



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAUDIA ROSS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PONTAS DE CATETERES
VENOSOS CENTRAIS DE PACIENTES DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO-LONDRINA-PARANÁ**

Londrina
2006

CLAUDIA ROSS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PONTAS DE CATETERES
VENOSOS CENTRAIS DE PACIENTES DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO-LONDRINA-PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutorado em Microbiologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo.

Londrina
2006

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R823a Ross, Claudia.
Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais de pacientes do Hospital Universitário – Londrina – Paraná / Claudia Ross. – Londrina, 2006.
85f.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.
Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
Inclui bibliografia.

1. Cateteres – Infecção hospitalar – Teses. 2. Microorganismos – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Pelayo, Jacinta Sanchez. II. Universidade Estadual de Londrina. III. Título.

CDU 579.63

CLAUDIA ROSS

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE PONTAS DE CATETERES
VENOSOS CENTRAIS DE PACIENTES DO HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO-LONDRINA-PARANÁ**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo

Prof.^o Dr. João Bedendo

Prof.^o Dr. Emerson José Venâncio

Prof.^a Dr.^a Halha Ostrensky Saridakis

Prof.^a Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina, 10 de novembro de 2006.

DEDICATÓRIA

A minha orientadora, Jacinta Sanchez Pelayo, braço amigo de todas as etapas deste trabalho e de todos os momentos difíceis e de alegrias.

Ao meu marido, Márcio Alexandre Volpato, pelo amor e compreensão, apoio e companheirismo de todas as horas.

Aos meus pais, Maria Celeste e Fioravante Ross, pela confiança, apoio e motivação.

Aos meus irmãos, Anderson e Lincoln Ross, pelo companheirismo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À prof.^a Dr.^a Jacinta Sanchez Pelayo pela confiança, amizade, paciência e oportunidade de realização deste trabalho.

À prof.^a Dr.^a Halha Ostrensky Saridakis pelo carinho, atenção e sugestões na realização deste trabalho.

À prof.^a Mestre Regina Mariuza Quesada Borsato pelo apoio, orientações e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof.^o Dr. Emerson José Venâncio pela valiosa colaboração e aconselhamento dado a este trabalho.

À coordenação e aos professores do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

Ao secretário José Alexandre Lopes do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia.

Ao Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário pela cedência das amostras clínicas e suporte técnico para a realização deste estudo.

A todos os docentes e funcionários do Laboratório de Microbiologia Clínica e do Laboratório de Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário, pelo apoio e orientações preciosas.

A todos os funcionários do Inter-laboratório do Centro de Ciências Biológicas, pelo suporte técnico.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Bacteriologia do Centro de Ciências Biológicas, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Ligia Maira dos Santos Rogeri, Carlos Alfredo Salci Queiroz, Kathelin Melo Silva Lascowski e Raquel Girardello pelo apoio e dedicação a este trabalho e pelo incentivo, amizade e presença nos momentos difíceis e em outros especiais.

À CAPES pelo incentivo financeiro prestado ao desenvolvimento desse trabalho.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização desse trabalho.

Na ignorância não conseguiríamos, como não conseguiremos, enxergar o caminho real que Deus traçou a cada um de nós na Terra.

Todos nós sejamos crianças ou jovens, adultos ou já muitíssimo maduros, devemos estudar sempre.

Chico Xavier

ROSS, Claudia. **Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais de pacientes do Hospital Universitário – Londrina - Paraná.** 2006. 102f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RESUMO

Cateteres venosos centrais (CVC) são utilizados com a finalidade de facilitar o diagnóstico e o tratamento de pacientes hospitalizados. Entretanto, o uso destes oferece riscos de infecção local e sistêmica. *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* são agentes etiológicos de infecções relacionadas a CVC e possuem a capacidade de produzir biofilme. A formação do biofilme depende da produção de uma substância chamada *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) sintetizada pelo operon *ica*. O presente trabalho teve por objetivos isolar e identificar microrganismos de pontas de CVC de pacientes internados entre junho de 2003 à junho de 2004, no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Estabelecer o perfil de resistência dos isolados frente a anti-sépticos, desinfetantes, e antimicrobianos e realizar a ribotipagem de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* através da técnica *Ribosome Spacer-Polymerase Chain Reaction* (RS-PCR). Investigar a presença dos genes *icaA* e *icaD* nessas cepas através do método da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), verificar a expressão fenotípica de biofilme através dos testes em Microplaca de Poliestireno (MP) e em Ágar Vermelho Congo (AVC) e avaliar a eficácia desses métodos utilizados na detecção de cepas produtoras de biofilme. Neste estudo, 198 pontas de CVC foram avaliadas e 105 (53%) foram consideradas positivas, pois apresentaram crescimento microbiano igual ou superior a 15 Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os microrganismos mais isolados foram: Estafilococos coagulase-negativa (ECN) (35,2%), *S. aureus* (25,7%), *Klebsiella pneumoniae* (8,5%), *Acinetobacter baumannii* (7,6%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,6%), e *Candida albicans* (4,7%). Todas as bactérias estudadas foram sensíveis ao PVP-I degermante 10%, Clorexidina alcoólica 0,5%, Clorexidina degermante 2%, e ao Ácido peracético 0,5%. Duas (4%) cepas de *Staphylococcus* sp. foram resistentes ao PVP-I tópico 10% e 3 (6%) resistentes ao Hipoclorito de sódio 1%. Entre as bactérias Gram-negativas, 1 (4%) foi resistente ao PVP-I tópico 10% e 4 (16%) resistentes ao Hipoclorito de sódio 1%. O perfil de resistência de cepas de ECN e *S. aureus* aos antimicrobianos foi: ciprofloxacina (81,5 e 91,3%), eritromicina (81,5 e 100%), gentamicina (81,5 e 91,3%), oxacilina (96,3 e 95,7%), penicilina (100%), respectivamente. Nenhuma cepa apresentou resistência a vancomicina. O perfil de resistência apresentado por *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foi: amicacina (100, 75 e 60%), ampicilina-sulbactam (50, 62,5, e 100%) cefotaxima (100%), ceftazidima (100%), ciprofloxacina (100, 87,5, e 40%), gentamicina (100, 100 e 80%), respectivamente. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentaram 37,5% e 75% de resistência ao imipenem, e todas as cepas de *K. pneumoniae* foram sensíveis. Cem por cento (100%) das cepas de *A. baumannii* foram sensíveis ao meropenem e 37,5% das cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes ao meropenem, mas sensíveis a colistina. A tipagem molecular mostrou 6 diferentes perfis de ribotipagem para *S. aureus*. O perfil I foi verificado em 21 (80,8%) das cepas que também foram multiresistentes a antimicrobianos. Destas, 18 (69,2%) cepas de *S. aureus* apresentaram a mesma biotipagem, perfil de resistência a antimicrobianos e ribotipagem. Observou-se que os outros perfis de ribotipagem encontrados (perfil II-VI) estavam associados com cepas de *S. aureus* que mostraram uma menor resistência a antimicrobianos. *S. epidermidis* apresentaram biotipagem e perfil de resistência a antimicrobianos diferentes, porém o mesmo perfil de ribotipagem. Os genes *icaA1* e *icaD1* foram detectados em 22 (95,7%) cepas de *S. aureus* e os genes *icaA2* e *icaD2* em 16 (80%)

cepas de *S. epidermidis*. Todos os isolados estudados de *S. aureus* e 19 (95%) de *S. epidermidis* foram produtores de biofilme em MP. Apenas 1 (4,3%) cepa de *S. aureus* e 7 (35%) de *S. epidermidis* foram positivas em AVC. A identificação de microrganismos isolados em pontas de CVC e o conhecimento do perfil de resistência destes frente aos anti-sépticos, desinfetantes e antimicrobianos são de extrema importância para o controle de infecções e para a determinação de ações terapêuticas e epidemiológicas. A técnica de RS-PCR pode ser usada para tipagem de cepas de *S. aureus*, por ser um método rápido, barato e reprodutível. O método PCR permitiu a detecção de genes *ica* nos isolados analisados de *S. aureus* e *S. epidermidis* e o teste em MP foi mais eficaz para a detecção fenotípica de biofilme do que o AVC.

