inferiores para bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) (79,7%) (Eigner, Holfelder et al. 2009). Em outra avaliação prospectiva, incluindo 980 (bactérias e leveduras), o desempenho geral da EM MALDI-TOF para a identificação correta das espécies, foi significativamente melhor do que os sistemas convencionais (92,2% e 83,1%, respectivamente), observada em 97,7% das Enterobacteriales, 92% dos BGN-NF, 94,3% dos *Staphylococcus* e 84% *Streptococcus*. O EM MALDI-TOF, produziu menos identificações incorretas para o género. A não identificação de algumas linhagens por EM MALDI-TOF, foram claramente associadas com a falta de espectros, a partir de estirpes de referência, no banco de dados de EM MALDI-TOF (Veen, Claas et al. 2010). Esta tecnologia permitiu ainda identificar com uma precisão 84,1% das 1660 estirpes testadas (Seng, Drancourt et al. 2009), e 95,2% em 1116 isolados de rotina em outros estudos. (Eigner, Holfelder et al. 2009). Seguiram ainda vários estudos, a destacar Rychert et al. que no seu estudo apresentou 92,8% (1.063/1.146) de identificação correta ao nível de espécie e 95,5% (1094/1146) ao nível de género (Rychert, Burnham et al. 2013, Haider, Ringer et al. 2023). Além disso, Garner et al. mostraram que a identificação de isolados Gram-negativos anaeróbios foi de 90,9% para o nível de espécie e 92,5% para o nível de género (Garner, Mochon et al. 2014, Haider, Ringer et al. 2023). No grupo de identificação de bactérias anaeróbias, em 2012 um estudo publicado demonstrou 34 discrepâncias de identificação ao nível das espécies entre a identificação bioquímica e a EM MALDI-TOF e em 32 casos, a sequência de 16S rRNA corroborou a identificação da EM MALDI-TOF. Quando a sequenciação do gene 16S rRNA foi utilizado como referência, verificou-se que a falta de concordância se devia mais a imprecisões dos métodos bioquímicos convencionais do que a imprecisões da EM MALDI-TOF (Vega-Castaño, Ferreira et al. 2012). Outro grupo com características particulares do ponto de vista de identificação são os fungos. Em geral, os dados disponíveis mostram excelentes resultados na identificação de leveduras, enquanto os resultados com fungos filamentosos são mais irregulares (Ferreira, Sánchez-Juanes et al. 2011, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa et al. 2017). Evidências demonstram assim que a eficácia alcançada no caso de bactérias gram-negativas e leveduras é, na maioria dos casos, excelente, enquanto que em bactérias gram-positivas e

bactérias anaeróbias a sua eficácia é menor (Ferreira, Vega *et al.* 2010, Mingorancea, Regueiro *et al.* 2016).

Atualmente os estudos incidem sobretudo na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana e na identificação de microrganismos a partir de amostras clínicas como urinas e hemoculturas. No que respeita a identificação a partir de amostras de urinas destaca-se o estudo desenvolvido por Sanchez-juanes e seus colaboradores em 2017 que identificou através da EM MALDI-TOF os principais agentes etiológicos das infeções urinarias obtendo no caso das *Enterobacterales* uma sensibilidade superior a 80% (Sánchez-Juanes, Señán *et al.* 2018). No que respeita aos estudos associados às amostras de hemocultura e à identificação de microrganismos causadores de bacteremias serão abordados posteriormente dado esta patologia estar na base deste trabalho de investigação.

Em suma, a EM MALDI-TOF é considerada um método altamente preciso e apropriado para identificação microbiana a partir sobretudo de placas de cultura tratando-se de uma técnica clínica poderosa que substitui a bioquímica convencional anterior ou sistemas de identificação molecular. Estes últimos são comprovadamente considerados padrão ouro na identificação bacteriana, mas tratam-se de métodos que não são práticos para o uso em rotina laboratorial não só devido à complexidade dos seus procedimentos, mas também devido aos altos custos que lhe estão associados. A técnica molecular mais utilizada, como evidenciado pelos estudos acima mencionados, é a sequenciação do gene 16S rRNA que pode ser utilizada para identificar bactérias não cultiváveis presentes em amostras clínicas, amplificando e analisando os genes 16S rRNA, esta *análise* pode ser usada em conjunto com a EM MALDI-TOF para melhor identificação de bactérias alvo (Jenkins, Ling *et al.* 2012, Schröttner, Gunzer *et al.* 2016, Jang and Kim 2018). A EM MALDI-TOF como método de tipagem microbiana apresenta, no entanto, algumas limitações, nomeadamente como referem os investigadores Munoz Bellido J.L e Gonzáles Buitrago J.M que defendem que a EM MALDI-TOF tem, a priori, uma desvantagem quando se trata de identificação direta de amostras clínicas: embora possa ser um método de diagnóstico muito específico, não é um método particularmente sensível, uma vez que requer uma quantidade considerável de proteína para obter perfis confiáveis. Isto

significa que, em numerosas amostras em que a concentração de microrganismos ou a quantidade de amostra que pode ser obtida são pequenas (LCR, fluido articular, líquido peritoneal, etc.), a sua sensibilidade é baixa (Bellido and Buitrago 2015). Existe a possibilidade de minimizar pelo menos parcialmente essa limitação por meio de uma pequena incubação em meios líquidos, o que aumentaria significativamente a sua sensibilidade e ainda significaria uma economia significativa de tempo no diagnóstico (Bellido and Buitrago 2015), facto desenvolvido neste trabalho de investigação que tem por objetivo o desenvolvimento de um método rápido e eficaz para a identificação de microrganismo patogénicos associados a infeções por cateteres. Para isso, utilizou-se um caldo enriquecido (Todd Hewitt Broth) de forma a potenciar o crescimento dos microrganismos causadores deste tipo de infeções e depois sim recorreu-se á EM MALDI-TOF. Desta forma, fatores como o tipo de meio de cultura , a atmosfera de cultura bacteriana, o número de disparos de laser aplicados e a média dos espectros por medição podem também interferir na qualidade dos resultados e, portanto, na identificação adequada da amostra (Cuénod, Foucault *et al.* 2021, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021) . Um grupo de investigadores, por exemplo, demonstrou que o uso de meios de cultura cromogénicos contribuem para um diagnóstico rápido por EM MALDI-TOF de bactérias e fungos uma vez que acelera o diagnóstico, facilitam a deteção de culturas mistas e permite o diagnóstico rápido de espécies resistente (Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017). Entende-se também, no que concerne á identificação de populações mistas de bactérias provenientes de infeções polimicrobianas que o sistema EM MALDI-TOF é limitado uma vez que os algoritmos convencionais projetados para identificar microrganismos a partir de uma única colónia pura não têm a capacidade de classificar com segurança microrganismos de uma cultura bacteriana mista (Wang, Zhang *et al.* 2013, Jang and Kim 2018). No entanto estudos, como o anteriormente descrito, relataram um novo método para a identificação de amostras polimicrobianas de um único espectro (Mahe, Arsac *et al.* 2014, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017). Outra limitação associa-se á dificuldade para a diferenciar *Shigella* e *E. coli*, *Bordetella pertussis* e *B. bronquioseptica*, *Achromobacter xylosoxidans* e *A. ruhlandii*, bem como *Bacteroides nordii* e *B. salyersiae*

(Florio, Tavanti *et al.* 2018, Hou, Chuan *et al.* 2019). A maioria dessas espécies bacterianas pode ser identificada utilizando os espectros de referência. No entanto, um pequeno número destas estirpes, devido há grande semelhança do fundo genético ou ampla diversidade interespecies não podem ser distinguidos pelo sinal de EM. Para fungos filamentosos, a falta de espectros de referência também limitam a suas identificações por EM MALDI-TOF na medida em que estes microrganismos apresentam uma heterogeneidade proteica muito elevada, o que limita a construção de bases de dados fiáveis, e tratam-se de microrganismos de difícil recolha (Bellido and Buitrago 2015, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023). As atualizações contínuas dos bancos de dados espectrais e melhoramento da preparação das amostras serão dois aspetos fundamentais para aumentar a aplicabilidade desta tecnologia no futuro (Bellido and Buitrago 2015, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023) uma vez que atualmente os bancos de dados espectrais são da propriedade das casas comerciais que detém os equipamentos, o que se torna uma desvantagem quando comparados aos bancos de dados de ácidos nucleicos como o BLAST, que são públicos e de uso livre, mas também mais facilmente sujeitos a introduções e alterações erradas. Já os bancos de dados proteómicos, por ora, são mais cuidados e melhor avaliados antes de serem atualizados. A atualização, aliás, é permanente e faz parte dos contratos de uso dos equipamentos. A referir que o uso crescente desta tecnologia por laboratórios de microbiologia conduziu á necessidade de desenvolvimento de um controlo de qualidade para a identificação de diferentes microrganismos por parte de algumas entidades reguladoras. Por exemplo, a Sociedade Espanhola de Doenças *Infecciosas* e Microbiologia Clínica nos últimos anos tem enviado controlo de *Pseudomonas aeruginosa* e outro de *Clostridium subterminale* e segundo os últimos dados a percentagem de laboratórios que utilizaram a EM MALDI-TOF para identificar esses microrganismos aumentou de 19,6% (48 centros) para 32,8% (71 centros) (Cantón and García-Rodríguez 2016). Por último é importante referir que outra das limitações atuais e iniciais da tecnologia MALDI-TOF é a sua aplicabilidade para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana, no entanto trata-se de um tema em desenvolvimento e com inúmeros trabalhos de investigação

associados. Desta forma, a EM MALDI-TOF oferece assim uma solução promissora para encurtar o tempo de resposta do exame microbiológico permitindo aos clínicos um uso adequado da antibioterapia e uma consequente diminuição de custos associados aos cuidados de saúde (Bellido and Buitrago 2015, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021, Haider, Ringer *et al.* 2023)

## 2.6 O USO DA EM MALDI-TOF NO DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE BACTERÉMIAS

O termo bacteremia refere-se a bactérias viáveis no sangue. Trata-se de um fenómeno de grande relevância clínica, em que o laboratório de microbiologia assume um papel preponderante no seu diagnóstico (Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018) uma vez que a rápida identificação dos seus agentes etiológicos é essencial para a escolha adequada da antibioterapia e fundamental para aumentar a eficácia do tratamento. A hemocultura representa assim a melhor forma de estabelecer a etiologia dessas infeções (Haider, Ringer *et al.* 2023).

Nos últimos anos, a tecnologia MALDI-TOF tem-se mostrado muito útil no diagnóstico de bacteremia, sendo uma das tecnologias mais promissoras atualmente disponíveis para identificar os microrganismos causadores desta patologia. A utilização desta tecnologia para identificação de bactérias geralmente requer uma abundância bacteriana acima de um certo limite e por isso este método é frequentemente utilizado após a confirmação da formação da colónia em meio de cultura. Todavia, nos casos em que são necessários resultados rápidos, é possível realizar EM MALDI-TOF assim que a hemocultura seja considerada positiva (Lamy, Sundqvist *et al.* 2020 ). Trata-se de um método de diagnóstico rápido, atingindo um valor preditivo positivo de 60-80% para diferentes espécies de microrganismos (Dubourg, Raoult *et al.* 2019). No entanto, não se trata de uma metodologia com um protocolo único e validado, uma vez que oferece ainda algumas limitações, embora os protocolos já existentes se centrem em tentar eliminar as substâncias que interferem no

processo e limitam a identificação bacteriana (Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021). Estudos alertam para a necessidade de uma alta carga bacteriana para obter um espectro aceitável, para além da alteração dos espectros proteicos devido a interferências do meio de cultura pela presença de proteínas humanas, células sanguíneas e ainda pela presença de carvão no frasco de hemocultura (Stevenson, Drake *et al.* 2010, Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Haider, Ringer *et al.* 2023). Desta forma e uma vez que estas amostras clínicas contêm múltiplas proteínas em grandes quantidades que não são provenientes de bactérias, são necessárias etapas de pré-tratamento, para separar as células sanguíneas e obter seletivamente as células bacterianas (Hou, Chiang-Ni *et al.* 2019, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021). A separação dos microrganismos das células hospedeiras é uma etapa crítica para o sucesso da identificação por EM MALDI-TOF (Faron, Buchan *et al.* 2017, Lamy, Sundqvist 2020 ). Atualmente, existem três protocolos comerciais atualmente disponíveis para a identificação de microrganismos a partir de frascos de hemoculturas: (i) kit Sepsityper® (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) (Schubert, Weinert *et al.* 2011), (ii) kit de hemocultura VITEK® MS (bioMérieux, Budapeste, Hungria) (Fothergill, Kasinathan *et al.* 2013) e (iii) Kit rápido BACpro® II (Nittobo Medical Co., Tóquio, Japão) (Yonezawa, Watari *et al.* 2018). Estes protocolos envolvem o pré tratamento da amostra com o objetivo de reduzir as limitações anteriormente descritas e são eles : (i) sedimentação gradual de células sanguíneas e microrganismos; (ii) centrifugação a baixa velocidade para remoção de células sanguíneas, seguida por um procedimento de lise adicional; (iii) remoção de células sanguíneas usando tubos separadores de soro; (iv) uso de saponina ou e dodecil sulfato de sódio (SDS) para lisar as células sanguíneas. São vários também os estudos que têm comparado a eficácia de cada um destes protocolos (Florio, Tavanti *et al.* 2018, Luethy and Johnson 2019).