Palavras-chave: CVC. Microrganismos. Anti-sépticos. Desinfetantes. Antimicrobianos. RS-PCR. Biofilme. AVC. MP.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	23
2.1 GERAL	23
2.2 ESPECÍFICOS	23
REFERÊNCIAS	24
ARTIGO 1	35
Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina	36
Introdução.....	39
Material e métodos	41
Amostragem.....	41
Coleta de amostras de cateteres e isolamento de microrganismos	41
Identificação dos microrganismos	41
Resultados e discussão	42
Referências	46
Tabela	48
ARTIGO 2	49
Perfil de resistência de bactérias isoladas de cateteres venosos centrais a biocidas e ribotipagem de <i>Staphylococcus</i> sp	50
Introdução.....	53
Material e métodos	55
Cepas bacterianas.	55
Teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes.	55
Teste de sensibilidade a antimicrobianos	56
Ribotipagem das cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	57
Resultados.....	57

Teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes.....	57
Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	58
Biotipagem das cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	58
Ribotipagem das cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	59
Discussão.....	60
Referências.....	67
Tabelas.....	72
Figuras.....	76
ARTIGO 3	79
Detection of biofilm formation in <i>Staphylococcus epidermidis</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from central venous catheters, using phenotypic methods and their correlation with the presence of the genes <i>icaA</i> and <i>icaD</i>	80
Introduction.....	82
Methods.....	83
Bacterial strains.....	83
Detection the <i>icaA</i> and <i>icaD</i> genes with PCR.....	83
Phenotypic detection of biofilm formation by the polystyrene microplate assay (PM).....	84
Phenotypic detection of biofilm producers in Congo red agar (CRA).....	84
Results.....	85
Detection of <i>icaA</i> and <i>icaD</i> by PCR.....	85
Phenotypic detection of biofilm formation by polystyrene microplate assay (PM).....	85
Phenotypic detection of biofilm by CRA.....	85
Discussion.....	85
References.....	88
Tables.....	92

1 INTRODUÇÃO

O uso de cateter venoso central (CVC) é indispensável na prática médica porque facilita o tratamento e o diagnóstico do paciente. É usado na terapia intravenosa prolongada, para administração de fluidos, para monitoração hemodinâmica do paciente, e como acesso vascular para hemodiálise. Entretanto, o uso desses cateteres oferece riscos de infecção local e sistêmica, incluindo tromboflebite, endocardite e bacteremia (PUGLIESE, 1997).

O desenvolvimento de polímeros como biomateriais contribui para as práticas modernas de medicina. Vários dispositivos médicos como próteses e cateteres utilizados para tratamento e diagnóstico são constituídos destes polímeros, mas estes oferecem riscos de infecções associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade (ARCIOLA et al., 2002a).

Assim, torna-se imprescindível conhecer os mecanismos pelos quais os microrganismos aderem e colonizam estes dispositivos. E para prevenir infecções relacionadas a biomateriais é necessário compreender a patogênese da infecção (KIEM et al., 2004).

A infecção associada com o uso de dispositivos intravasculares representa 10 a 20% de todas as infecções nosocomiais e é uma das mais frequentes causas de morbidade e mortalidade, representando uma fonte de sepse em pacientes hospitalizados. Aproximadamente 65% dessas infecções resultam da migração de microrganismos da microbiota da pele a partir do sítio de inserção do cateter, 30% da introdução intraluminal pelo sistema de infusão e 5% por outras vias como infusão de fluidos contaminados e focos infecciosos à distância (BOUZA et al., 2002).

O diagnóstico de sepse relacionada a cateter intravascular é baseado em dados clínicos e/ou laboratoriais, com certas limitações. No quadro clínico o paciente apresenta febre, podendo haver ou não sinais inflamatórios no sítio de inserção do cateter. Esses sinais inflamatórios se caracterizam por dor, calor, rubor e edema. Se também houver infecção no sítio de inserção do cateter, pode-se observar a presença de exsudato. A evidência clínica inclui a identificação do mesmo microrganismo, isolado tanto do cateter quanto da hemocultura, ou resolução da febre dentro de 48 horas após a remoção do cateter em pacientes sem uso de antibióticos ou, que não responderam a, no mínimo, 72 horas de antibioticoterapia (O'GRADY et al., 2002).

Vários fatores contribuem para maior risco de infecção, entre eles, período de permanência indefinido, necessidade de curativo diário ou a cada 48 horas no sítio de inserção, tipo de material de que é constituído o cateter. Geralmente, CVC inseridos na veia subclávia oferecem menor risco de infecção, seguida pela veia femural e jugular interna. Cateteres venosos inseridos em veia periférica raramente são causa de sepse devido ao fato de serem usados por um curto período de tempo, normalmente 2 a 3 dias (EGGIMANN et al., 2004).

O material do qual é constituído o CVC pode promover trombogênese e aderência de microrganismos em sua superfície e conseqüente colonização. A resposta imune do paciente e a presença do microrganismo também estariam envolvidas nesta aderência. O paciente reage contra o cateter considerando-o como corpo estranho formando ao seu redor uma cobertura de fibrina que favorece a adesão de microrganismos (DAROUICHE, 1999; BEGHETTO et al., 2002).

Cateteres flexíveis de silicone e poliuretano são menos trombogênicos do que os de polivinil e polietileno, os quais favorecem mais a aderência microbiana. Em estudos com microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp., estes aderiram com mais facilidade a cateteres de polivinil (SHETH et al., 1983; ROTROSEN et al., 1986; BASILE-FILHO et al., 1998).

Outro fator relacionado à infecção associado a CVC diz respeito à presença ou não de múltiplos lumens na constituição do cateter. Estudos sugerem que cateteres de triplo lúmen estão associados com maiores índices de infecção que os cateteres de um único lúmen, uma vez que aumentam o risco de infecção pela presença de um número maior de portas de entrada (APPELGREN, 1987; COUTO et al., 1999). Porém, estudos mostram que cateteres de triplo lúmen normalmente são inseridos em pacientes graves os quais apresentam maior risco de infecção (POWELL et al., 1988; FARKAS et al., 1992; CUNHA e PÓVOA, 1999).

A duração do cateterismo seria o principal fator de risco para infecção relacionada a CVC. Estudos mostram que a cateterização prolongada favorece a infecção (DIENER et al., 1996; DAROUICHE, 1999).

O curativo no sítio de inserção do cateter também pode favorecer a colonização do mesmo e a sepse, pois curativos do tipo oclusivo, podem propiciar o crescimento bacteriano nesse local (CONLY et al., 1989; SADOYAMA e GONTIJO FILHO, 2002).

Outros fatores de risco para infecção relacionada a CVC (IR-CVC) incluem a contaminação do cateter pela própria microbiota do paciente, a manipulação freqüente do cateter pela equipe de saúde sem o uso de equipamentos adequados (luvas e máscaras), a aplicação de anti-sépticos contaminados durante o curativo, o uso de técnica inadequada durante a inserção do cateter, a dissecação para a localização da veia para a inserção do cateter, a colonização da ponta do cateter por disseminação hematogênica de um foco de infecção à distância (SADOYAMA e GONTIJO FILHO, 2002).

Segundo Eggimann et al. (2004), vários estudos mostram diferentes taxas de colonização de cateter e de infecções da corrente sanguínea por microrganismos relacionados a inserção de cateteres. Estas taxas variam de 5,8% a 71,4% para as culturas de pontas de cateteres (CPC) e de 0,3% a 11,0% para bacteremia/sepsis. Essa variabilidade nas taxas de CPC pode ser justificada pelo fato dos estudos serem realizados em diferentes grupos de pacientes bem como do tipo de metodologia adotada para a CPC.

Conhecer os agentes envolvidos na colonização e infecção associada a cateter é importante para a escolha da terapia antimicrobiana adequada e decisão de remoção do mesmo. Os microrganismos utilizam-se de 4 vias de acesso para colonizar o cateter: a) migração da microbiota da pele ao longo da superfície externa do cateter a partir da área de inserção do mesmo; b) contaminação intraluminal do cateter por manipulação do sistema de infusão (conectores) pelos profissionais de saúde; c) administração de fluidos ou medicamentos contaminados; d) focos infecciosos à distância (DAROUICHE, 1999; TRAUTNER e DAROUICHE, 2004).

Os microrganismos que usualmente colonizam a superfície externa do cateter são os Estafilococos coagulase-negativa (ECN) e *S. aureus*, enquanto que patógenos nosocomiais como *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterococcus* sp., e *Candida* sp. freqüentemente colonizam o lúmen do cateter (TRAUTNER e DAROUICHE, 2004).

Outros microrganismos como *Corynebacterium* e *Bacillus* sp. podem estar envolvidos em IR-CVC, sendo introduzidos a partir da pele ou do canhão do cateter (RIEBEL et al., 1986; SALEH e SCHORIN, 1987; BASILE-FILHO et al., 1998). Microrganismos como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são também observados em infecções relacionadas a CVC (PÓVOA et al., 1999; QUESADA et al., 2005).

ECN e *S. aureus* são microrganismos encontrados com relativa freqüência compondo a microbiota normal do corpo humano ou como causa de infecção em seres humanos (COUTO et al., 1999).

Bacilos Gram-negativos têm como habitat o trato gastrointestinal e usualmente colonizam instrumentais, ambientes hospitalares úmidos, e comumente a nasofaringe e pele do paciente. São também contaminantes de infusões e soluções intravenosas administradas através do cateter e podem ser carreados pelas mãos dos profissionais de saúde. Fungo do gênero *Candida* pode ser isolado do tubo digestivo, do intestino, da orofaringe, da vagina e da pele de indivíduos saudáveis (COUTO et al., 1999).

Quanto à colonização de CVC pelos ECN, componentes protéicos do hospedeiro que recobrem o a superfície interna e externa do cateter, permitem a aderência destes microrganismos. Os ECN também possuem a capacidade de aderir à superfície livre do cateter após poucas horas de contato. *S. aureus* por sua vez utilizam o processo de trombogênese em seu benefício para aderir ao cateter. Uma vez aderidas, essas bactérias proliferam formando múltiplas camadas que resultam em biofilme, o qual atua como barreira para os antibióticos, anticorpos, neutrófilos e macrófagos (DUNNE, 2002; GÖTZ, 2002).

Segundo Donlan e Costerton (2002), biofilme é uma comunidade de microrganismos sésseis caracterizada por células que se aderem a um substrato ou interface ou uma as outras, embebidas em uma matriz ou polímero extracelular, que exibem um fenótipo alterado a respeito de crescimento, expressão gênica e produção de proteínas.

Dunne (2002) ressalta que na composição do biofilme há três ingredientes básicos: superfície, microrganismos e glicocálice. Se um destes componentes é removido, o biofilme não se desenvolve.

A camada de biofilme é rica em fibrina e fibronectina, que servem de substrato para a colonização por *S. aureus* e *Candida* sp. ECN aderem somente à fibronectina, além de produzirem um material integrante do biofilme, a substância fibrosa do glicocálice ou matriz extracelular ou polissacarídeo extracelular, o que aumenta a sua aderência e inibe a atuação dos mecanismos de defesa e antimicrobianos (DUNNE, 2002).

Estudos têm mostrado que a formação de biofilme e a aderência de microrganismos em superfícies abióticas ou bióticas dependem de variáveis que incluem a espécie da bactéria, a composição da superfície, os fatores ambientais e os produtos que participam da formação do biofilme (DUNNE, 2002; GÖTZ, 2002).

As propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos) do que às hidrofílicas (vidro ou metais). Estudos mostram que a adesão microbiana se torna melhor com o aumento da hidrofobicidade tanto da superfície celular como do substrato de adesão (DONLAN e COSTERTON, 2002).

A adesão bacteriana pode ser dividida em dois estágios, primária e secundária. O primeiro estágio é reversível e é determinado por variáveis físico-químicas tais como: forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas que vão determinar a adesão entre as duas superfícies, célula bacteriana e a superfície de interesse. Além disso, várias substâncias como proteínas do plasma e outros nutrientes favorecem essa adesão primária (COSTERTON et al., 1995).

Na adesão secundária ocorre uma mediação molecular entre adesinas específicas e superfície. O microrganismo consolida sua adesão através da produção de um complexo exopolissacarídico e/ou ligando receptores específicos presentes nos pili, fimbrias e fibrilas com a superfície do material. No final deste estágio a adesão é irreversível e o microrganismo está aderido à superfície por uma estrutura semelhante a um cogumelo (COSTERTON et al., 1995).

Após este estágio ocorre o processo de maturação do biofilme quando os microrganismos podem se multiplicar, interagir com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente, como proteínas do plasma humano, enquanto outros acabam morrendo. Fatores de controle da maturação do biofilme incluem: pH, perfusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade. Em situações críticas da dinâmica de equilíbrio do biofilme pode ocorrer liberação de microrganismos que poderão colonizar outras superfícies (COSTERTON et al., 1995).

Estudos sugerem que o desenvolvimento primário, a maturação e a ruptura do biofilme podem ser regulados por sinalização célula a célula, através de moléculas sinalizadoras (*quorum-sensing*). Essa regulação ocorreria de forma a controlar a densidade populacional e a expressão gênica dos microrganismos envolvidos no desenvolvimento do biofilme (STICKLER et al., 1998; COSTERTON et al., 1999).

Vários estudos mostram, através da microscopia eletrônica, que *Staphylococcus* sp. produzem biofilme em extensas multicamadas celulares envoltos em uma substância amorfa, chamada *slime*. O biofilme tem sido considerado um dos principais fatores de virulência destas bactérias (ZIEBUHR, et al., 1997; GELOSIA et al., 2001; ARCIOLA et al., 2006).

A adesina polissacarídica intercelular (PIA: *Polysaccharide Intercellular Adhesin*) medeia a adesão bacteriana intercelular e permite o crescimento bacteriano em extensos aglomerados celulares até a formação da estrutura do biofilme. Pode também agir como uma adesina para vidros e provavelmente para outras superfícies hidrofílicas. PIA é um polissacarídeo cuja estrutura é única, sendo uma homoglicana linear composta de

aproximadamente 130 resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,6 com 20% dos resíduos deacetilados e carregados positivamente. É sintetizada *in vitro* a partir de UDP-N-acetilglicosamina pela enzima N-acetilglicosaminil transferase, a qual é codificada pelo gene *icaA* localizado no locus *ica* (intercellular adhesion). Enzimas envolvidas na síntese de PIA são codificadas pelo operon *ica* que é composto pelos genes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC* e o gene regulatório *icaR* (HEILMANN et al., 1996; GERKE et al., 1998; GÖTZ, 2002).

A enzima N-acetilglicosaminil transferase tem sua atividade aumentada quando ocorre a co-expressão de *icaA* e *icaD*. Os oligômeros de N-acetilglicosamina produzidos por *icaAD* atingem um comprimento máximo de 20 resíduos. A interação funcional entre *icaA* e *icaD* é necessária para o estabelecimento das ligações β -1,6 entre os resíduos de N-acetilglicosamina. Somente quando os genes *icaAD* são co-expressados com *icaC* a cadeia completa de PIA é sintetizada. A atividade do gene *icaB* é desconhecida mas sugere-se que este codifica uma deacetilase que remove alguns grupos acetil gerando resíduos de glicosamina carregados positivamente. *icaR*, por sua vez, codifica uma proteína repressora que controla a expressão de PIA (HEILMANN et al., 1996; GERKE et al., 1998; GÖTZ, 2002).