Em relação á identificação de microrganismos, o especto tecnicamente mais problemático é a identificação de cocos gram-positivos; existem muitos estudos que mostram protocolos e resultados muito discrepantes tanto na sensibilidade quanto na especificidade dependendo dos procedimentos utilizados e dos critérios estabelecidos para considerar uma identificação correta (Schulthess, Brodner *et al.* 2013, Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016,

Barberino, Silva *et al.* 2017, Luethy and Johnson 2019, Lamy, Sundqvist *et al.* 2020 ). A correta identificação das *Enterobacteriales* é realizada em quase todos os casos. A capacidade do EM MALDI-TOF para a identificação correta de bacilos gram-negativos não fermentadores é um pouco menor quando comparado com os outros (Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Arroyo and Denys 2017). Da mesma forma, é muito útil identificar leveduras diretamente na hemocultura, mas apresenta melhores resultados com *Candida albicans* em relação à identificação de outras espécies de leveduras (Schubert, Weinert *et al.* 2011, Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Idelevich, Grunewald *et al.* 2014) Esta técnica é também especialmente útil na identificação de microrganismos cuja cultura é difícil ou lenta (bactérias anaeróbicas, *Actinomicetales*, bacilos gram-negativos de crescimento lento, etc.)(Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Haider, Ringer *et al.* 2023). Pelo contrário, apresenta muitas limitações na identificação de bacteremias polimicrobianas, embora existam diferenças dependendo dos procedimentos utilizados (Altun, Botero-Kleiven *et al.* 2015, Lamy, Sundqvist *et al.* 2020). De referir, que é necessário um mínimo de 10<sup>6</sup> UFC/mL de bactérias para identificar bactérias de forma confiável em frascos de hemocultura por EM MALDI-TOF (Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021).

Resumidamente, a aplicação da EM MALDI-TOF na identificação de bacteremia tem contribuído para melhorar o controlo clínico da bacteremia, permitindo a administração de tratamento antimicrobiano direcionado de forma mais rápida e precisa (Luethy and Johnson 2019, Miller, Atrzadeh *et al.* 2019). Permite ainda reduzir as taxas de mortalidade e morbidade que lhe estão associadas além de contribuir para a prevenção do desenvolvimento de resistência antimicrobiana. A tecnologia EM MALDI-TOF tem assim demonstrado ser claramente efetiva quando se avalia o tempo de internamento do paciente mesmo quando se verifica uma inversão inicial associado ao custo do equipamento (Oviano and Bou 2019). De notar que, se associarmos o investimento á redução do tempo de internamento reduzindo consequentemente a possibilidade de uma infeção e a taxa de incidência de estirpes multirresistentes o custo do equipamento torna-se irrelevante (Cantón and Pedrosa 2017).



A referir, no que respeita a aplicabilidade da EM MALDI-TOF às bacteremias provocadas por CVC será um tema ainda abordado e discutido ao longo dos próximos capítulos deste trabalho de investigação.



# **CAPÍTULO II - JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DE ESTUDO**

## JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DE ESTUDO

A dificuldade de diagnosticar as infeções associadas ao uso de cateteres venosos centrais (CVC) é um dos problemas com que muitos clínicos se deparam (Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018 Ahn, Kim *et al.* 2023). Essa avaliação baseia-se inicialmente na suspeita clínica de infeção por alterações do local de inserção da ponta do cateter seguido de sinais sistémicos. Desta forma, os critérios clínicos para o diagnóstico de infeções associadas a CVC são pouco sensíveis e específicos o que significa uma remoção, muitas vezes desnecessária, de um grande número de dispositivos, carecendo sempre do diagnóstico laboratorial para confirmação da infeção (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Blot, Poulakou *et al.* 2019, Ahn, Kim *et al.* 2023).

Neste contexto, surge a pertinência deste trabalho de investigação, uma vez que de um diagnóstico laboratorial impreciso ou perdido surgem consequências graves que vão desde complicações do procedimento, ao aumento da morbilidade, da mortalidade e dos custos associados à prestação de cuidados de saúde (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019). Repare-se que nos últimos anos têm existido muitos progressos na epidemiologia e patogénese destas infeções e com contribuições importantes na área do diagnóstico e manipulação (Ong, Bonten *et al.* 2015 , Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019, Osório, Oliveira *et al.* 2023, Ahn, Kim *et al.* 2023). No entanto, surge a crescente necessidade do desenvolvimento de um método rápido para identificação de microrganismos patogénicos deste tipo de infeções sobretudo devido ao facto das bacteremias relacionadas com os cateteres vasculares (BRCV) se encontrarem entre as infeções hospitalares mais comuns. Estima-se que 15 a 30% de todas as bacteremias nosocomiais estejam relacionadas ao uso destes dispositivos intravasculares.

Atualmente, vários são os estudos que reportam a utilização e comparação de métodos quantitativos e semi-quantitativo para o diagnóstico laboratorial de bacteremias associadas a CVCs, no entanto, verifica-se uma

tendência crescente de se optar por técnicas de diagnóstico mais rápidas sobretudo quando os métodos convencionais apenas providenciam resultados 18 a 24 horas após a cultura microbiológica. Neste sentido, a EM MALDI-TOF surge como uma promissora novidade aos procedimentos de diagnósticos de Microbiologia Clínica, e quase sem solução de continuidade, um procedimento completamente integrado na atividade clínica diária.

Nos últimos anos numerosos são os estudos que demonstraram as vantagens da EM MALDI-TOF para a identificação bacteriana. Na verdade, as limitações da EM MALDI-TOF quase sempre residem mais na integridade dos bancos de dados de referência do que na capacidade do método de obter perfis confiáveis de um microrganismo. O mesmo acontece com as leveduras, como demonstram estudos referidos ao longo deste trabalho de investigação (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017). No caso dos fungos filamentosos os resultados não são tão favoráveis, mas esta limitação parece estar associada à heterogeneidade dos perfis proteicos gerados por um fungo filamentoso ao longo do seu desenvolvimento, e à incapacidade das bases de dados, até agora, para recolhê-las. Assim, o uso desta tecnologia tem gerado muito interesse devido à sua utilidade clínica (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Bellido and Buitrago 2015, Barberino, Silva *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023). Essa utilidade passa por poder ser utilizada diretamente em amostras clínicas principalmente uroculturas e em hemoculturas. No primeiro caso, tem sido utilizado combinado com diferentes métodos de diagnóstico de infeção urinária com resultados satisfatórios. No caso da sua utilização em hemoculturas positivas, as percentagens de identificação direta são elevadas, sobretudo em bactérias Gram negativas, e a orientação terapêutica imediata que permite é sem dúvida o seu contributo mais valioso. De notar que, a tecnologia MALDI-TOF tem, a priori, uma desvantagem para a sua utilização global em amostras diretas: embora possa ser um método de diagnóstico muito específico, não é um método particularmente sensível, uma vez que requer uma quantidade considerável de proteína para obter perfis fiáveis. Isto significa que, em muitas amostras nas quais a concentração de microrganismos ou a quantidade de amostra que pode ser obtida é pequena (LCR, líquido articular, líquido

peritoneal), a sua sensibilidade é baixa. Existe, no entanto, a possibilidade de superar esta limitação, pelo menos parcialmente, através de uma curta incubação em meio líquido, o que aumentaria significativamente a sua sensibilidade e continuaria a significar uma poupança significativa de tempo no diagnóstico (Bellido and Buitrago 2015). Desta forma e embora faltem estudos que sistematizem estes protocolos, é possível que esta estratégia ofereça valores de sensibilidade mais atrativos, com ganho de rapidez ainda considerável. Assim, se a hipótese proposta revelar um novo método automatizado, simples, robusto, de baixo custo e com capacidade de discriminação e reprodutibilidade semelhante às técnicas convencionais, mesmo que apenas para alguns grupos de microrganismos, estaremos diante de um avanço importantíssimo no diagnóstico destas infeções sobretudo porque contribuirá para a orientação de decisões clínicas, decisões essas que se irão refletir em melhores resultados em saúde, bem como na redução de custos associados a este tipo de infeções.

O objetivo principal deste estudo foi desenvolver um método que permita um diagnóstico etiológico rápido da infeção do cateter, com sensibilidade e especificidade pelo menos semelhantes aos métodos de cultura, mas com velocidade semelhante aos métodos de coloração.



# **CAPÍTULO III - MATERIAL E MÉTODOS**

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 LOCAL DO ESTUDO**

Este estudo foi realizado no Serviço de Patologia Clínica (SPC) do Hospital Sousa Martins (HSM), inserido na Unidade Local de Saúde da Guarda (ULSG) em parceria com a Unidade de Proteómica (UP) inserida no Instituto de Investigação Biomédica de Salamanca (IBSAL) da Universidade de Salamanca, sendo a ULSG uma organizações de vanguarda e de referência na prestação de cuidados de saúde à comunidade e a UGP uma unidade de referência internacional no campo da investigação da expressão de proteínas.

### **3.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Este estudo consistiu na avaliação/diagnóstico microbiológico de 105 pontas de cateteres retirados de indivíduos internados nos serviços da ULSG, com suspeita de infeção associada a CVC e respetivas hemoculturas. A amostra foi recolhida ao longo de 5 anos (2018-2023).

#### **3.2.1 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos neste estudo dispositivos intravasculares retirados de 105 indivíduos com suspeita clínica de infeção associada ao CVC e respetiva confirmação laboratorial segundo as normas e padrões estabelecidos pelo CDC para este tipo de infeções. Constituíram critérios de exclusão, atendendo aos critérios definidos para o diagnóstico de ICSRC pelo CDC (O'Grady, Alexander *et al.*2011), todas as amostras de indivíduos que apresentavam suspeita de infeção, mas aos quais não foram colhidas e enviadas ao Serviço de Microbiologia hemoculturas de sangue periférico juntamente com o dispositivo intravascular.

### 3.3 COLHEITA DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS

Assepticamente e antes da administração de antimicrobianos, o CVC foi removido e a sua porção terminal foi cortada (aproximadamente 5 cm), sendo colocada num recipiente estéril de boca larga. A acompanhar este dispositivo intravascular uma garrafa de hemocultura obtida a partir de uma veia não cateterizada, localizada distalmente ao ponto de inserção do cateter. De forma a assegurar uma maior positividade as hemoculturas foram colhidas fora do pico febril do indivíduo (O'Grady, Alexander *et al.*2011).

### 3.4 PROCESSAMENTO DOS PRODUTOS BIOLÓGICOS

O processamento laboratorial ocorreu 30 minutos após a colheita e todas as amostras foram processadas segundo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e também segundo as normas padronizadas internamente pelo Serviço de Microbiologia do SPC, cumprindo-se as disposições legais que regulam a utilização dos produtos biológicos de origem humana (Diário da República - I serie A, nº 18, de 26 de janeiro de 2005).

O diagnóstico microbiológico da ponta do cateter foi realizado pelos métodos de diagnóstico semi-quantitativo e quantitativo.

#### 3.4.1 Detecção de colonização extraluminal (Método semi-quantitativo/*Maki*)

A ponta distal do cateter foi colocada na superfície de uma gelose de sangue (Gelose de Columbia com 5% de Sangue de Carneiro (GS, (Biomérieux® 2023), #30), e com o auxílio de uma pinça estéril foi efetuado o seu deslizamento, rolando pelo menos 4 vezes sobre a superfície da placa. Posteriormente a placa foi incubada 24 a 48 horas a 37°C em condições



aeróbias. Após incubação as colónias foram quantificadas, com base nos critérios padronizados pelo CDC e pelos critérios vigentes nos procedimentos operativos do Serviço de Microbiologia do SPC (ULSG.SPC.PO.002.00). O ponto de corte estabelecido foi de 15 UFC/placa permitindo assim distinguir entre a origem da infeção e colonização (Maki, Weise *et al.* 1977, O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Almirante and Pahissa 2013, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018).

#### **3.4.2 Detecção de colonização intralumial (Método quantitativo/Sonicação)**

Introduziu-se a ponta do cateter em 10 ml de caldo de Todd Hewitt Broth (BD® 2023), #221714), sonicou-se durante 1 minuto a 40KHz e 125W (BANDELIN® Bactosonic, #3291), seguindo-se agitação com vortex (IKA® Vortex 4 digital, #14019) durante 15 segundos. Posteriormente foi preparada uma diluição de 1:100 em soro fisiológico e procedeu-se à sua homogeneização. Do caldo original e da diluição de 1:100 procedeu-se à inoculação de uma GS efetuando a técnica de sementeira quantitativa, sendo a cultura incubada durante 18 a 24 horas a 37°C, e em aerobiose. O ponto de corte estabelecido foi  $\geq 10^2$  UFC/segmento permitindo assim distinguir entre a origem da infeção e colonização (O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Gominet, Compain *et al.* 2017, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018). Incubou-se o caldo Todd Hewitt Broth (BD® 2023), #221714) sonicado e ao fim de 6 horas de incubação (t=6h) retirou-se uma pequena quantidade para um tubo cónico de 1,5 µL (Eppendorf®, #0030120086) para posterior análise por EM-MALDI-TOF.

#### **3.4.3 Hemocultura**

A garrafa de hemocultura (BD® 2023), #442193) foi incubada durante 5 dias no sistema automatizado de deteção microbiana BD BACTEC™ (BD® 2023), #442296), sendo a deteção do crescimento dos microrganismos efetuada através da fluorescência emitida pelo aumento de CO<sub>2</sub> no interior da garrafa (BD® 2023). As hemoculturas positivas foram retiradas do equipamento e após desinfecção da tampa com etanol a 70% procedeu-se à sementeira de uma Gelose de sangue (Gelose de Columbia com 5% de Sangue de Carneiro (GS,

(Biomérieux® 2023), #30), e de uma Gelose Chocolate Polyvitex (PVX, (Biomérieux® 2023)#27) através da técnica qualitativa. As culturas foram incubadas de 18 a 24 horas a 37°C, sendo a GS incubada em aerobiose e o PVX em atmosfera de anaerobiose com 5% de CO<sub>2</sub>, 94% de humidade. Em paralelo, foi também efetuada uma lâmina para coloração de Gram para posterior avaliação microscópica.

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA**

A caracterização fenotípica dos isolados bacterianos foi efetuada com base na avaliação das suas características macroscópicas, microscópicas (Coloração de Gram) e bioquímicas, sendo esta efetuada de forma manual e/ou automatizada.

A caracterização microscópica foi efetuada a partir de uma lâmina corada por coloração de Gram. através do equipamento AEROSPRAY® (AEROSPRAY® GRAM, #7322). Este equipamento baseia-se no princípio das colorações, com a vantagem de fazer a coloração de modo automático. As lâminas coradas foram analisadas por microscopia ótica de fundo claro em objetiva de imersão (100X) (Leica® DM 2000, #0000781).

A caracterização macroscópica foi efetuada com base nas características morfológicas das colónias (forma, tamanho, cor, brilho, capacidade de fermentação, atividade hemolítica).

### **3.6 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA AUTOMATIZADA**

Com o objetivo de identificar os microrganismos de maior relevância presentes nas amostras biológicas utilizou-se as cartas de identificação VITEK® e o equipamento VITEK® 2 Compact (Biomérieux®, #15/30/60).

A carta de Identificação VITEK® 2 baseia-se em métodos bioquímicos estabelecidos e em substratos recentemente desenvolvidos que medem a

utilização da fonte de carbono, atividade enzimática e resistência, sendo assim reconhecido um padrão único de identificação. Se não for reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos ou a estirpe é determinada como estando fora da capacidade da base de dados do sistema (Biomérieux® 2023). Cada carta é constituída por 64 poços de crescimento para testes biológicos e cada poço contém uma suspensão, obtida por secagem ao ar, de um agente bioquímico. Neste sentido, não são necessários reagentes adicionais, pelo que se elimina o risco de omissão ou de erro e de contaminação por parte do operador. De notar que, a utilização e escolha de um tipo da “carta” foi feita tendo em conta a avaliação microscópica e bioquímica. As cartas de identificação utilizadas foram as cartas de GN para a identificação de Gram negativo (Biomérieux®, #21341), GP para a identificação de Gram Positivo (Biomérieux®, #21342), NH (Biomérieux®, #21346), para a identificação de *Neisseria* e *Haemophilus*, YST (Biomérieux®, #21343) para a identificação de leveduras (Biomérieux® 2023).

Para execução das cartas de identificação uma colónia da estirpe a identificar foi suspensa em 3,0 ml de solução salina, homogeneizada a suspensão que foi colocada juntamente com a respetiva carta de identificação na câmara de enchimento do equipamento. A suspensão foi efetuada com base nos requisitos de cultura identificados pelo fabricante para a sua execução. Para a identificação de Gram negativo a suspensão efetuada apresentava uma densidade de 0,50 a 0,63 Padrão McFarland, para Gram positivo 0,50 a 0,63 Padrão McFarland, para a identificação de *Neisseria* e *Haemophilus* 2,70-3,30 Padrão McFarland e para a identificação de leveduras uma densidade de 1,8-3,30 Padrão McFarland (Biomérieux® 2023).

### **3.7 MÉTODOS PROTEÓMICOS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA: EM MALDI-TOF**

Com o objetivo de identificar os microrganismos presentes na amostra de caldo Tood Hewitt Broth ((BD® 2023), #221714) resultante do procedimento de sonicação e após a incubação de 6 horas utilizou-se o sistema de identificação MALDI-TOF/TOF Autoflex III® (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) que recorre a métodos de EM para medir um perfil proteico de um microrganismo sendo reconhecido um padrão único de identificação. Os espectros foram adquiridos com software FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) e depois processado utilizando o software Flex Analysis 3.0 (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha). A tecnologia MALDI consiste na mistura da amostra biológica a ser analisada com uma Solução Matriz de HCCA (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) (Bruker Daltonics®, #8604531) transferindo-a posteriormente para a Placas-alvo MALDI (Bruker Daltonics®, #1840380) que é posterior introduzida no espectrómetro de massa para medição do perfil proteico da amostra. O sistema de identificação MALDI-TOF/TOF Autoflex III® (Bruker® 2023) é verificado automaticamente usando um *Bacterial Test Standard* (BTS) antes de cada uso. O BTS é um extrato de *Echerichia. coli* (Bruker®, #8604530) enriquecido com duas proteínas de alto peso molecular apresentando uma composição específica que abrange toda a faixa de massa de proteínas utilizadas pelo MALDI para identificação precisa de microrganismos.

### 3.7.1 Preparação da amostra

O procedimento consistiu em centrifugar 1,5 ml de caldo do CVC previamente sonicado e após incubação de 6 horas durante 30s a 2000 xg. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado durante 5 min a 15.500 xg de forma a recolher o sedimento bacteriano. Este foi lavado com água de qualidade LC-MS (LiChrosolv®, Millipore) e uma pequena quantidade de bactérias transferida diretamente para os poços da Placas-alvo MALDI (Bruker Daltonics®, #1840380) formando uma fina película.

### 3.7.2 Separação de espécies moleculares conforme sua relação massa/carga

As medições foram realizadas no sistema de identificação MALDI-TOF/TOF Autoflex III® (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) equipado com um feixe de laser de 200 Hz. Os espectros foram gravados no modo linear positivo na frequência de laser 200 Hz dentro de um intervalo de massa de 2.000 a 20.000 Da. Os parâmetros estabelecidos para o espectrômetro foram: Tensão IS1 - 20 Kv; Tensão IS2 - 18,6 Kv; Tensão da lente - 6 kV; Tempo de atraso de extração - 40ns

O protocolo de trabalho MALDI proporciona a acumulação de 500 (100 X 5) disparos de laser em diferentes locais da amostra. Os espectros foram calibrados externamente utilizando uma mistura de calibradores convencionais compreendendo um extrato de *E. coli* DH5a (Bruker®, #8604530) enriquecido com proteínas adicionais (RNase A e mioglobina) para cobrir uma gama de 4 a 17 KDa. As massas de calibração utilizadas foram: RL36, 4364.3Da; RS22, 5095.8Da; RL34, 5380,4 Da; RL33meth, 6254,4 Da; RL32, 6315 Da; RL29,7273.5 Da; RS19, 10299,1 Da; RNaseA, 13682,2 Da; Mioglobina, 16952,5 Da.

### 3.7.3 Análise dos espectros e valorização de resultados

Para a análise automatizada dos dados, os espectros obtidos foram processados com o software MALDI *Biotyper* e *FlexControl 3.0* (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) O *software* realiza a normalização, suavização, extração de linha base e redução de picos criando uma lista de picos com os picos mais significativos do espectro (valores  $m/z$  com uma determinada intensidade, com o limiar de 1% do pico mais alto e um máximo de 100 picos) Uma vez que gerado o espectro é importado para o programa e o processo total de identificação é realizado automaticamente sem a intervenção do utilizador. Para a identificação bacteriana comparou-se cada lista de picos gerada diretamente com bibliotecas de referência (4111 espécies) utilizando o algoritmo de correspondência de padrões integrado do *Biotyper 3.0* (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) Os espectros desconhecidos foram comparados

com uma biblioteca de espectros de referência com base num modelo de reconhecimento de padrões utilizando a posição do pico, as distribuições de intensidade do pico e a sua frequência.

As identificações MALDI-TOF são classificadas em:

1. Confiável em nível de espécie: quando a pontuação na comparação entre o perfil do microrganismo problema e o banco de dados for maior ou igual a 2.

2. Confiável a nível de género: quando a pontuação for maior ou igual a 1,7 e menor que 2.

3. Não confiável: quando a pontuação for inferior a 1,7, neste caso é considerado uma falha na identificação.

Tabela 2 - Pontuação obtida pelo software MALDI Biotyper (Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha)

Score	Identificação
2.300-3.000	Confiável em nível de espécie
2.000-2.299	Confiável em nível de género e de espécie
1.700-1.999	Confiável a nível de género
0.000-1.699	Não confiável

### 3.8 ISOLADOS BACTERIANOS EM ESTUDO

Todas as estirpes foram conservadas a partir de uma cultura pura em criotubos com 1ml de BHI com glicerol a 15%, devidamente identificadas e conservadas a -80°C. Deste modo, é possível preservar as características genotípicas e fenotípicas das estirpes, garantindo-se que as características

permanecem intactas para estudos posteriores, diminuindo-se assim o risco de contaminação bacteriana/fúngica.

### 3.9 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

As variáveis quantitativas foram descritivas através dos valores de média e desvio padrão. As variáveis qualitativas foram descritivas através de frequências absolutas e relativas simples. A avaliação da concordância dos métodos de diagnóstico foi realizada considerando (i) a detecção de picos; e (ii) os microrganismos identificados nas amostras em que a EM MALDI-TOF que confirmou o mesmo agente etiológico da bacteremia identificado por métodos convencionais.

A preparação dos dados foi realizada utilizando o Microsoft Excel (v. 16). A análise estatística dos dados e construção dos gráficos foram realizadas recorrendo ao IBM SPSS v.29.



# **CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

Foram estudados 105 doentes com bacteriemia associada a uma infeção do cateter venoso central (CVC), de acordo com critérios geralmente aceites. Desta forma, todos os doentes tinham um isolado de hemocultura consistente com pelo menos um dos métodos convencionais de estudo da infeção do CVC (Maki ou sonicação).

Dos 105 doentes, 57 (54,3%) eram do sexo masculino e 48 (55,2%) do sexo feminino. A idade média global dos doentes foi de 72,5 + 13,5 anos, sendo de 71,3 + 14,1 anos no sexo masculino (variação: 45-93 anos) e de 73,6 + 12,4 anos no sexo feminino (variação: 47-94 anos).

Os principais serviços de origem foram a Medicina (40 doentes, 38,1%), a UCI (20 doentes, 19,1%), a COVID (18 doentes, 17,1%) e a Cirurgia (12 doentes, 11,4%) (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização da amostra em estudo

	n	%
<b>Idade (M; DP)</b>	72.5	
<b>Género</b>		
Feminino	57	54,3
Masculino	48	45,7
<b>Serviço</b>		
INT - CIRURGIA	12	11,4
INT - COVID	18	17,1
INT - MEDICINA	40	38,1
INT - ORTOPEDIA	5	4,8
INT - PNEUMOLOGIA	10	9,5
INT - UCI	20	19,1

## 4.2 AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DOS CVC: MÉTODOS CONVENCIONAIS

A bacteremia relacionada com o cateter trata-se de uma bacteremia primária que é confirmada sempre que ocorre a detecção do mesmo microrganismo (género, espécie e semelhante resistência antimicrobiana) na cultura da ponta do cateter e em pelo menos uma hemocultura periférica (obtida preferencialmente por punção direta de uma veia periférica), num paciente com suspeita de bacterémia, mas ao qual se excluíram outros diagnósticos etiológicos (Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018).

Neste sentido, como referido anteriormente, de forma a confirmar a suspeita de diagnóstico sobre a amostra estudada procedeu-se a avaliação microbiológica do segmento dos CVC sendo que em todos os cateteres, o isolamento de microrganismos foi conseguido por pelo menos um dos métodos. Desta forma, verificou-se que em 95 casos (90,5%) o isolamento foi conseguido por ambos os métodos, em 8 casos apenas pela técnica Maki (7,6%) e em 2 casos apenas pela técnica de sonicação (1,9%).

Nos 95 casos em que os microrganismos foram detetados por ambos os métodos, a identificação dos microrganismos foi, pelo menos parcialmente, coincidente em todos. No entanto, em alguns casos, a concordância foi apenas parcial. Vejamos, em cinco casos (4,8%), foram detetados dois microrganismos pela técnica Maki e apenas um por sonicação, enquanto que em três casos (2,9%) se verificou o inverso. De notar, que em apenas em dois casos foram isolados três microrganismos diferentes por qualquer um dos dois métodos, e em nenhum destes casos os três microrganismos coincidiram com os isolados obtidos na hemocultura, pelo que o seu significado clínico é discutível.

Da avaliação da colonização das pontas de cateteres verificou-se que foram identificados no total 244 microrganismos pelos métodos convencionais (caracterização fenotípica; identificação bioquímica automatizada - VITEK®2 Compact) dos quais 127 microrganismos (51,6 %) foram isolados pelo Método semi-quantitativo e 117 (48 %) pelo método quantitativo. O número de microrganismos isolados pelo método semi-quantitativo é ligeiramente superior

por este método avaliar apenas a superfície extraluminal, o que representa na maioria das vezes um maior número de isolamento de microrganismos presentes na flora cutânea.

No que respeita aos resultados obtidos pelo método semi-quantitativo verificou-se uma maior predominância da colonização por *Staphylococcus spp*, na medida em que estes representam 46,4% (n=59) do total dos isolados, dos quais 18,9% (n=24) pertenciam a espécie *Staphylococcus epidermidis* e 9,5%(n=12) foram identificados como sendo *Staphylococcus aureus*, os restantes foram classificados como *Staphylococcus coagulase negativo*. Foram também isoladas, 18,9% (n=24) de estirpes de *Klebsiella pneumoniae*, seguindo-se 9,4% (n=12) de *Candida spp*, (das quais 5,5% (n=7) eram *Candida albicans*), 8,7% (n=11) *Pseudomonas aeruginosa* e 5,5% (n=7) dos isolados pertenciam ao género *Enterococcus spp*. (Tabela 4). Pelo método quantitativo a predominância dos isolados foi semelhante, evidenciando também uma predominância das espécies estafilocócicas com percentagens de isolamento de 42 % (n= 50). Verificou-se que 15,1% (n=18) pertenciam a espécie de *Staphylococcus epidermidis*, 10,1 % (n=13) *Staphylococcus aureus*, seguindo-se percentagens semelhantes ao descrito pelo método semi-quantitativo no que respeita às estirpes de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* com, respetivamente, 21,9% (n=26) e 10,9 % (n=13). Quanto ao isolamento de fungos verificou-se igual percentagem de isolamento (n=12) para ambos os métodos.