A capacidade de produzir biofilme dependente da presença do operon *ica*, tem papel importante na patogênese de *S. aureus* e *S. epidermidis* e na caracterização de cepas virulentas envolvidas em infecções associadas a dispositivos médicos implantados. A produção e a formação do biofilme parece ser regulada por condições ambientais *in vitro* como anaerobiose, composição do meio de cultivo, condições de stress, temperatura, osmolaridade, concentrações sub-inibitórias de antibióticos e genes acessórios que interferem na expressão do operon *ica*. Essa regulação pode existir *in vivo* e ter um possível papel na patogênese de infecções relacionadas a biomateriais (MACK et al., 2000; KNOBLOCH et al., 2001; GÖTZ, 2002; DOBINSKY et al., 2003; FITZPATRICK et al., 2005).

Cepas *ica*-negativas de *S. aureus* e *S. epidermidis* também podem aderir a biomateriais, e nestes casos ocorreria o envolvimento de outros fatores *ica*-independentes que também medeiam a aderência destas bactérias a estruturas bióticas e abióticas. Tais fatores incluem adesinas presentes na parede celular bacteriana capazes de aderir a componentes presentes na superfície dos polímeros (GÖTZ, 2002).

Nos últimos anos tem ocorrido aumento nas taxas de microrganismos Gram-negativos em CPC e estes vêm sendo considerados patógenos emergentes causadores de infecções da corrente sanguínea relacionada a cateteres intravasculares (AKAN, 2003; PARAGIOUDAKI et al. 2004; QUESADA et al. 2005).

Os bacilos Gram-negativos envolvidos são provenientes do ambiente hospitalar e multiresistentes a antimicrobianos, sendo os mais frequentemente encontrados: *Acinetobacter* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* (ELTING e BODEY, 1990; SEIFERT et al., 1993; DUNNE, 2002).

A. baumannii e *P. aeruginosa* também apresentam propriedades de aderência e formação de biofilme específicas o que favorece colonização e infecção (MAH e O'TOOLE, 2001; BEGHETTO et al., 2002; DUNNE, 2002).

Nos hospitais, espécies do gênero *Candida* são importantes patógenos responsáveis por quadros de candidemias relacionadas a dispositivos intravasculares. Aumento no número de IR-CVC são causadas por esses patógenos oportunistas em pacientes imunodeprimidos (DAROUICHE, 1999; COLOMBO e GUIMARÃES et al., 2003; DAVID et al., 2005). Segundo Akan (2003), taxas de colonização por *Candida* sp. entre 5% a 27% podem ser encontradas.

Candida albicans apresenta como principais fatores de virulência: a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, a morfogênese que auxilia a invasão tissular, uma termotolerância significativa e a produção de enzimas hidrolíticas. A colonização e IR-CVC são devido à sua capacidade de aderência e formação de biofilme semelhante ao mecanismo de *S. aureus* (DAROUICHE, 1999; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

Em trabalho realizado por Pelletier et al. (2000) estes encontraram taxas de incidência de 73,7% para bactérias Gram-positivas, 16,9% para bactérias Gram-negativas e 9,4% para leveduras em CPC, e as infecções da corrente sanguínea relacionada a cateter estavam associadas com um significativo aumento na porcentagem dos microrganismos Gram-negativos em CPC.

Infecções por *Staphylococcus* sp. associadas a biomateriais geralmente não respondem adequadamente a tratamento antimicrobiano e isso pode levar a remoção do dispositivo infectado. Por isso, a necessidade de métodos diagnósticos que identifiquem cepas bacterianas capazes de produzir biofilme (ARCIOLA et al., 2002a).

Para o diagnóstico laboratorial são usadas as técnicas de cultura semi-quantitativa de Maki et al. (1977), cultura quantitativa (CLERI et al., 1980; SHERERTZ et al., 1990) e a hemocultura (COUTO et al., 1999).

A dificuldade em diagnosticar infecções relacionadas a cateteres (IRC) é um problema muito frequente. Como mencionado, a avaliação diagnóstica empregada baseia-se na suspeita clínica de infecção, ou seja, sinais clínicos locais como a presença de dor, calor,

edema, eritema, e exsudato purulento próximo ao local de inserção do cateter, e sinais sistêmicos como temperatura acima de 38 °C, tremores, hipotensão e taquicardia. O diagnóstico usualmente requer hemoculturas colhidas simultaneamente do cateter e de veia periférica e a remoção do cateter para a realização de cultura quantitativa ou semi-quantitativa, sendo que somente 15 % a 25% dos cateteres removidos por suspeita de infecção estão realmente infectados (FILLIPIN et al., 2002; AOKI et al., 2004; QUESADA et al., 2005).

Apesar da alta especificidade do método de hemocultura, este não é usado na rotina da prática clínica, devido a sua complexidade e custos elevados. Já a cultura quantitativa é trabalhosa e cara, o que dificulta sua implementação em laboratórios de análises clínicas. Assim, os critérios laboratoriais para o diagnóstico de IRC baseiam-se na técnica de Maki et al. (1977) a qual consiste do rolamento da ponta (segmento) do cateter em placa de ágar sangue (AS). O diagnóstico definitivo é estabelecido quando o cateter é significativamente colonizado, indicado por cultura positiva com 15 ou mais Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A cultura semi-quantitativa da ponta de cateter é o método mais simples e mais freqüentemente utilizado (HALL e FARR, 2004; LORENTE et al., 2005).

As IRC são definidas pela recuperação de microrganismos de um segmento do cateter associada aos sinais de bacteremia clinicamente aparente ou a infecção local. A presença de 15 ou mais UFC em culturas de pontas de cateteres tem sido associado a uma incidência de 16% de bacteremia. CVC contribuem com 75 a 90% de todas as infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres (CLEMENCE et al., 1995; EGGIMANN et al., 2004; YOSHIDA et al., 2005).

Assim, o diagnóstico das IR-CVC baseia-se em sinais clínicos locais e sistêmicos associados à confirmação laboratorial através de CPC e/ou hemoculturas. O *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda a realização dessas culturas como parâmetro laboratorial para o diagnóstico destas infecções (O'GRADY et al., 2002).

Os microrganismos isolados de pontas de CVC por cultura semi-quantitativa são identificados por técnicas tradicionais ou por sistemas automatizados, sendo inicialmente triados através de suas características morfo-tintoriais, em bacilos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos e fungos leveduriformes (SADOYAMA e GONTIJO FILHO, 2002).

Recentemente o desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido elucidar a base genética da produção de *slime* pelo operon *ica*. Técnicas baseadas em

Polymerase Chain Reaction (PCR) são simples, rápidas e altamente específicas para verificar a presença de genes *ica* envolvidos na expressão fenotípica de PIA (ARCIOLA et al., 2002b). A capacidade de formação de biofilme em *Staphylococcus* pode ser investigada através de método genotípico. A PCR é uma técnica molecular que permite a detecção dos genes que codificam para a síntese de PIA e que compõe o operon *ica* presente em *S. aureus* e *S. epidermidis*. E ainda, representa um método muito seguro para a identificação correta de cepas virulentas produtoras de biofilme (CRAMTON et al., 1999; ARCIOLA et al., 2001a; FITZPATRICK et al., 2002; CHAIEB et al., 2005).

Como mencionado anteriormente, *S. aureus* e *S. epidermidis* são as bactérias Gram-positivas mais freqüentemente associadas com IR-CVC. O estudo da presença e da expressão dos genes *ica* nestas bactérias é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos de adesão e colonização das mesmas, proporcionando subsídios para o desenvolvimento de métodos preventivos e terapêuticos para a erradicação do biofilme.

Entre os métodos fenotípicos clássicos para a detecção da produção de biofilme destaca-se o Teste em Microplaca de Poliestireno (MP) desenvolvido por Christensen et al. (1985) e modificado por Stepanović et al. (2000). Este teste permite a mensuração quantitativa da formação de biofilme em microplacas através de leitura espectrofotométrica. De acordo com essa técnica o microrganismo pode ser considerado desde não produtor até fortemente produtor de biofilme baseado em uma escala definida conforme o valor de leitura da densidade óptica. Trabalhos realizados nos últimos anos aplicam esse método para a caracterização fenotípica de biofilme em bactérias do gênero *Staphylococcus* (RACHID et al., 2000; GELOSIA et al., 2001; SILVA et al., 2002; DOBINSKY et al., 2003; ARCIOLA et al., 2006).