Desta forma, e sistematizando os resultados tendo em conta os isolamentos por ambos os métodos verificamos que, a espécie mais frequentemente isolada foi *Klebsiella pneumoniae* (24 isolamentos) e do *Staphylococcus epidermidis* (24 isolamentos), seguindo-se *Staphylococcus aureus* (12 isolados) e *Pseudomonas aeruginosa* (11 isolados). No entanto há que considerar, que se consideramos os *Staphylococcus coagulase negativo*, incluindo não só o *Staphylococcus epidermidis* como também outras espécies isoladas que foram identificados apenas a nível de grupo como " *Staphylococcus coagulase negativo* " verificamos que estes representariam 47 e 37 isolamentos, respectivamente para o método semi-quantitativo e quantitativo, o que os torna claramente o grupo de agentes etiológicos mais frequente. Após o grupo heterogéneo dos *Staphylococcus coagulase negativo* e da estirpe *Staphylococcus*

*aureus*, segue-se o isolamento dos *Enterococcus* spp, com 3 isolados de *Enterococcus faecalis* e 3 isolados de *Enterococcus faecium*. De referir que, entre os Gram-positivos, não foi isolado por nenhum dos métodos nenhuma estirpe do género *Streptococcus*. No que respeita á família das Enterobacterales, excluído a estirpe *Klebsiella pneumoniae*, estas constituíram um dos agentes etiológico menos prevalente, representando um total de apenas 12 isolamentos. Por último, quanto á prevalência de leveduras verificamos que representaram 12 do total de isolamentos, predominando como expectável, a estirpe *Candida albicans*, que constitui 58,3% (7/12) dos isolados de leveduras (Tabela 4)

Tabela 4 - Isolamentos Bacterianos obtidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo

Microrganismo	Método Semi-Quantitativo (Maki)		Método Quantitativo (Sonicação)	
	n	f (%)	n	f (%)
<i>Bacilos Gram Positivo</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Candida albicans</i>	7	5,5	7	5,9
<i>Candida glabrata</i>	2	1,6	2	1,7
<i>Candida lusitaniae</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Candida parapsilosis</i>	2	1,6	2	1,7
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	1	0,9	1	0,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	3,1	3	2,6
<i>Enterococcus faecium</i>	3	2,3	3	2,6
<i>Escherichia coli</i>	4	3,2	3	2,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	18,9	26	21,9
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1,6	2	1,7

Tabela 4 - Isolamentos Bacterianos obtidos após Cultura de CVC por método semi-quantitativo e quantitativo (Continuação)

Microrganismo	Método Semi-Quantitativo (Maki)		Método Quantitativo (Sonicação)	
	n	f (%)	n	f (%)
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	8,7	13	10,9
<i>Raoultella spp</i>	1	0,8	1	0,8
<i>Serratia marcescens</i>	3	2,3	2	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	9,4	13	10,9
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	23	18,1	19	16,0
SNC - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	24	18,9	18	15,1
<b>Total</b>	<b>127</b>	<b>100</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

De notar, que apenas se estabelece o diagnóstico de infecção associada a CVC, quando o mesmo microrganismo é isolado na cultura microbiológica do cateter e na hemocultura correspondente. Desta forma, após a avaliação dos resultados dos isolamentos da hemocultura e em paralelo com os resultados da cultura microbiológica do CVC (Tabela 5), verificou-se que a predominância das infecções associadas a CVC na amostra estudada deve-se, com percentagens de isolamento similares, aos *Staphylococcus coagulase negativo* (31,6%) e á *Klebsiella pneumoniae ssp* (22,2%), seguindo-se *Staphylococcus aureus* (11,1%), *Candida spp* (10,3%), *Pseudomonas aeruginosa* (8,6%) e *Enterococcus spp.* (5,1%).

Tabela 5 -Microrganismo isolados a partir da Hemocultura Periférica enviada juntamente com o CVC

Microrganismo	Hemocultura	
	n	f (%)
<i>Candida spp</i>	12	10,3
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	0,9
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	1,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	5,12
<i>Escherichia coli</i>	4	3,4
<i>Klebsiella pneumoniae spp</i>	26	22,2
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	8,5
<i>Raoultella spp</i>	1	0,9
<i>Serratia marcescens</i>	3	2,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	11,1
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	15	12,8
<i>SCN-Staphylococcus epidermidis</i>	22	18,8
Total	117	100

Analisando os resultados anteriormente descritos e discutindo-os à luz da bibliografia citada ao longo deste estudo, é possível verificar que os mesmos vão de encontro ao anteriormente exposto. De fato, nas últimas décadas vários estudos avaliaram a colonização destes dispositivos, sendo os microrganismos mais isolados, à semelhança do presente estudo, os *Staphylococcus coagulase negativo* (16,4%), *Staphylococcus aureus* (13,2%), *Enterococcus* (15,2%), espécies de *Candida* (13,3%), espécies *Klebsiella* (8,4%), *Escherichia coli* (5,4%), espécies de *Enterobacter* (4,4%) e espécies de *Pseudomonas* (4%) (Weiner, Webb *et al...*, 2016; Zanoni *et al.*, 2021). Desta forma, os microrganismos que mais frequentemente causam infecções relacionadas com este tipo de dispositivos são *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus* (50-60% de todas as infecções), bacilos Gram-negativo (20%) e fungos.

(Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018, Ruiz-Giardin, Chamorro *et al.* 2019, Guzek, Rybicki *et al.* 2022).

No que respeita aos os *Staphylococcus* coagulase negativo e aos *Staphylococcus aureus* estes microrganismos representam efetivamente um enorme grupo neste tipo de infeções. Os *Staphylococcus* coagulase negativo, apesar de muitas vezes clinicamente desvalorizados por poderem ser considerados “contaminação”, são microrganismos aos quais se deve dar suma importância, sobretudo pela sua capacidade de formar biofilme (Donlan 2002, Rewa, Muscedere *et al.* 2012, L. Zhang, Gowardman *et al.* 2016, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018, Ahn, Kim *et al.* 2023) Tratam-se também de microrganismos que apresentam fatores de virulência de elevada relevância, tais como, presença de cápsula, adesinas de superfície e capacidade aumentada de adesão a superfícies pela formação de *Slime* (Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Kırmusaoğlu 2016, Belbase, Pant *et al.* 2017, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018, Ahn, Kim *et al.* 2023) Esta substância confere-lhes uma grande capacidade de proteção face a agressões externas, quer do sistema imunitário do hospedeiro, quer da ação dos antibióticos, dificultando a sua entrada na célula bacteriana e condicionando a sua eficácia (Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Almirante and Pahissa 2013, Gökçen, Vilcinskas *et al.* 2013, França 2023). Esta predominância de espécies de *Staphylococcus* deve-se sobretudo ao fato de estes microrganismos serem constituintes comuns da flora cutânea, o que sugere que as infeções por CVC são muitas vezes atribuídas a contaminação extraluminal (Ong, Bonten *et al.* 2015, Weiner, Webb *et al.* 2016, ashem, Elazab *et al.* 2017, Novosad, Fike *et al.* 2020). Sabe-se que a implementação do cateter compromete a barreira protetora da pele, constituindo assim uma porta de entrada para este tipo de infeções (Tao, Jiang *et al.* 2015, Zanoni, Pavone *et al.* 2021), mecanismo de infeção por via extraluminal. Este mecanismo ocorre pela formação de uma matriz biológica (biofilme) resultante da adesão e colonização de microrganismos, como referido anteriormente, algumas vezes comensais, seguindo-se, dependendo das espécies, da adesão de outras moléculas específicas ao material inerte (Safdar, Abad *et al.* 2019, Yousif, Jamal *et al.* 2015, Hashem, Elazab *et al.* 2017, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, França 2023). Há também evidências de

que o próprio material inerte/abiótico implantado causa muitas vezes atenuação local das respostas imunes antimicrobianas, proporcionando desta forma um local fértil para a formação de biofilme microbiano (Yousif, Jamal *et al.* 2015, Hashem, Elazab *et al.* 2017, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, França 2023). Em qualquer das situações, a formação de um biofilme associado ao cateter decorre de um processo progressivo e natural, após a colonização inicial (Yousif, Jamal *et al.* 2015, Gominet, Compain *et al.* 2017, Osório, Oliveira *et al.* 2023). É também importante referir que alguns autores referem ainda a existência de uma forte correlação entre a colonização intensa da pele e a colonização do cateter com subsequente infeção sobretudo em dispositivos intravasculares de curta duração (Vineet Chopra, O'Horo *et al.* 2013, Yousif, Jamal *et al.* 2015 Osório, Oliveira *et al.* 2023). Os resultados apresentados vão assim de acordo com o apresentado por outros estudos desenvolvidos nos últimos anos (Ong, Bonten *et al.* 2015, Weiner, Webb *et al.* 2016, Novosad, Fike *et al.* 2020), nomeadamente mostrando que os resultados positivos resultam muitas vezes da migração da flora cutânea do paciente, ou da contaminação durante a manipulação (Castro, Obiols *et al.* 2009, Almirante and Pahissa 2013, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018, Osório, Oliveira *et al.* 2023).

A referir, que de acordo com a literatura, de entre este grupo de microrganismos destacam-se, os *Staphylococcus epidermidis* que apresentam neste estudo percentagens de isolamento de 18,8% e tratam-se de microrganismos que para além de fazerem também parte da flora normal da pele apresentam grande capacidade de adesão a superfícies plásticas (Ferrer and Almirante 2014, Hashem, Elazab *et al.* 2017).

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo encontrado com relativa frequência em ambos os métodos e nas respetivas hemoculturas, com percentagens de aproximadamente 10%. Estes microrganismos, tal como as restantes espécies estafilocócicas, possuem componentes proteicos que ao recobrirem a superfície interna e externa do cateter facilitam o processo de adesão e colonização (Ferrer and Almirante 2014, Kırmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018). O *Staphylococcus aureus*, por sua vez, utiliza o processo de trombogénese em seu benefício, para aderir e infetar o CVC. Uma vez aderidas, estas bactérias proliferam, formando múltiplas



camadas e conseqüentemente biofilme, que atua como barreira à ação das células do sistema imunitário (Dunne 2002, Ross, Quesada *et al.* 2006, O'Grady, Alexander *et al.* 2011, Diaz 2018, Guzek, Rybicki *et al.* 2022).

Avaliando os isolamentos por grupos de microrganismos verificamos assim e tendo em conta o anteriormente referido verificamos que no método semi-quantitativo há uma maior predominância de isolamentos de cocos gram positivos quando comparado com os isolamentos obtidos pelo método quantitativo. Quanto aos bacilos gram negativos são predominantemente isolados por método quantitativo o que nos permite inferir que estes microrganismos estão mais associados a uma colonização intraluminal e os primeiros a uma colonização extraluminal (Fig. 4.)

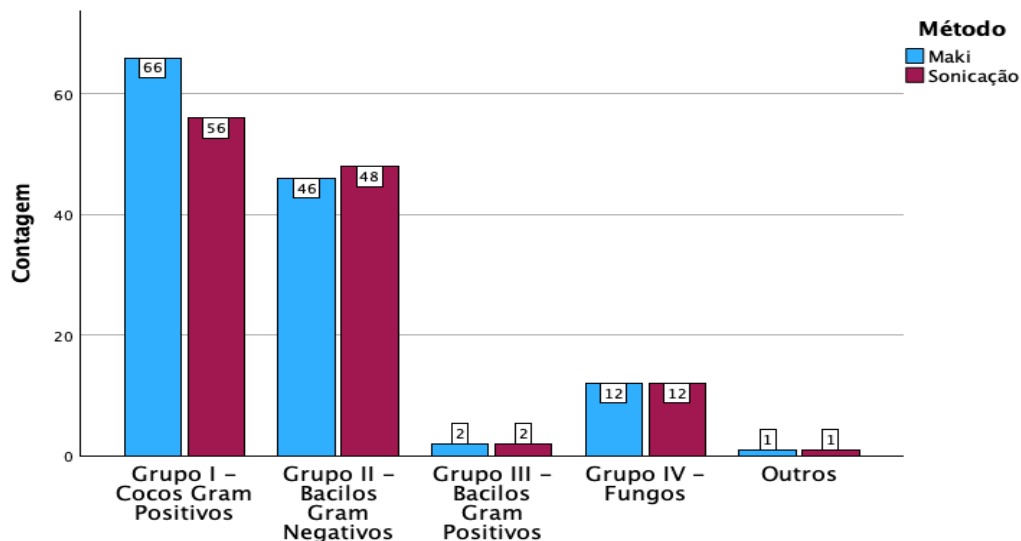


Figura 4 - Gráfico representativo dos isolamentos bacterianos obtidos pelo método semi-quantitativo e quantitativo

Segundo alguns autores, e ao longo do tempo, tem-se verificado alteração na distribuição dos microrganismos patogénicos associados a este tipo de infeções. Se há uma década os aeróbios Gram negativo eram os microrganismos predominantes, desde então que os aeróbios Gram positivo (por ex: *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*) e espécies de *Candida* aumentaram a sua importância relativa (Wisplinghoff, Bischoff *et al.* 2004, Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019). Neste estudo, as

percentagens das espécies de *Candida* apresentam valores que rondam os 10%. No entanto, este resultado requer especial atenção, não só pela sua capacidade de este microrganismo produzir glicocálice, o que aumenta a sua capacidade de colonizar CVC, mas também porque ocorrem em maior frequência em pacientes imunodeprimidos e/ou pacientes submetidos a antibioterapia prolongada (Chan, Baley *et al.* 2015).

A referir, que diversos autores (Rosenthal, Bijie *et al.* 2012, Gaynes and Jacob 2022) reportam esta mesma distribuição microbiológica, com base em relatórios de vigilância tanto dos Estados Unidos da América como da Europa, com a predominância de *Staphylococcus coagulase negativo*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* e espécies de *Candida*. (Rosenthal, Bijie *et al.* 2012, Gaynes and Jacob 2022).

Os relatórios emitidos pelo National Healthcare Safety Network (NHSN) (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019) reconhecem também que para além dos microrganismos referidos anteriormente, os bacilos Gram-negativo têm-se tornado microrganismos emergentes. Esses isolados incluem *Klebsiella pneumoniae*, espécies de *Pseudomonas*, espécies de *Enterobacter* e espécies de *Acinetobacter* (Badia-Cebada, Pujol *et al.* 2019, Gaynes and Jacob 2022).

No que concerne à espécie *Klebsiella pneumoniae*, repare-se que na amostra estudada representa aproximadamente 20% dos isolados obtidos, quer pelo método semi-quantitativo quer pelo método quantitativo e respetiva hemocultura. As *Pseudomonas aeruginosa* representam cerca de 10% e os *Enterobacter* assumem valores de aproximadamente 1%. De notar que nas bacteremias causadas por estes microrganismos se regista o fenómeno de multirresistência, e por isso se tornaram uma grande preocupação devido ao aumento de taxas de mortalidade e morbidade associadas (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019). Os bacilos Gram negativo representam a causa de 16 a 31% deste tipo de infeções (Wisplinghoff, Bischoff *et al.*, 2004; Weiner, Webb *et al.*, 2016), fato confirmado neste trabalho de investigação. De entre os bacilos gram negativos o grupo das *Enterobacterales* assumem valores de 28,2% (n=33) do

total dos isolados das hemoculturas que confirmam a bacteremia por estes microrganismos

Por fim, no que respeita à identificação dos microrganismos deve reconhecer-se que uma das vulnerabilidades do estudo é o fato de não ter sido possível utilizar a tecnologia MALDI-TOF também para os isolados nos meios de cultura, tanto de cateteres como de hemoculturas, o que, em muitos casos, impediu uma identificação mais precisa dos microrganismos, sobretudo dos Gram-positivos.

Assim sendo, da avaliação e discussão destes resultados foi possível não só avaliar a colonização da amostra como também permitiu a realização da distribuição/avaliação epidemiológica. Esse estudo permitiu um conhecimento das estirpes predominantes o que é essencial para orientação das decisões clínicas, decisões essas que se irão refletir em índices de mortalidade e morbidade bem como em custos de permanência hospitalar (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Ahn, Kim *et al.* 2023).

### 4.3 INFEÇÕES ASSOCIADAS A CVC: EM MALDI-TOF

A cultura, isolamento e identificação dos microrganismos permanece como o “*gold standard*” no diagnóstico microbiológico. No entanto, como discutido anteriormente, os métodos convencionais apresentam algumas limitações nomeadamente de tempo de resposta, uma vez que a maioria das técnicas microbiológicas convencionais continua a basear-se em princípios e em evidências que requerem o crescimento do microrganismo o que faz com que a identificação possa demorar de horas a várias semanas, de aplicabilidade e de fiabilidade sobretudo quando se trata de microrganismos que crescem com dificuldade, que não crescem em todos os meios de cultura, ou que apresentam uma atividade bioquímica limitada (Bellido, Castaño *et al.* 2012). Neste sentido novas tecnologias têm-se imposto no diagnóstico microbiológico sendo a EM MALDI-TOF uma das tecnologias de identificação bacteriana que mais se tem

desenvolvido nos últimos anos. Trata-se de uma ferramenta robusta para a identificação fenotípica de microrganismos através da análise das proteínas constituinte da parede celular e de proteínas ribossomais, aumentando a sua confiabilidade quando comparada a outras técnicas fenotípicas convencionais. A sequência e o tamanho das proteínas ribossômicas são altamente conservados entre diferentes espécies bacterianas e, portanto, são utilizadas para identificar tipos individuais de bactérias (Bellido, Castaño *et al.* 2012, Vrioni, Tsiamis *et al.* 2018) O espectro gerado por EM é interpretado como “impressões digitais” de um *taxon* específico, discriminando espécies de microrganismos estreitamente relacionadas. Esta metodologia oferece vantagens significativas, como alta sensibilidade, velocidade de análise, capacidade de identificação de múltiplos analitos e requer apenas pequenas quantidades de amostra. As aplicações clínicas da EM MALDI-TOF para isolados bacterianos está a aumentar constantemente, desde a identificação de espécies e bacteremia, às aplicações mais promissoras no futuro: detecção de resistência antimicrobiana e tipagem microbiana para estudos epidemiológicos (Karas and Hillenkamp 1988, Ferreira, Vega *et al.* 2010, Bellido and Buitrago 2015, Castaño, Juanes *et al.* 2016). No caso de urgência clínica, é possível realiza-se a identificação dos microrganismos patogénicos diretamente de amostras biológicas (amostras de urina, sangue, exsudados, caldos, etc) (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Bellido and Buitrago 2015, Barberino, Silva *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023) utilidade essa estudada neste trabalho de investigação.

Neste contexto, com este estudo foi possível avaliar a introdução da tecnologia MALDI-TOF no diagnóstico de bacteremias por CVC uma vez que esta tecnologia tem-se mostrado muito útil no diagnóstico de bacteremia a partir diretamente do frasco de hemocultura permitindo identificar de forma rápida os microrganismos causadores desta patologia (Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Dubourg, Raoult *et al.* 2019, Lamy, Sundqvist *et al.* 2020 ,Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021). Para isso avaliaram-se 105 amostras (com diagnóstico de Bacteremia por CVC confirmados laboratorialmente pelos métodos convencionais) por EM MALDI-TOF. Essas amostras, caldo sonicado, foram avaliadas após um período de incubação de 6 horas. De referir que, vários testes

prévios à abordagem do estudo permitiram estabelecer um tempo de incubação de 6 horas como o período de incubação mais útil, como passo prévio à realização da espectrometria de massa. Incubações mais curtas reduziram significativamente o número de resultados positivos, e incubações mais longas não proporcionaram um aumento significativo no número de positivities, e reduziram o ganho de tempo no diagnóstico, a principal vantagem do método.

Em relação à avaliação das amostras por EM MALDI-TOF observou-se que foram detetados picos proteicos por EM MALDI-TOF, compatíveis com a possível presença de microrganismos após 6 horas de incubação, em 83 amostras (79%) e em 22 amostras (21%), apesar de terem sido identificados microrganismos tanto na cultura do cateter como na hemocultura, não foi detetada uma quantidade significativa de proteínas no intervalo de razão massa/carga utilizada, pelo que não foi possível identificar qualquer microrganismo. Nas amostras em que se obtiveram picos de proteínas verificou-se que a concordância entre a identificação obtida por métodos convencionais e a identificação obtida por EM MALDI-TOF variou consideravelmente consoante a pontuação obtida.

Neste contexto revela-se pertinente a discussão destes resultados tendo em conta os valores de pontuação obtidos pelo Software MALDI-TOF para estas amostras.

Dessa avaliação verificou-se que em 42 amostras (44,6% das amostras em que foram obtidos picos proteicos, 40% do total) foram obtidas pontuações inferiores a 1,5, sendo que destas amostras 8 (15,4%) evidenciaram concordância com os métodos convencionais ao nível da espécie e 8 (15,4%) ao nível do género. Desta forma, verifica-se que para as amostras com uma pontuação < 1,5 pontos, a concordância global ao nível do género, foi de apenas 30,8%, o que revela resultados percentuais consideravelmente baixos. Ainda no que respeita a estes resultados é importante referir que 11 destas amostras (26,2%) apresentaram, em qualquer um ou em ambos os métodos convencionais, isolamento de mais do que um microrganismo tratando-se de culturas polimicrobianas, o que de fato contribuiu para estes resultados insatisfatórios. Também há que ter em consideração que das 11 amostras de

CVC em que se obteve mais do que um microrganismo por métodos convencionais, apenas em 2 amostras de CVC (18,2%) se obtiveram os mesmos microrganismos na hemocultura, o que coloca em causa o significado clínico da maioria destes estudos quando se isola mais do que um microrganismo.

A este propósito, verifica-se assim que no que respeita a culturas polimicrobianas este estudo apresentou limitações o que de fato representa uma desvantagem adicional para a utilidade da EM MALDI-TOF no diagnóstico deste tipo de infeções. Esta limitação vai também de encontro a vários estudos publicados que referem também limitações na identificação de bacteremias polimicrobianas. Embora, existam diferenças dependendo dos procedimentos utilizados (Altun, Botero-Kleiven *et al.* 2015, Lamy, Sundqvist *et al.* 2020). No que no que respeita á identificação de populações mistas de bactérias provenientes de infeções polimicrobianas o sistema MALDI-TOF é de facto limitado uma vez que os algoritmos convencionais são projetados para identificar microrganismos a partir de uma única colónia pura e não têm a capacidade de classificar com segurança microrganismos de uma cultura bacteriana mista (Wang, Zhang *et al.* 2013, Jang and Kim 2018). Face a essa limitação já existem atualmente vários estudos que relataram um método para a identificação de amostras polimicrobianas de um único espectro (Mahe, Arzac *et al.* 2014, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017). No entanto, embora já exista atualmente um software específico para diagnosticar, a nível etiológico, infeções mistas por EM MALDI-TOF, a verdade, na nossa experiência, é que este software pode funcionar adequadamente quando se trata de infeções em que as populações bacterianas estão quantitativamente equilibradas, mas quando há um claro predomínio de uma das espécies tende muitas vezes a ignorar as populações minoritárias.

De qualquer modo, mesmo não considerando as culturas de cateter com cultura mista e considerando apenas as 31 culturas com apenas um microrganismo, a concordância foi de 19,4% ao nível da espécie e de mais 19,4% ao nível do género, o que dá uma concordância global de 38,8%, o que continua a representar uma fraca concordância e reflete uma utilidade clínica muito limitada da EM MALDI-TOF nos casos em que se obteve uma pontuação <1,5.

No que respeita a avaliação dos resultados de pontuação entre 1,5 e 1,7 foram obtidos estes resultados em 14 amostras (14,9 % das amostras em que foram obtidos picos proteicos, 13,3% do total,). Nestes casos, a concordância global foi de 57,1%, com 50% de concordância ao nível da espécie e mais 7,1% ao nível do género. De referir que, nestas amostras, foram observadas 3 amostras com culturas bacterianas mistas (21,4%) mas em todos os casos um dos microrganismos isolados correspondia ao registado na EM MALDI-TOF, o que revela um resultado considerável tendo em conta o anteriormente descrito. Repare-se que, de acordo com os casos anteriores, é raro observar-se nas culturas mistas o seu resultado reproduzido na hemocultura. No entanto, neste grupo de doentes a hemocultura apresentava apenas um microrganismo isolado e esse microrganismo correspondia ao microrganismo detetado por EM MALDI-TOF. Muito provavelmente, e tendo em conta todos os resultados para estes doentes, apesar de ambos os microrganismos terem sido efetivamente encontrados nos cateteres (uma vez que aparecem tanto na amostra processada pelo método Maki como na amostra processada por sonicação) é provável que um deles seja um contaminante, o que justificaria o facto de não ter sido encontrado na hemocultura e de ter sido detetado na EM MALDI-TOF. Tratando-se de uma contaminação, a carga bacteriana seria muito provavelmente muito inferior à do microrganismo real da hemocultura, pelo que a EM teria dado prevalência ao microrganismo mais abundante, facto justificável pelo anteriormente referido no que respeita à manipulação de culturas polimicrobianas por esta tecnologia.

Quanto aos resultados obtidos com valores de pontuação entre 1,7 e 2 foram obtidos em 18 casos e resultados > 2 foram obtidos em 20 casos (40,5% das amostras em que foram obtidos picos proteicos, 29,4 % do total). De facto, os melhores resultados obtidos por EM MALDI-TOF são os resultados obtidos com valores de pontuação de 1,7 e superiores. A concordância com os métodos convencionais foi de 100% ao nível da espécie, não só quando nos métodos convencionais o estudo refletia uma etiologia monobacteriana, mas também quando o estudo refletia uma etiologia polimicrobiana.

É interessante referir que, tal como nos casos anteriores, quando há culturas mistas, normalmente apenas aparece um dos isolados na hemocultura e é o que

normalmente se correlaciona com a EM MALDI-TOF. Para amostras em que o valor de pontuação obtido foi superior a 1,7 verificou-se a existência de 9 casos (23,7%) com culturas mistas. Em cinco destes casos, apesar da presença de mais do que um microrganismo em um ou ambos os métodos convencionais, apenas um microrganismo foi detetado na hemocultura, coincidindo sempre com um dos isolados do cateter, e também coincidindo com o identificado por EM MALDI-TOF. No entanto, em 4 estudos, foram detetados 2 ou mesmo 3 microrganismos em ambos os métodos de avaliação de cateter e hemocultura, coincidentes em todos os casos. Tal como referido anteriormente, em todos estes casos foi identificado um único microrganismo por EM MALDI-TOF, também este, em todos os casos, coincidente com um dos isolados tanto do cateter como da hemocultura.

Discutindo os resultados apresentados verificamos assim que, os resultados positivos de EM MALDI-TOF com uma pontuação superior a 1,7, apresentam uma excelente concordância com as técnicas convencionais, pelo que podem ser assumidos como uma técnica de diagnóstico rápido com uma fiabilidade muito elevada, tanto em termos de estabelecimento do critério de infeção como em termos de identificação específica do microrganismo envolvido. Desta forma, a simples orientação de diagnóstico torna-se essencial na medida em que se irá refletir em ganhos em saúde (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Ahn, Kim *et al.* 2023).