Outro método utilizado é o Teste em Ágar Vermelho Congo (AVC) descrito por Freeman et al. (1989) e empregado por outros pesquisadores em trabalhos recentes (ARCIOLA et al., 2001b; ARCIOLA et al., 2002b; SILVA et al., 2002; KIEM et al., 2004; CHAIEB et al., 2005). Esta técnica é baseada na análise direta das colônias e em uma avaliação cromática subjetiva que permite a identificação de cepas produtoras de biofilme que apresentam coloração preta no AVC, e cepas não produtoras, coloração vermelha.

O conhecimento da resistência bacteriana e a identificação do agente causal nos processos infecciosos são de extrema importância para determinar ações terapêuticas individualizadas e epidemiológicas amplas. O conhecimento de taxas de resistência em determinados ambientes para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas é essencial para o

estabelecimento de estratégias em relação ao uso racional de anti-sépticos, desinfetantes e antimicrobianos.

Anti-sépticos e desinfetantes são amplamente utilizados nos hospitais para o controle e prevenção de infecções nosocomiais. Os anti-sépticos são usados durante o procedimento de inserção do cateter e nos cuidados diários com o sítio de inserção. O PVP-I e a Clorexidina são os anti-sépticos mais utilizados na prevenção de IR-CVC (CARSON, 2004). Os desinfetantes, por sua vez, são utilizados na desinfecção de artigos e de ambientes hospitalares.

Os anti-sépticos e desinfetantes têm em sua composição uma gama de substâncias químicas: fenol, aldeídos, álcool, biguanidas, metais pesados, peróxigênio, compostos halogenados, e compostos quaternários de amônia. Em geral, apresentam maior espectro de ação do que os antibióticos. Enquanto os antibióticos agem em alvos específicos, os anti-sépticos e desinfetantes agem em múltiplos alvos ou estruturas dos microrganismos (DENYER e STEWART, 1998; MCDONNELL e RUSSELL, 1999; POOLE, 2002).

Em hospitais a contaminação ambiental tem sido ligada à transmissão de patógenos nosocomiais importantes. A desinfecção de superfícies ambientais e de artigos hospitalares tem contribuído para a eliminação desses patógenos e conseqüentemente com o decréscimo da aquisição de infecção hospitalar (RUTALA et al., 2000).

O uso contínuo de anti-sépticos e desinfetantes em ambientes hospitalares para o controle dessas infecções também pode desencadear resistência microbiana (MCDONNELL e RUSSELL, 1999; POOLE, 2002; REYNALDO et al., 2004). Aumento na resistência a anti-sépticos e desinfetantes catiônicos, quaternários de amônia, clorexidina, amidinas e acridinas tem sido observado em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a antibióticos. A resistência desses microrganismos pode ser decorrente da aquisição de plasmídios ou de alterações na estrutura da parede celular (MCDONNELL e RUSSELL, 1999; POOLE, 2002; SEKIGUCHI et al., 2004).

O PVP-I é a solução anti-séptica mais utilizada em inserção de CVC, mas vários trabalhos têm mostrado que a Clorexidina tem melhor ação na redução da colonização bacteriana do cateter. O CDC tem recomendado o uso de Clorexidina para cuidados com o sítio de inserção do cateter. A atividade bactericida da Clorexidina não é neutralizada por substâncias orgânicas como ocorre com o PVP-I. Ainda, bactérias têm mostrado resistência ao PVP-I, mas não a Clorexidina (KINIRONS et al., 2001; O'GRADY et al., 2002; SASSONE et al., 2003).

O Hipoclorito de sódio a 1% é freqüentemente utilizado para a desinfecção de ambiente e de artigos hospitalares. Em trabalho realizado por Chitnis et al. (2004) com fluidos corpóreos contaminados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas vistas na prática hospitalar, estes observaram níveis satisfatórios de desinfecção com este agente em várias concentrações, exceto para sangue contaminado com *Staphylococcus* sp.

O uso de antimicrobianos tem contribuído para a redução dos índices de mortalidade e morbidade das doenças infecciosas, mas, a resistência bacteriana a essas substâncias tem aumentado muito nos últimos anos e representa um sério problema de saúde pública. Apesar da disponibilização de novos antibióticos, o ritmo do desenvolvimento da resistência bacteriana representa um constante desafio. Nos anos 1970 e início dos anos 1980, bactérias Gram-negativas resistentes eram o principal obstáculo terapêutico. Atualmente, bactérias Gram-positivas resistentes também ocupam uma posição de destaque (SWARTZ, 2000; ROSSI e ANDREAZZI, 2005).

A resistência a antimicrobianos é um problema para o controle de infecções em hospitais e na comunidade e várias recomendações têm sido feitas com relação a estratégias para controlar o surgimento de patógenos resistentes. A resistência ocorre por mecanismos como a inativação enzimática da droga por diferentes tipos de enzimas, pela alteração da permeabilidade da membrana celular que impede a penetração do antibiótico e sua ação, e pelo efluxo ativo de antibióticos contribuindo para uma concentração inadequada dos mesmos e conseqüentemente uma ação não efetiva (JONES, 1999). Além disso, deve-se levar em consideração que microrganismos que colonizam cateteres e implantes médicos podem formar biofilme que atua como barreira para antibióticos, anti-sépticos e desinfetantes, bem como para a ação do sistema imunológico (DUNNE, 2002).

ECN e *S. aureus* tem mostrado resistência a múltiplos agentes antimicrobianos de uso clínico, dificultando o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos que compreendem um grupo de espécies freqüentemente associadas a infecções nosocomiais ou adquiridas na comunidade, particularmente em pacientes com cateteres ou outros dispositivos médicos implantáveis (TENOVER et al., 1999).

Um aumento na incidência de estafilococos resistentes a oxacilina tem sido verificado em hospitais terciários e/ou de ensino, podendo atingir altas taxas de resistência (GRAY e GEORGE, 2001; HARIHARAN et al., 2003; VON BAUM et al., 2005). Esta situação tem importantes implicações porque freqüentemente o paciente necessita de isolamento e uso de vancomicina para o tratamento da infecção. Estudos têm mostrado o isolamento de cepas de *Staphylococcus* sp., em vários países, com reduzida sensibilidade ou

resistentes a vancomicina (HIRAMATSU et al., 1997; SMITH et al., 1999; WONG et al., 2000; BOBIN-DUBREUX et al., 2001; CHANG et al., 2003; BOZDOGAN et al., 2004; PALAZZO et al., 2005). Além disso, cepas de *Staphylococcus oxacilina* resistentes tem mostrado resistência cruzada a outros grupos de antibióticos como beta-lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas e tetraciclina (SADER et al., 2001; BLATT e PIAZZA, 2004).

Bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* são importantes patógenos nosocomiais responsáveis por infecção em indivíduos imuno-deprimidos e também vêm apresentando altas taxas de resistência aos antimicrobianos de uso clínico, principalmente os isolados de Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) e de hospitais de ensino (QUINN, 1998).

Isolados de *A. baumannii*, principalmente aqueles recuperados de pacientes com infecções nosocomiais, são frequentemente resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas. Imipenem é considerado o mais efetivo agente antimicrobiano contra *A. baumannii*. No entanto, aumento nas taxas de resistência a carbapenêmicos tem ocorrido, devido ao uso indiscriminado de determinados agentes (cefalosporinas, carbapenêmicos, ciprofloxacina e amicacina) em alguns hospitais que tem alta incidência de enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e hiperprodutoras de enzimas AmpC (HSUEH et al., 2002).

Cezário et al. (2004) sugerem que o uso de imipenem para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode estar relacionado com a emergência de cepas multiresistentes de *A. baumannii*.