Ainda no que respeita à análise da sensibilidade deste método verificou-se que: avaliando as amostras totais em que se identificou presença de pico e as amostras que identificaram o mesmo agente etiológico da bacteremia que os métodos convencionais a sensibilidade foi limitada. Desta forma, analisando os resultados anteriormente descritos e discutindo-os à luz da bibliografia citada ao longo deste estudo, é possível verificar que os mesmos vão de encontro ao anteriormente exposto. De fato, como referem os investigadores Munoz Bellido J.L e Gonzáles Buitrago J.M a EM MALDI-TOF tem, *a priori*, uma desvantagem quando se trata de identificação direta de amostras clínicas: embora possa ser um método de diagnóstico muito específico, não é um método particularmente sensível, uma vez que requer uma quantidade considerável de proteína para



obter perfis confiáveis. Isto significa que, em numerosas amostras em que a concentração de microrganismos ou a quantidade de amostra que pode ser obtida são pequenas, a sua sensibilidade é baixa (Bellido and Buitrago 2015), o que acontece com a amostra deste estudo em que a concentração bacteriana obtida no caldo de CVC poderá não representar uma concentração bacteriana considerável para posterior identificação. Neste sentido, exceto em cateteres muito intensamente colonizados ou infectados, a quantidade de microrganismos obtida por sonicação inicial será, na grande maioria dos casos, insuficiente para uma identificação fiável, pelo que é essencial um período de incubação prévio como o realizado neste estudo de forma a aumentar a sensibilidade de diagnóstico por EM MALDI-TOF e de forma a se obter uma maior carga proteica com consequente melhores resultados de identificação.

De notar que este método trata-se de um método que é sobretudo utilizado após a confirmação da formação da colónia em meio de cultura (Lamy, Sundqvist *et al.* 2020) o que representa uma das suas limitações ao estudo. Realmente, os protocolos comerciais continuam a ser os procedimentos de referência para a extração de proteínas bacterianas de amostras diretas. No entanto, surgem cada vez mais, á semelhança deste estudo, métodos modificados e internos para abordar várias questões fundamentais relacionadas com a precisão e a velocidade de identificação de agentes etiológicos. Conforme discutido no capítulo anterior, a preparação da amostra e um método adequado de extração de proteínas são etapas fundamentais que podem influenciar a sensibilidade, a resolução e a reprodutibilidade. A má preparação da amostra levará a uma resolução de pico mais baixa com, consequentemente, menor sensibilidade e reprodutibilidade, uma vez que a formação de iões por MALDI-TOF depende de uma proporção ideal de substância de matriz e analito (Marvin, Roberts *et al.* 2003, Castaño, Juanes *et al.* 2016, Simke, Fischer *et al.* 2022). Outros estudos também alertam para a necessidade de uma carga bacteriana alta, como referido anteriormente, para obter um espectro aceitável, para além da alteração dos espectros proteicos devido a interferências do meio de cultura, de proteínas humanas e células sanguíneas (Stevenson, Drake *et al.* 2010, Rodríguez, Bratos *et al.* 2016, Haider, Ringer *et al.* 2023). Portanto, é de extrema importância pré-tratar adequadamente

uma amostra, considerando que os fluidos humanos contêm outras proteínas além de bactérias ou fungos. Estas etapas preliminares devem drenar e separar o sangue e outras células humanas (ou seja, a hemoglobina) e recuperar seletivamente as proteínas bacterianas, caso contrário, resultará uma identificação errada ou desconhecida (Hou, Chiang-Ni *et al.* 2019, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021). Para isto, neste protocolo experimental de forma a se obter uma amostra adequada para estudo recorreu-se, numa fase inicial, a centrifugação e posterior concentração. De notar que a identificação direta de um microrganismo em amostras biológicas é antes uma questão de padronização, padronização essa que pela inovação do protocolo poderá ter que ser ajustada em estudos posteriores.

A referir, que por si só a EM MALDI-TOF não se trata de uma metodologia com um protocolo único e validado, uma vez que oferece ainda algumas limitações, embora os protocolos já existentes se centrem, como referido anteriormente, em tentar eliminar as substâncias que interferem no processo e limitam a identificação bacteriana (Rodrígueza, Bratos *et al.* 2016, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021)

As atualizações contínuas dos bancos de dados espectrais e melhoramento da preparação das amostras serão dois aspetos fundamentais para aumentar a aplicabilidade desta tecnologia no futuro (Bellido and Buitrago 2015, Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023). Fatores como o transporte das amostras, o método de preparação da amostra, a quantidade bacteriana disponível para análise, o número de disparos de laser aplicados e a média dos espectros por medição poderão também ter interferido na qualidade dos resultados e, portanto, na identificação adequada da amostra, facto já referido por outros trabalhos de investigação (Cuénod, Foucault *et al.* 2021, Torres-Sangiao, Rodriguez *et al.* 2021).

Por fim, avaliando também os resultados verificamos que os microrganismos mais identificados nas amostras em que foram detetados picos e que identificaram o mesmo agente etiológico da bacteremia, através dos métodos convencionais, foram a *Klebsiella pneumoniae* e o *Staphylococcus aureus*.

No caso da estirpe *Klebsiella pneumoniae* (n=14) em 13 identificações a identificação foi confiável ao nível do género e da espécie. Quanto ao *Staphylococcus aureus* (n=11) em 9 identificações a identificação foi confiável ao nível do género e da espécie. Do resultado da sonicação identificou-se por EM MALDI-TOF 14 dos 24 isolamentos de *Klebsiella pneumoniae*, 3 dos 4 isolamentos de *Escherichia coli*, 11 dos 12 isolamentos de *Staphylococcus aureus*. A identificação destes microrganismos a este nível revela-se assim de suma importância sobretudo por se tratarem de bactérias problemáticas sobretudo em UCI (que representa um dos principais locais de proveniência de amostra deste estudo) por apresentarem elevados níveis de resistências aos antimicrobianos. Sabe-se, por exemplo que a *Klebsiella pneumoniae*, no grupo das *Enterobacterales*, representam um problema no que respeita à resistência por betalactamases e fluoroquinolonas, em cerca de 30% e o *Staphylococcus aureus* apresenta também uma elevada percentagem de resistência em UCI a fluoroquinolonas (>90%) e macrólidos (>65%) (Bellido 2008).

De notar que estes microrganismos apresentam ainda elevada capacidade de se desenvolver em biofilme tornando o tratamento da patologia em estudo ainda mais difícil (Arciola *et al.* 2012, Rewa, Muscedere *et al.* 2012, Almirante and Pahissa 2013, Gökçen, Vilcinskas *et al.* 2013, Laverty, Gorman *et al.* 2014, Kirmusaoğlu 2016, Reffuveille, Josse *et al.* 2017, Diaz 2018). Tratam-se assim de microrganismos que o seu aumento na epidemiologia hospitalar pode constituir um grave problema em termos do agravamento da patologia e de custos hospitalares por aumento do tempo de internamento, mortalidade e morbilidade. Daí que um diagnóstico rápido seja essencial na medida em permitirá um tratamento empírico mais ajustado aquela realidade hospitalar. Uma simples orientação de diagnóstico, como já focado anteriormente, é essencial na medida em que se irá refletir em ganhos em saúde (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019, Ahn, Kim *et al.* 2023).



## V - CONCLUSÃO

## CONCLUSÃO

Os CVC são os dispositivos intravasculares mais utilizados na prática da medicina moderna é de fundamental importância para o tratamento de pacientes com períodos de hospitalização e/ou procedimentos hospitalares adicionais que vão desde a administração de fluídos até ao controlo hemodinâmico (Gominet, Compain *et al.* 2017, Blot, Poulakou *et al.* 2019, Guzek, Rybicki *et al.* 2022). A infeção da corrente sanguínea relacionada com cateteres centrais constitui uma das principais complicações do seu uso e é a principal causa de bacteremia nosocomial primária (Silva, Oliveira *et al.* 2009). Tratam-se de infeções com um quadro clínico muitas vezes inespecífico que requerem o diagnóstico laboratorial para confirmação de infeção (Ross, Quesada *et al.* 2006, Mansilla, Ahufinger *et al.* 2018, Chaves, Garnacho-Monterob *et al.* 2018, Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon *et al.* 2019).

Assim, desenvolver um método rápido que permita um diagnóstico etiológico de infeções associadas a CVC com sensibilidade e especificidade pelo menos semelhantes aos métodos de cultura, mas com velocidade semelhante aos métodos de coloração, revela-se de extrema importância, uma vez que a rápida identificação dos seus agentes etiológicos é essencial para a escolha adequada da antibioterapia e fundamental para aumentar a eficácia do tratamento, permitindo assim reduzir as taxas de mortalidade e morbilidade que lhe estão associadas, além de contribuir para a prevenção do desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

A cultura, isolamento e identificação dos microrganismos, permanece como o padrão no diagnóstico microbiológico. No entanto, os métodos convencionais apresentam algumas limitações, nomeadamente de tempo de resposta, uma vez que a maioria das técnicas microbiológicas convencionais continua a basear-se em princípios e evidências que requerem o crescimento do microrganismo, o que faz com que a identificação possa demorar de horas a várias semanas; de aplicabilidade e de fiabilidade, sobretudo quando se trata de microrganismos que crescem com dificuldade, que não crescem em todos os

meios de cultura, ou que apresentam uma atividade bioquímica limitada (Bellido, Castaño *et al.* 2012).

Neste sentido, novas tecnologias têm-se imposto no diagnóstico microbiológico. A EM MALDI-TOF surge recentemente como uma tecnologia poderosa para a identificação de microrganismos, que é baseada na geração de espectros das proteínas, que são únicas para cada microrganismo, funcionando como impressões digitais. Esta tecnologia tem vindo a alterar o fluxo de trabalho, bem estabelecido, dos laboratórios clínicos e seu impacto no diagnóstico microbiológico revela-se incomparável. As aplicações clínicas da EM MALDI-TOF para isolados bacterianos está a aumentar constantemente, desde a identificação de espécies e bacteremia, às aplicações mais promissoras no futuro (Karas and Hillenkamp 1988, Ferreira, Vega *et al.* 2010, Bellido and Buitrago 2015, Castaño, Juanes *et al.* 2016). No caso de urgência clínica, é possível realizar-se a identificação de microrganismos patogénicos diretamente de amostras biológicas (amostras de urina, sangue, exsudados, caldos, etc.) (Ferreira, Sánchez-Juanes *et al.* 2011, Bellido, Castaño *et al.* 2012, Bellido and Buitrago 2015, Barberino, Silva *et al.* 2017, Haider, Ringer *et al.* 2023) utilidade essa estudada neste trabalho de investigação.

Neste contexto e tendo em consideração o descrito ao longo deste trabalho de investigação, o estudo desenvolvido permitiu concluir que a infeção do CVC, de acordo com os dados obtidos, afeta de forma semelhante ambos os sexos, atingindo preferencialmente os doentes idosos, e ocorre principalmente, como seria de esperar, em doentes dos serviços de Medicina, UCI e Cirurgia. A elevada prevalência em doentes de zonas COVID é, muito provavelmente, uma característica circunstancial associada ao período em que as amostras foram obtidas.

Quanto aos métodos convencionais conclui-se que embora os métodos de Maki e de sonicação avaliem preferencialmente a colonização de diferentes superfícies do cateter, na prática os seus resultados são semelhantes, uma vez que em 95% dos casos a colonização foi detetada por ambos os métodos. No entanto, continua a ser aconselhável utilizar ambos os métodos, uma vez que em 7,6% dos casos a colonização detetada foi exclusivamente extraluminal e em

1,9% dos casos exclusivamente intraluminal. Desta avaliação conclui-se que os microrganismos mais isolados estão dentro do espectável, com um claro predomínio de *Staphylococcus* coagulase-negativo, seguido das *Enterobacterales*, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, do *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A alta prevalência de leveduras, corroborada pela hemocultura trata-se de um alerta uma vez que apresenta 12 isolamentos o que são valores de isolamento muito próximos da prevalência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

No que diz respeito ao objetivo principal do estudo, ou seja, á possibilidade de utilizar a técnica EM MALDI-TOF como método rápido de identificação de microrganismos causadores de infeção do CVC, deve concluir-se que, embora possa ser um método útil, na medida em que pode permitir um diagnóstico mais rápido da etiologia e, por conseguinte, uma terapia empírica mais orientada, tem limitações consideráveis.

Em primeiro lugar, apenas 80% das amostras apresentam resultados de EM MALDI-TOF e cerca de 20% não apresentam quaisquer picos de proteínas.

Em segundo lugar, das amostras em que são detetados picos de proteínas com uma pontuação inferior a 1,7, menos de 50% apresentam um resultado que se correlaciona com os métodos convencionais e com a hemocultura, pelo que não devem ser tidas em conta na abordagem diagnóstica ou terapêutica. No que respeita a este tipo de amostras há que referir que existe um aspeto que não foi tido em conta na conceção do estudo e que, tendo em conta os resultados, poderia ser interessante abordar: se estas pontuações baixas, apesar de não serem fiáveis para estabelecer um diagnóstico etiológico, poderiam ser utilizadas para ajudar a fazer um diagnóstico simples, qualitativo, da infeção do CVC. Para o efeito, seria necessário estudar um grupo de doentes em que se suspeitasse de infeção do CVC, mas não se tivesse procedido ao isolamento, de forma a corroborar se a deteção de proteínas correspondentes à janela de deteção da EM MALDI-TOF, mesmo em níveis baixos, corresponde ou não à existência de infeção.