No Brasil, *P. aeruginosa* apresenta elevadas taxas de resistência aos carbapenêmicos e cerca de 15 a 35% destes são resistentes a todos antimicrobianos disponíveis para uso clínico (SADER et al., 2001; GALES et al., 2001). A polimixina B ou a colistina, embora altamente tóxica, vem sendo utilizada para tratar infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes, mas sensíveis somente a este agente (LEVIN et al., 1999; QUESADA et al., 2005).

Para *K. pneumoniae* as taxas de cepas produtoras de ESBL no Brasil são muito altas embora possam variar de uma região para outra e de um hospital para o outro. Sader et al. (2001), em estudo realizado no Brasil, mostram que em torno de 50% das cepas de *K. pneumoniae* são caracterizadas como produtoras de ESBL. Nos Estados Unidos da América essas taxas são menores que 5% e na Europa entre 15 e 20%. Além disso, cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL têm mostrado resistência *in vitro* aos antimicrobianos

beta-lactâmicos associados a inibidores de beta-lactamases (ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam), mas o mecanismo de resistência envolvido ainda não está completamente elucidado. A baixa atividade desses antimicrobianos também tem sido mostrada em outros trabalhos (GALES et al., 1997; ROLAND et al., 2000; VESPERO, 2004).

O desenvolvimento de resistência bacteriana nos diferentes microrganismos, Gram-positivos e Gram-negativos, representa um constante desafio em todo o mundo. Conhecer os microrganismos e o perfil de resistência destes frente aos anti-sépticos, desinfetantes e antimicrobianos de uso padronizado em hospitais regionais é de extrema importância para se adequar e racionalizar o uso dos mesmos à realidade de cada instituição.

Nas últimas décadas *Staphylococcus* sp. têm se destacado como frequentes agentes etiológicos de infecções locais e sistêmicas associadas a CVC, bem como pela multiresistência aos antimicrobianos de uso hospitalar e resistência a anti-sépticos e desinfetantes.

A tipagem bioquímica, o perfil de antibiogramas e a tipagem molecular de cepas de *S. aureus* podem oferecer subsídios para o entendimento da epidemiologia destes microrganismos nos hospitais e possibilitar a adequação e racionalização do uso de antimicrobianos.

Apesar da eletroforese em campo pulsado (PFGE: *Pulsed-field gel electrophoresis*) ser o método recomendado para a tipagem molecular de cepas de *Staphylococcus* sp., a técnica de *Ribosome Spacer-Polymerase Chain Reaction* (RS-PCR) pode ser de grande valia para tipagem de cepas, principalmente quando envolvidas em surtos hospitalares, uma vez que é um método rápido, barato, reprodutível, e quase tão discriminatório quanto o PFGE (KUMARI et al., 1997). Em procariotos, o *locus* genético do DNA ribossomal (rDNA) contém os genes 16S, 23S e 5S que são separados por regiões espaçadoras que podem exibir seqüências gênero e espécie específicas e certo grau de polimorfismo em nível de gênero e espécie. A amplificação de fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA por RS-PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores selecionados das regiões altamente conservadas que flanqueiam essa região, geram produtos do PCR que podem então ser usados para identificação de gênero e espécie de bactérias e também para a ribotipagem de cepas de *S. aureus* (JENSEN et al., 1993; KUMARI et al., 1997; OLIVEIRA e RAMOS, 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar análise microbiológica de pontas de CVC provenientes de pacientes internados no HU da cidade de Londrina-Paraná no período de junho de 2003 a junho de 2004.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Isolar microrganismos presentes em pontas de CVC através da técnica de cultura semi-quantitativa e identificá-los pelos métodos convencionais e automatizado;
2. Determinar o perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados frente aos anti-sépticos e desinfetantes utilizados no HU;
3. Determinar o perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados frente aos antimicrobianos de uso clínico no HU;
4. Realizar a ribotipagem das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas, através da técnica de RS-PCR;
5. Correlacionar a biotipagem, o perfil de resistência a antimicrobianos e a ribotipagem das cepas *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* isoladas de pontas de CVC;
6. Detectar a presença dos genes *icaA* e *icaD* envolvidos na formação de biofilme nas cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas de pontas de CVC através da PCR;
7. Verificar a expressão fenotípica de biofilme por cepas *S. aureus* e *S. epidermidis* através do teste em MP e cultivo em placas de AVC;
8. Avaliar a eficácia dos métodos fenotípicos (MP, AVC) e genotípico (PCR) utilizados para detecção de cepas *S. aureus* e *S. epidermidis* produtoras de biofilme.

REFERÊNCIAS

AKAN, O.A. Microorganisms isolated from catheter tip cultures: Ibini Sina Hospital 2002. *Journal of Ankara Medical School*, v. 25, n. 3, p. 113-118, Oct. 2003.

AOKI, E.E.; GARCIA, L.B.; PIZOLLITTO, A.C.; PIZZOLITTO, E.L. Uso do método de cultura semi-quantitativa para estudo de bacteremia relacionada ao cateter venoso central utilizado por pacientes em hemodiálise. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 36, n. 3, p. 159-162, Jul. 2004.

APPELGREN, K.N. Triple-lumen catheters. Technological advance or setback? *The American Surgeon*, v. 53, n. 2, p. 113-116, Feb. 1987.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, p.557-562, Mar. 2002a.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 6, p.2151-2156, Jun. 2001b.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; BALDASSARRI, L.; DONATI, M.E.; PIRINI, V.; GAMBERINI, S.; MONTANARO, L. Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 76A, n. 2, p. 425-430, Feb. 2006.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERVELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of optimized congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials*, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, Nov. 2002b.

ARCIOLA, C.R.; COLLAMATI, S.; DONATI, E.; MONTANARO, L. A rapid PCR-method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagnostic Molecular Pathology*, v. 10, n. 2, p.130-137, Jun. 2001a.

BASILE-FILHO, A.; CASTRO, P. de T.O. e; PEREIRA JÚNIOR, G.A.; MARSON, F.; MATTAR JR., L.; COSTA, J.C. da. Sepse primária, relacionada ao cateter venoso central. *Medicina Ribeirão Preto*, v. 31, p.363-368, Jul. 1998.

BEGHETTO, M.; VICTORINO, J.; TEIXEIRA, L.; AZEVEDO, M. Fatores de Risco para infecção relacionada a cateter venoso central. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 14, n. 3, p.107-113, Jul. 2002.

BLATT, J.M.; PIAZZA, C.E. Perfil de sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 36, n. 2, p. 129-131, 2004.

BOBIN-DUBREUX, S.; REVERDY, M.E.; NERVI, C.; ROUGIER, M.; BOLMSTRÖM, A.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 1, p. 349-352, Jan. 2001.

BOUZA, E.; BURILLO, A.; MUÑOZ, P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clinical Microbiology and Infections*, v. 8, n. 5, p. 265-274, May. 2002.

BOZDOGAN, B.; EDNIE, L.; CREDITO, K.; KOSOWSKA, K.; APPELBAUM, P.C. Derivatives of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at Hershey Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; v. 48, n. 12, p. 4762-4765, Dec. 2004.

CARSON, S.M. Chlorhexidine versus povidine-iodine for central venous catheter site care in children. *Journal of Pediatric Nursing*, v. 19, n. 1, p. 74-80, Feb. 2004.

CEZÁRIO, R.C.; RIBAS, R.M.; ABDALLAH, V.O.S.; CARNEIRO, C.L.; GONTIJO FILHO, P.P. Infection and colonization by gram-negative bacilli in neonates hospitalized in high risk nursery at Uberlandia federal university hospital: etiology, resistant phenotypes and risk factors. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 193-198, 2004.

CHAIEB, K.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *The Journal of Hospital Infection*, v. 61, n. 3, p. 225-230, Nov. 2005.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.L.; TENOVER, F.C.; DOWNES, F.P.; SHAH, S.; RUDRICK, J.T.; PUPP, G.R.; BROWN, W.J.; CARDO, D.; FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 14, p. 1342-1347, Apr. 2003.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; BADDOUR, L.M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec. 1985.