Por fim, no que respeita á identificação de populações mistas de bactérias provenientes de infeções polimicrobianas conclui-se que o sistema MALDI-TOF

é de facto limitado uma vez que o software atualmente disponível, embora permita uma identificação muito fiável de espécies individuais, tem atualmente dificuldade em identifica-las, pelo que, nos casos em que estas ocorrem, alguns dos microrganismos podem não ser detetados até que os resultados da cultura estejam disponíveis.

No entanto, apesar das limitações descritas anteriormente, os métodos descritos oferecem resultados satisfatórios para um grupo de amostras na medida em que os resultados positivos de EM MALDI-TOF, com uma pontuação superior a 1,7, apresentam uma excelente concordância com as técnicas convencionais, pelo que podem ser assumidos como uma técnica de diagnóstico rápido com uma fiabilidade muito elevada, tanto em termos de estabelecimento do critério de infeção como em termos de identificação específica do microrganismo envolvido.

Em suma, os resultados deste estudo reforçam a importância de que métodos mais rápidos de identificação bacteriana como a EM MALDI-TOF sejam incluídos num laboratório de microbiologia clínica de rotina, sobretudo porque ao auxiliarem a identificação rápida de infeções graves, como a bacteremia por CVC, podem levar a uma terapia empírica rápida e eficiente, ajudando não só a diminuir taxas de morbilidade e mortalidade mas também a emergência de agentes patogénicos multirresistentes resultantes do uso inadequado de antimicrobianos. A referir, este estudo permitiu ainda a avaliação da distribuição epidemiológica neste tipo de infeções e um conhecimento das estirpes predominantes possibilitando também um ajuste da antibioterapia e um tratamento empírico mais ajustado à realidade hospitalar apresentada.





# VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ábrók, Arcson, Lázár, *et al.* (2015). "Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women." *J Microbiol Methods* **114**: 23-25.

Aldea Mansilla, Martinez-Alarcon, Gracia Ahufinger, *et al.* (2019). "Microbiological diagnosis of catheter-related infections." *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)* **37**(10): 668-672.

Almirant and Pahissa (2013). *Diagnostico Microbiologico de las infecciones relacionadas com cateteres vasculares*. Barcelona.

Almirantea, Limónb and Freixasc (2012). "Laboratory-based surveillance of hospital-acquired catheter-related bloodstream infections in Catalonia. Results of the VINCat Program (2007-2010)." *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **30**(3): 13-19.

Altun, Botero-Kleiven, Carlsson, *et al.* (2015). "Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS following short-term incubation on solid media." *Journal of Medical Microbiology* **64**: 1346-1352.

Andrew E. Clark, Kaleta, Arora, *et al.* (2013). "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology." *Clin Microbiol Rev*. **26**(3): 547-603.

Anhalt and Fenselau (1975). "Identification of bacteria using mass spectrometry." *Anal. Chem.* **47**(2): 219-225.

Arroyo and Denys (2017). "Parallel Evaluation of the MALDI Sepsityper and Verigene BC-GN Assays for Rapid Identification of Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures." *J Clin Microbiol* **55**(9): 2708-2718.

Badia-Cebada, Pujol, Marrón, *et al.* (2019). "Trends in the epidemiology of catheter-related bloodstream infections; towards a paradigm shift, Spain, 2007 to 2019." *Eurosurveillance* **27**(19).

Barberino, Silva, Arraes, *et al.* (2017). "Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)." *Braz J Infect Dis* **21**(3): 339-342.

Bd®. (2023, 2023). "BD BACTEC™ - Blood Culture System." Retrieved 29/01/2023, 2023, from <https://www.bd.com/pt-br/our-products/diagnostics-systems/blood-culture/bactec>.

Belbase, Dutt, Krishus, *et al.* (2017). "Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **16**(15).

Bellido (2008). "Bacterias problemáticas " *Rev Esp Quimioter* **1**: 2-6.

Bellido and Buitrago (2015). "Espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. Situación actual y perspectivas futuras. MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Current situation and future perspectives." *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **33**(6): 369-371.

Bellido, Castaño, Ferreira, *et al.* (2012). "Aplicaciones de la proteómica en el laboratorio de Microbiología Clínica." *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **30**(7): 383-393.

Bio-Rad®. (2023). "Pastorex Staph Plus Kit " Retrieved 29 janeiro 2023, 2023, from <http://www.bio-rad.com/prd/en/US/adirect/biorad?ts=1&cmd=BRCatgProductDetail&vertical=CDG&catID=0a84ccab-dc48-45e9-bd12-b21792da97ae&country=US&lang=en&javascriptDisabled=true>.

Biomerieux® (2023). Meios de Cultura Convencionais Portugal.

Biomérieux®. (2023). "Informação de produtos dos sistemas VITEK 2 System." Retrieved 29 janeiro 2023, 2023, from <https://www.biomerieux.pt/produto/vitek2-compact>.

Bizzini, Durussel, Bille, *et al.* (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.

Blot, Bergs, Vogelaers, *et al.* (2014). " Prevention of central line-associated bloodstream infections through quality improvement interventions: A systematic review and meta-analysis. ." *Clinical Infectious Diseases* **59**(1): 96-105.

Blot, Poulakou and Timsit (2019). "Catheter-associated bloodstream infection rates: how low can you go?" *Intensive Care Med* **45**: 896-897.

Blot, Schmidt, Nitenberg, *et al.* (1998). "Earlier Positivity of Central-Venous-versus Peripheral-Blood Cultures Is Highly Predictive of Catheter-Related Sepsis." *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*,: 105-109.

Bouza, Alvarado, Alcalá, *et al.* (2005). "A Prospective, Randomized, and Comparative Study of 3 Different Methods for the Diagnosis of Intravascular Catheter Colonization." *Clinical Infectious Diseases* **40**: 1096-1100.

Braun, Hussein, Geffen, *et al.* (2014). " Predominance of Gram-negative bacilli among patients with catheter-related bloodstream infections." *Clinical Microbiology and Infection* **20**(10): O627-O629.

Cabrero, Robledo, Cuñado, *et al.* (2023). "Risk factors of catheter-associated bloodstream infection: Systematic review and meta-analysis." *PLOS ONE* **18**(3): 1-24.

Cantón-Bulnes and Garnacho-Montero (2019). "Practical approach to the management of catheter-related bloodstream infection." *Rev Esp Quimioter* **32**(2): 38-41.

Cantón and García-Rodríguez (2016). "La espectrometría de masas MALDI-TOF en microbiología clínica. De la innovación a la rutina del laboratorio." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **34**(2): 1-2.

Cantón and Pedrosa (2017). "Impacto económico de los métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica: precio de la prueba o impacto clínico global." *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **35**(10): 659-666.

Cantón and Pedrosa (2017). "Impacto económico de los métodos de diagnóstico rápido en Microbiología Clínica: precio de la prueba o impacto clínico global." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **35**(10): 659-666.

Castaño, Juanes, Ferreira, *et al.* (2016). "Is MALDI-TOF Mass Spectrometry a Valuable New Tool for Microorganisms Epidemiology?" *J Proteomics Bioinform* **9**(9): 232-237.

Castro, Obiols, Munar, *et al.* (2009). "Análisis prospectivo de la colonización de catéteres centrales y sus factores relacionados." *Enfermería Clínica* **19**(3): 141-148.

Chaves, Garnacho-Montero, Pozo, *et al.* (2018). "Diagnosis and treatment of catheter-related bloodstream infection: Clinical guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology and (SEIMC) and the Spanish Society of Spanish Society of Intensive and Critical Care Medicine and Coronary Units (SEMICYUC)." *Med Intensiva (Engl Ed)* **42**(1): 5-36.

Clark, Kaleta, Arora, *et al.* (2013). "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology." *Clinical Microbiology Reviews* **26** (3): 547- 603.

Cleri, Corrado and Seligman (1980). "Quantitative Culture of Intravenous Catheters and Other Intravascular Inserts" *The Journal of Infectious Diseases* **141**: 1781-1786.

Cuénod, Foucault, Pflüger, *et al.* (2021). "Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics." *Front Cell Infect Microbiol* **16**(11): 646-648.

Diaz (2018). Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*: MecC Gene and Vancomycin Susceptibility, Universidade de Aveiro.

Donlan (2002). "Biofilms: Microbial Life on Surfaces." *Emerging Infectious Diseases* **8**(9).

Donlan and Costerton (2002). "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews*: 167-193.

Dunne (2002). "Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?" *Clinical Microbiology Reviews* **15**(2): 155-166.

Eigner, Holfelder, Oberdorfer, *et al.* (2009). "Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory." *Clin Lab* **55**(7-8): 289-289.

Engel, Prabutzki, Leopold, *et al.* (2022). "A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research." *Progress in Lipid Research* **86**: 101145.

F., J., Q, *et al.* (2017). *Staphylococcus Aureus* Biofilms and Their Impact on the Biofilms and Their Impact on the Medical Field. In *The Rise of Virulence and*

Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. London, UK, , *IntechOpen*: 187-214.

Farina, Cornistein, Balasini, *et al.* (2019). " Infecciones asociadas a catéteres venosos centrales. Actualización y recomendaciones intersociedades." *MEDICINA (Buenos Aires)* **79**: 53-60.

Fenselau and Demirev (2001). "Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry." *Mass Spectrom Rev* **20**(4): 157-171.

Ferreira, Sánchez-Juanes, Porrás-Guerra, *et al.* (2011). "Microorganisms direct identification from blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Clin Microbiol Infect* **17**(4): :546-545.

Ferreira, Vega, Sánchez-Juanes, *et al.* (2010). "Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. ." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **28**: 492-497.

Ferrer and Almirante (2014). "Infecciones relacionadas con el uso de los catéteres vasculares." *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)* **32**(2): 115-124.

Flemming and Wingender (2010a). "The biofilm matrix." *Nature Reviews Microbiology* **8**( 9): 623-633.

Fontela, Platt, Rocher, *et al.* (2012). "Epidemiology of central line-associated bloodstream infections in Quebec intensive care units: a 6-year review." *American Journal of Infection Contro* **40**(221-6).

Fortún (2008). "Infecciones asociadas a dispositivos intravasculares utilizados para la terapia de infusión." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26**(3): 168-174.

França (2023). "The Role of Coagulase-Negative Staphylococci Biofilms on Late-Onset Sepsis: Current Challenges and Emerging Diagnostics and Therapies." *Antibiotics* **12**: 554.

Gallart, Delicado, Nuvials, *et al.* (2022 ). "Actualización de las recomendaciones del Proyecto Bacteriemia Zero." *Enfermería Intensiva* **33**: S31-S39.

García-Rodríguez, Gómez and Altés (2010). "El microbiólogo y la infección asociada a catéter." *Rev Esp Quimioter* **23**(2): 53-62.

Garner, Mochon, Branda, *et al.* (2014). "Multi-centre evaluation of mass spectrometric identification of anaerobic bacteria using the VITEK® MS system." *Clinical Microbiology and Infection* **20**(4): 335-339.

Gaynes and Jacob. (2022, Outubro 2022). " Intravascular catheter-related infection: Epidemiology, pathogenesis, and microbiology. ." Retrieved janeiro 2023.

Gökçen, Vilcinskas and Wiesner ( 2013). "Methods to identify enzymes that degrade the main extracellular polysaccharide component of *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Virulence* **4**:(3): 260-270.

Gominet, Compain, Beloin, *et al.* (2017). "Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017?" *Acta Pathologica, Microbiologica ET Immunologica Scandinavica* **124**(4): 65-375.

Guembe, Martín-Rabadán, Cruces, *et al.* (2016). "Sonicating multi-lumen sliced catheter tips after the roll-plate technique improves the detection of catheter colonization in adults." *Journal of Microbiological Methods* **122**: 20-22.

Guzek, Rybicki, Woźniak-Kosek, *et al.* (2022). " Bloodstream Infections in the Intensive Care Unit: A Single-Center Retrospective Bacteriological Analysis Between 2007 and 2019." *Polish Journal of Microbiology* **71**(2): 263-277.



Haider, Ringer, Kotroczó, *et al.* (2023). "The Current Level of MALDI-TOF MS Applications in the Detection of Microorganisms: A Short Review of Benefits and Limitations." *Microbiol. Res* 14(1): 80-90.

Hashem, Elazab, Islam, *et al.* (2017). "Biofilm Production and Antibiotic Resistance of Staphylococcus Epidermidis in Catheter Related Bloodstream Infections." *Egypt. J. Med. Microbiol* 26: 73-78.

Helou, Viola, Hachem, *et al.* (2013). "Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections." *In The Lancet Infectious Diseases* 13(2): 166-174.

Hou, Chiang-Ni and Teng (2019). "Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology." *journal of food and drug analysis* 27: 404-414.

Hyun Min Ahn , June-Sung Kim , Min Gul Park, *et al.* (2023). "Incidence and short-term outcomes of central line-related bloodstream infection in patients admitted to the emergency department: a single-center retrospective study." *Scientific Reports* 13: 3867.

Idelevich, Grunewald, Llenweber, *et al.* ( 2014). "Rapid Identification and Susceptibility Testing of Candida spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2." *PLoS One*. 9((12): 114834.

Íñigo and Pozo (2018). "Fungal biofilms: From bench to bedside." *Rev Esp Quimioter* 1 (31 ): 35-38.

Interna. (2023, 2023). "O que é a Medicina Interna?" Retrieved Abril 2023, 2023, from <https://www.spmi.pt/o-que-e-a-medicina-interna/>.

Jang and Kim (2018). "Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications." *Journal of Microbiology* 56(4): 209-216.

Jenkins, Ling, Ciesielczuk, *et al.* (2012). "Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice." *J Med Microbiol* **61**(4): 483-488.

Karas and Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons" *Anal. Chem.* **60**( 20): 2299-2301.

Kirmusaoğlu (2016). Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms. *Microbial Biofilms: Importance and Applications*; IntechOpen. London, UK: 189-209.