CHITNIS V., CHITNIS S., PATIL S., CHITNIS D. Practical limitations of disinfection of body fluid spills with 10,000 ppm sodium hypochlorite (NaOCl). *American Journal of Infection Control*, v. 32, n. 5, p. 306-308, Aug. 2004.

CLEMENCE, M.A.; WALKER, D.; FARR, B.M. Central venous catheter practices: results of a survey. *American Journal of Infection Control*, v. 23, n. 1, p. 5-12, Feb. 1995.

CLERI, D.J.; CORRADO, M.L.; SELIGMAN, S.J. Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *The Journal Infectious Diseases*, v. 141, n. 6, p. 781-786, Jun. 1980.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 599-607, Oct. 2003.

CONLY, J.M.; GRIEVES, K.; PETERS, B. A prospective, randomized study comparing transparent and dry gauze dressings for central venous catheters. *The Journal Infectious Diseases*, v. 159, n. 2, p. 310-318, Feb. 1989.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G.; NOGUEIRA, J.M. *Infecção Hospitalar: epidemiologia e controle*. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

CRAMTON, S.E.; GERKE, C.; SCHNELL, N.F.; NICHOLS, W.W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, Oct. 1999.

CUNHA, J.; PÓVOA, P. Cateteres venosos centrais e infecção: proposta de protocolo. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, v. 8, n. 1, Jun. 1999.

DAROUICHE, R.O. Prevention of vascular catheter-related infections. *The Netherlands Journal of Medicine*, v. 55, n. 3, p. 92-99, Sep. 1999.

DAVID, A.; RISITANO, D.C.; MAZZEO, G.; SINARDI, L.; VENUTI, F.S.; SINARDI, A.U. Central venous catheters and infections. *Minerva Anestesiologica*, v. 71, n. 9, p. 561-564, Sep. 2005.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 41, n. 3, p. 261-268, Apr. 1998.

DIENER, J.R.C.; COUNTINHO, M.S.S.A.; ZOCCOLI, C.M. Infecções relacionadas ao cateter venoso central em terapia intensiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 42, n. 4, p. 205-214, 1996.

DOBINSKY, S.; KIEL, K.; ROHDE, H.; BARTSCHT, K.; KNOBLOCH, J.K.; HORSTKOTTE, M.A.; MACK, D. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesion synthesis. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 9, p. 2879-2886, May. 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

DUNNE, W.M.JR. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p.155-166, Apr. 2002.

EGGIMANN, P.; SAX, H.; PITTET, D. Catheter-related infections. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 11, p. 1033-1042, Sep. 2004.

ELTING, L.S.; BODEY, G. P. Septicemia due to *Xanthomonas* species and non-*aeruginosa Pseudomonas* species: increasing incidence of catheter-related infections. *Medicine*, v. 69, n. 5, p. 296-306, Sep. 1990.

FARKAS, J.C.; LIU, N.; BLERIOT, J.P.; CHEVRET, S.; GOLDSTEIN, F.W.; CARLET, J. Single-versus triple-lumen central catheter-related sepsis: A prospective randomized study in a critically ill population. *The American Journal of Medicine*, v. 93, n. 3, p 277-282, Sep. 1992.

FILLIPIN, T.B.; NUNES, F.B.; CASTAMAN, T.A.; SANTOS, R.C.V.; ALVES FILHO, J.C.F.; OLIVEIRA, J.R. Sepse relacionada ao uso de cateter intravascular. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 34, n. 4, p. 197-199, 2002.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O' GARA, J.P. Evidence for *icaADBC*-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1973-1976, Apr. 2005.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; SMITH, E; KENNEDY, C.A.; O' GARA, J.P. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Hospital Infection*, v. 52, n. 3, p. 212-218, nov. 2002.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, n.8, p. 872-874, Aug. 1989.

GALES, A.C.; BOLMSTRÖM, A.; SAMPAIO, J.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. *The Brazilian Journal Infectious Diseases*, v. 1, n. 4, p. 196-203, Aug. 1997.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; AMPHAL, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clinical Infectious Diseases*, v. 32, p. S146-S155, 2001.

GELOSIA, A.; BALDASSARRI, L.; DEIGHTON, M.; VAN NIGUYEN, T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 7, n. 4, p. 193-199, Apr. 2001.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosyntheses of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, Jul. 1998.

GÖTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, Mar. 2002.

GRAY, J.W.; GEORGE, R.H. Is the incidence of MRSA bacteraemia representative of the rate of MRSA infection in general? *The Journal of Hospital Infection*, v. 49, n. 1, p. 79, Sep. 2001.

HALL, K.; FARR, B. Diagnosis and management of long-term central venous catheter infections. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 15, n. 4, p. 327-334, Apr. 2004.

HARIHARAN, S.; NANDURI, S.B.; MOSELEY, H.S.; ARETI, K.Y.; JONNALAGADDA, R. Spectrum of microbes and antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit, Barbados. *American Journal Infection Control*, v. 31, n. 5, p. 280-287, Aug. 2003.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of inter-cellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, Jun. 1996.

HIRAMATSU, K.; HANAKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 40, n. 1, p.135-136, Jul. 1997.

HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; CHEN, C.Y.; CHEN, W.H.; YU, C.J.; HO, S.W.; LUH, K.T. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 8, p. 827-832, Aug. 2002.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 4, p. 945-952, Apr. 1993.

JONES, R.D. Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. *American Journal Infection Control*, v. 27, n. 4, p. 351-363, Aug. 1999.

KIEM, S.; OH, W.S.; PECK, K.R.; LEE, J.Y.; SONG, J.H.; HWANG, E.S.; KIM, E.C.; CHA, C.Y.; CHOE, K.W. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on capacity adhering to polyurethane surface. *Journal of Korean Medical Science*, v. 19, n. 6, p. 779-782, Dec. 2004.

KINIRONS, B.; MIMOZ, O.; LAFENDI, L.; NAAS, T.; MEUNIER, J.F.; NORDMANN, P. Chlorhexidine versus povidone-iodine in preventing colonization of continuous epidural catheters in children: a randomized, controlled trial. *Anesthesiology*, v. 94, n. 2, p. 239-244, Feb. 2001.

KNOBLOCK, J.K.; BARTSCHT, K.; SABOTTKE, A.; ROHDE, H.; FEUCHT, H.H.; MACK, D. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 8, p. 2624-2633, Apr. 2001.

KUMARI, D.N.; KEER, V.; HAWKEY, P.M.; PARNELL, P.; JOSEPH, N.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 881-885, Apr. 1997.

LEVIN, A.S.; BARONE, A.A.; PENCO, J.; SANTOS, M.V.; MARINHO, I.S.; ARRUDA, E.A.; MANRIQUE, E.I.; COSTA, S.F. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 28, n. 5, p. 1008-1011, May. 1999.

LORENTE, L.; HENRY, C.; MARTIN, M.M.; JIMENEZ, A.; MORA, M.L. Central venous catheter –related infection in a prospective and observational study of 2,595 catheters. *Critical Care*, v. 9, n. 5, p. 631-635, Sep. 2005.

MACK, D.; ROHDE, H.; DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCK, J.K.; ELSNER, H.A.; FEUCHT, H.H. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion and biofilm formation. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 7, p. 3799-3807, Jul. 2000.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 34-39, Jan. 2001.

MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 296, n. 23, p. 1305-1309, Jun. 1977.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 1, p. 147-179, Jan. 1999.

O'GRADY, N.P.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E.P.; GERBERDING, J.L.; HEARD, S.O.; MAKI, D.G.; MASUR, H.; McCORMICK, R.D.; MERMEL, L.A.; PEARSON, M. L.; RAAD, I.I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R.A. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 23, n. 12, p. 759-769, Dec. 2002.

OLIVEIRA, A.M.; RAMOS, M.C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, n. 2, p. 175-180, feb. 2002.