Kite, Dobbins, Wilcox, *et al.* (1999). "Rapid diagnosis of central-venous-catheter-related bloodstream infection without catheter removal." *Lancet* **354**(9189): 1504-1507.

Lamy, Sundqvist, Idelevich, *et al.* (2020 ). "Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics." *Clin Microbiol Infect* **26**(2): 142-150.

Laverty, Gorman and Gilmore (2014). "Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation." *pathogens* **3**: 596-632.

Lebeaux, Chauhan, Rendueles, *et al.* (2013). "From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections." *pathogens* **2**: 288-356.

Lia Carolina Monsalve, Antonio Muro, Juan Luis Muñoz, *et al.* (2020). Virus de la fiebre hemorrágica de crimea congo: Evaluación en zona endémica, Universidad de Salamanca.

Lorente, Henry, Martín, *et al.* (2005). "Central venous catheter-related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters" *Critical Care*.

Lorente, Lecuona, Pérez-Llombet, *et al.* (2022). "Sonication did not provide reliability to Maki technique for catheter related bloodstream infection diagnosis." *Rev Esp Quimioter* **35**(2): 165-170.

Luethy and Johnson (2019). "The Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) for the Identification of Pathogens Causing Sepsis." *J Appl Lab Med* **3**(4): 675-685.

Mahe, Arzac, Chatellier, *et al.* (2014). "Automatic identification of mixed bacterial species fingerprints in a MALDI-TOF mass-spectrum." *BIOINFORMATICS* **30**(9): 1280-1286.

Maki, Weise and Sarafin (1977). "A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. ." *The New England Journal of Medicine* **296**: 1305-1309.

Malgrange, Escande and Theobald (2001 ). "Validity of Earlier Positivity of Central Venous Blood Cultures in Comparison with Peripheral Blood Cultures for Diagnosing Catheter-Related Bacteremia in Cancer Patients." *J Clin Microbiol.* **39**(1): 274-278.

Manian (2009). "IDSA Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infection." *Clinical Infectious Diseases* **49**(11): 1770-1177.

Mansilla, Ahufinger, Ramírez, *et al.* (2018). Procedimiento de Microbiología Clínica -Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares Diagnóstico microbiológico de las infecciones asociadas a catéteres intravasculares Madrid. 1.

Martin-Rabadan, Gijon, Alcalá, *et al.* (2008). "Propionibacterium acnes is a common colonizer of intravascular catheters." *J Infect* **56**(4): 257-260.

Marvin, Roberts and Fay (2003). "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry." *Clinica Chimica Acta* **337**(1-2): 11-21.

Mayer, Greene, Howell, *et al.* (2012). "Agreement in classifying bloodstream infections among multiple reviewers conducting surveillance." *Clin Infect Dis* **55**(3): 364-370.

Mellmann, Cloud, Maier, *et al.* (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**(6): 1946-1954.

Mermel (2017). "Short-term Peripheral Venous Catheter-Related Bloodstream Infections: A Systematic Review." *Clinical Infectious Diseases* **65**: 1757.

Mermel, Allon, Bouza, *et al.* (2009). "Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Intravascular Catheter-Related Infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America." *Clin Infect Dis.* **49**(1): 1-45.

Mermel, Farr, Sherertz, *et al.* (2001). "Guidelines for the Management of Intravascular Catheter-Related Infection." *Clinical Infectious Diseases* **32**(9): 1249-1127.

Mingorancea, Regueiro and Muñoz-Bellido (2016). "Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **34**(2): 3-7.

Naomi P. O'grady, Mary Alexander, R.N., *et al.* (2011). Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections C.D.C. a. Prevention: 1-83.

Novosad, Fike, Dudeck, *et al.* (2020). "Pathogens causing central-line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals United States, 2011-2017" *Infection Control and Hospital Epidemiology* **41**(3): 313-319.

O'grady, Alexander, Burns, *et al.* (2011). "Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections." *Clinical Infectious Diseases* **52**(9): 162-193.

Oncü, Ozsüt, Yildirim, *et al.* (2003). "Central venous catheter related infections: risk factors and the effect of glycopeptide antibiotics." *Annals Clinical Microbiology Antimicrobials* **27**(2).

Ong, Bonten, Safdari, *et al.* (2015 ). "Epidemiology, Management, and Risk-Adjusted Mortality of ICU-Acquired Enterococcal Bacteremia." *Clinical Infectious Diseases* **61**(9): 1413-1420.

Osório, Oliveira, Costa, *et al.* (2023). "Short Peripheral Venous Catheters Contamination and the Dangers of Bloodstream Infection in Portugal: An Analytic Study " *Microorganisms* **11**: 709.

Pozo and Patel (2013). A visual approach to biofilm related infecciones:from bench to bed Actualizacion en infecciones relacionadas con el uso de Cateteres Vasculares. M. M. Books. Madrid, 1<sup>o</sup>edicion. 1: 17-33.

Raad, Costerton, Sabharwal, *et al.* (1993). "Ultrastructural Analysis of Indwelling Vascular Catheters: A Quantitative Relationship between Luminal Colonization and Duration of Placement." *The Journal of Infectious Diseases* **168**: 400-407.

República (2005). Lei n.º 12/2005, de 26 de janeiro, *Diário da República n.º 18/2005, Série I-A de 2005-01-26*, : 606 - 611.

Rewa, Muscedere, Reynolds, *et al.* (2012). "Coagulase-negative Staphylococcus, catheter-related, bloodstream infections and their association with acute phase markers of inflammation in the intensive care unit: An observational study." *Canadian Journal Infections Diseases and Medical Microbiology* **23**( 4).

Rewa, Muscedere, Reynolds, *et al.* (2012). "Coagulase-negative Staphylococcus, catheter-related, bloodstream infections and their association with acute phase markers of inflammation in the intensive care unit: An observational study." *Can J Infect Dis Med Microbiol* **23**(4).

Rodrigues, Dias, Oliveira, *et al.* (2016). "Multidimensional Strategy Regarding the Reduction of Central-Line Associated Infection in Pediatric Intensive Care." *Acta Medica Portuguesa* **29**(6): 373-380.

Rodrigues, Lebre, Alves, *et al.* (2017). Programa de Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos. Lisboa, *Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde.*

Rodrígueza, Bratos, Merinoe, *et al.* (2016). "Utilización de MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de la sepsis." *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **34**(2): 19-25.

Rosenthal, Bijie, Maki, *et al.* (2012). "International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004-2009." *American Journal of Infection Control* **40**: 396-407.

Ross, Quesada, Girardello, *et al.* (2006). "Microbiological analysis of the central venous catheter tips from hospitalized patients at Hospital Universitario of Universidade Estadual Londina " *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* **27**(2): 117.

Ruegg, Faucett and Choong (2018). "Emergency inserted peripheral intravenous catheters: a quality improvement project." *Br J Nurs* **26**;27(14): S28-S30.

Ruiz-Giardin, Chamorro, Ríos, *et al.* (2019). " Blood stream infections associated with central and peripheral venous catheters " *BMC Infectious Diseases* **19**(1).

Rupp and Karnatak (2018). "Intravascular Catheter-Related Bloodstream Infections. In *Infectious Disease Clinics of North America.*" *W.B. Saunders* **32**(4): 765-787.

Rychert, Burnham, Bythrow, *et al.* (2013). "Multicenter evaluation of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive aerobic bacteria." *J Clin Microbiol* **51**(7): 2225-2231.

Safdar, Abad and Maki (2019). "Intravascular Catheter and Implantable Device Infections in Transplant Patients." *Springer New York In Principles and Practice of Transplant Infectious Disease*: 249-263.

Safdar and Maki (2004). "The pathogenesis of catheter-related bloodstream infection with noncuffed short-term central venous catheters." *Intensive Care Med* **30**(1): 62-67.

Saint, Veenstra and Lipsky (2000). "The clinical and economic consequences of nosocomial central venous catheterrelated infection: are antimicrobial catheters useful?" *Infection Control and Hospital Epidemiology* **21**(6): 375-380.

Sánchez-Juanes and González-Buitrago (2019). "Sample Treatment for Urine Proteomics." *Adv Exp Med Biol* **1073**: 125-135.

Sánchez-Juanes, Señán, Egido, *et al.* (2018). Use of MALDI-TOF Techniques in the Diagnosis of Urinary Tract Pathogens. The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology 2018, Pages *ACADEMICPRESS*: 145-158.

Sato, Nakamura, Fujita, *et al.* (2017). "Peripheral venous catheter-related bloodstream infection is associated with severe complications and potential death: a retrospective observational study." *BMC Infectious Diseases* **17**: 434-439.

Saúde (2017). Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos 2017. D.-G. d. Saúde. Lisboa, *Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde.*: 3-24.

Saúde and Jorge (2006). Recomendações para a prevenção da infeção associada aos dispositivos intravasculares - Plano Nacional de Controle de Infecção.

Schröttner, Gunzer, Schüppel, *et al.* (2016). "Identification of Rare Bacterial Pathogens by 16S rRNA Gene Sequencing and MALDI-TOF MS." *J Vis Exp.* **113**: 53176.

Schubert, Weinert, Wagner, *et al.* (2011). "Novel, Improved Sample Preparation for Rapid, Direct Identification from Positive Blood Cultures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry." *J Mol Diagn.* **13** (6): 701-706.

Schulthess, Brodner, Bloemberg, *et al.* (2013). "Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics." *J Clin Microbiol* **51**(6): 1834-1840.

Schulthess, Brodner, Guido V. Bloemberg, *et al.* (2013). "Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics." *J Clin Microbiol.* **51**(6).

Segawa, Sawai, Murata, *et al.* (2014). "Direct application of MALDI-TOF mass spectrometry to cerebrospinal fluid for rapid pathogen identification in a patient with bacterial meningitis." *Clin Chim Acta* **5**(435): 59-61.



Seng, Drancourt, Gouriet, *et al.* (2009). "Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry." *Clin Infect Dis* **49**(4): 543-545.

Sherertz, Heard and Raad (1997). "Diagnosis of triple-lumen catheter infection: comparison of roll plate, sonication, and flushing methodologies." *J Clin Microbiol* **35**(3): 641-646.

Sherertz, Raad, Belani, *et al.* (1990). " Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory." *J Clin Microbiol* **28**: 76-82.79.

Siegman-Igra, Anglim, Sharpiro, *et al.* (1997). "Diagnosis of Vascular Catheter-Related Bloodstream Infection: a Meta-Analysis." *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Vol. **35**(4): 928-936

Siller-Ruiz, Hernández-Egidoa, Sánchez-Juanes, *et al.* (2017). "Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media." *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **35**(5): 303-313.

Siqueira, Hueb, Contreira, *et al.* (2011). "Catheter-associated bloodstream infections (CA-BSI) in wards: a prospective comparative study between subclavian and jugular access." *J Vasc Bras* **10**( 3).

Slobbe, Barzouhi, Boersma, *et al.* (2009). "Comparison of the roll plate method to the sonication method to diagnose catheter colonization and bacteremia in patients with long-term tunnelled catheters: A randomized prospective study" *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, **47**(4): 885-888.

Stevenson, Drake and Murray (2010). " Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. ." *J Clin Microbiol.* **48**(2): 444-447.

Tacconelli, Smith, Hieke, *et al.* (2009). "Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four

European countries: literature- and registry-based estimates." *Journal of Hospital Infection* **72**: 97-103.

Tao, Jiang, Chen, *et al.* (2015). "Risk Factors for Early Onset of Catheter-Related Bloodstream Infection in an Intensive Care Unit in China: A Retrospective Study." *Medical Science Monitor* **21**: 550-556.

Tekippe, Shuey, Winkler, *et al.* (2013). "Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system." *J Clin Microbiol* **51**(5): 1421-1427.

Torres-Sangiao, Rodriguez and García-Riestra (2021). "Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories." *Microorganisms* **9**: 1539.

Trautner and Darouiche (2004). "Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention." *Arch Intern Med* **164**(8): 842-850.

Veen, Claas and Kuijper (2010 ). "High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratorie." *J Clin Microbiol.* **48**(3): 900-907.

Vega-Castaño, Ferreira, González-Ávilad, *et al.* (2012). "Eficacia de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaerobias." *EnfermInfecc Microbiol Clin.* **30**: 597-601.

Vineet Chopra, O'horo, Roger, *et al.* (2013). "The risk of bloodstream infection associated with peripherally inserted central catheters compared with central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis. ." *Infect Control Hosp Epidemiol* **34**(9).

Vorm, Roepstorff and Mann (1994). "Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation." *Anal. Chem.* **66**(19): 3281-3287.

Wang, Zhang, Fan, *et al.* (2013). "Direct identification of bacteria causing urinary tract infections by combining matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry with UF-1000i urine flow cytometry." *Journal of Microbiological Methods* **92**,(3): 231-235.

Weiner, Webb, Limbago, *et al.* (2016). "Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. ." *Infection Control and Hospital Epidemiology* **37**(11): 1288-1301.

Wisplinghoff, Bischoff and Tallent (2004). "Nosocomial bloodstream infections in US Hospitals: analysis of 24.179 cases from a perspective nationwide surveillance study." *Clin Infect Dis* **39**: 309.

Zanoni, Pavone, Binda, *et al.* (2021). "Catheter-related bloodstream infections in a nephrology unit: Analysis of patient- and catheter-associated risk factors " *Journal of Vascular Access* **22**(3): 337-343.

Zhang, Borrer and Sandrin (2014). "A designed experiments approach to optimization of automated data acquisition during characterization of bacteria with MALDI-TOF mass spectrometry." *PLOS ONE* **9**(3): e92720.

Zhang, Gowardman, Morrison, *et al.* (2016). "Microbial biofilms associated with intravascular catheter-related bloodstream infections in adult intensive care patients." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **35**: 201-205