PALAZZO ICV, ARAUJO MLC, DARINI ALC 2005. First report vancomycin-resistant Staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 43: 179-185.

PARAGIOUDAKI, M; STAMOULI, V.; KOLONITSIOU, F.; ANASTASSIOU, E.D.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Intravenous catheter infections associated with bacteraemia: a 2-year study in a university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, n. 5, p. 431-435, May, 2004.

PELLETIER, S. J.; CRABTREE, T.D.; GLEASON, T.G.; PRUETT, T.L.; SAWYER, R.G. Bacteremia associated with central venous catheter infection is not an independent predictor of outcomes. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 190, n. 6, p. 671-680, Jun. 2000.

POOLE, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, v. 92, p. 55S-64S, 2002.

PÓVOA, P; FERNANDES, A.; ALMEIDA, E.; MOREIRA, P.; MEALHA, R.; SABINO, H. Complicações infecciosas do cateterismo venoso central: estudo prospectivo de 1 ano. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, v. 8, n. 1, Jun. 1999.

POWELL, C.; KUDSK, K.A.; KULICH, P.A.; MANDELBAUM, J.A.; FABRI, P.J. Effect of frequent guidewire changes on triple-lumen catheter sepsis. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, v. 12, n. 5, p. 462-464, Sep. 1988.

PUGLIESE, G. Reducing risks of infection during vascular access. *Journal of Intravenous Nursing*, v. 20, n. 6, p. S11-S23, Nov. 1997.

QUESADA, R.M.B.; CARRARA, F.E.; ROSS, C.; CALIXTO, L.A.; ROGERI, L.M.S.; PELAYO, J.S. Culturas de pontas de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 37, n. 1, p. 45-48, 2005.

QUINN, J.P. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 1, p. S117-S124, Aug. 1998.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBURH, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 12, p. 3357-3363, Dec. 2000.

REYNALDO, M.B.; FLORES, M.B.; VIEGAS CAETANO, J.A.; MAGARIÑOS, M. del C. Eficácia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v. 16, n. 3, p. 187-192, Sep. 2004.

RIEBEL, W.; FRANTZ, N.; ADELSTEIN, D.; SPAGNUOLO, P.J. *Corynebacterium JK*: a cause of nosocomial device-related infection. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 8, n. 1, p. 42-49, Jan. 1986.

ROLAND, R.K.; MENDES, R.E.; SILBERT, S.; BOLSONI, A.P.; SADER, H.S. *In vitro* antimicrobial activity of piperacillin/tazobactam in comparison with other broad-spectrum beta-lactams. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 4, n. 5, p. 226-235, Oct. 2000.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2005.

ROTROSEN, D.; CALDERONE, R.A.; EDWARDS, J.E. Jr: Adherence of *Candida* species to host tissues and plastic surfaces. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 8, n. 1, p. 73-85, Feb. 1986.

RUTALA, W.A.; BARBEE, S.L.; AGUIAR, N.C.; SOBSEY, M.D.; WEBER, D.J. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 21, n. 1, p. 33-38, Jan. 2000.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: summary of results from three years of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 5, n. 4, p. 200-214, Aug. 2001.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: experiência de 96 pacientes no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *NewsLab*, v. 54, p. 160-168, 2002.

SALEH, R.H.; SCHORIN, M.A. *Bacillus* spp. sepsis associated with Hickman catheters in patients with neoplastic diseases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 6, p. 851-856, 1987.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.; FIDEL, S.; VIEIRA, M.; HIRATA R. Jr. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *International Endodontic Journal*, v. 36, n. 12, p. 848-852, Dec. 2003.

SEIFERT, H.; STRATE, A.; SCHULZE, A.; PULVERER, G. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 17, n. 4, p. 632-636, Oct. 1993.

SEKIGUCHI, J-I.; HAMA, T.; FUJINO, T.; ARAAKE, M.; IRIE, A.; SARUTA, K., KONOSAKI, H.; NISHIMURA, H.; KAWANA, A.; KUDO, K.; KONDO, T.; SASAZUKI, T.; KURATSUJI, T.; YOSHIKURA, H., KIRIKAE, T. Detection of the antiseptic- and disinfectant-resistance genes *qacA*, *qacB*, and *qacC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Tokyo hospital. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 57, p. 288-291, 2004.

SHERERTZ, R.J.; RAAD, I.I.; BELANI, A.; KOO, L.C.; RAND, K.H.; PICKETT, D.L.; STRAUB, S.A.; FAUERBACH, L.L. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 1, p. 76-82, Jan. 1990.

SHETH, N.K.; FRANSON, T.R.; ROSE, H.D.; BUCKMIRE, F.L.; COOPER, J.A.; SOHNLE, P.G. Colonization of bacteria on polyvinyl chloride and Teflon intravascular catheter in hospitalized patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 18, n. 5, p. 1061-1063, Nov. 1983.

SILVA, G.D. de; KANTZANOU, M.; JUSTICE, A.; MASSEY, R.C.; WILKINSON, A.R.; DAY, N.P.; PEACOCK, S.J. The *ica* operon and biofilm staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 2, p.382-388, Feb. 2002.

SMITH, T.L.; PEARSON, M.L.; WILCOX, K.R.; CRUZ, C.; LANCASTER, M.V.; ROBINSON-DUNN, B.; TENOVER F.C.; ZERVOS, M.J.; BAND, J.D; WHITE, E.; JARVIS, W.R. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 7, p. 493-501, Feb. 1999.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, Apr. 2000.

STICKLER, D.J.; MORRIS, N.S.; McLEAN, R.J.; FUQUA, C. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 9, p. 3486-3490, Sep. 1998.

SWARTZ, M.N. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 8, p. 2009-2016, Aug. 2000.

TENOVER, F.C.; JONES, R.N.; SWENSON, J.M.; ZIMMER, B.; McALLISTER, S.; JORGENSEN, H. Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: results of a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 12, p. 4051-4058, Dec. 1999.

TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R.O. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Archives of Internal Medicine*, v.164, n. 8, p. 842-850, Apr. 2004.

VESPERO, E.C. *Estudo fenotípico e genotípico de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos de amostras de Klebsiella pneumoniae isoladas de pacientes com infecção urinária*. 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

VON BAUM, H.; OBER, J.F.; WENDT, C.; WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B. Antibiotic-resistant bloodstream infections in hospitalized patients: specific risk factors in a high-risk population? *Infection*, v. 33, n. 5-6, p. 320-326, Oct. 2005.

WONG, S.S.; NG, T.K.; YAM, W.C.; TSANG, D.N.; WOO, P.C.; FUNG, S.K.; YUEN, K.Y. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 36, n. 4 p. 261-268, Apr. 2000.

YOSHIDA, T; TSUSHIMA, K.; TSUCHIYA, A.; NISHIKAWA, N.; SHIRAHATA, K.; KANEKO, K; ITO, K.; KAWAKAMI, H.; NAKAGAWA, S.; SUZUKI, T.; KUBO, K.; IKEDA, S. Risk factors for hospital-acquired bacteremia. *Internal Medicine*, v. 44, n. 11, p. 1157-1162, Nov. 2005.

ZIEBÜHR, W.; HEILMANN, C.; GÖTZ, F.; MEYER, P.; WILMS, K.; STRAUBE, E.; HACKER, J. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 3, p. 890-896, Mar. 1997.

ARTIGO 1

Análise microbiológica de pontas de cateteres venosos centrais provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina

Microbiological analysis of the central venous catheter tips from hospitalized patients at Hospital Universitário of Universidade Estadual de Londrina

Claudia Ross¹; Regina Mariuza Borsato Quesada²; Raquel Girardello³, Ligia Maira dos Santos Rogeri⁴; Leandro Augusto Calixto⁴; Jacinta Sanchez Pelayo⁵

Categoria do trabalho: artigo - microbiologia

Área de publicação da Semina: Ciências Biológicas/Saúde

Classificação das áreas/sub-áreas do CNPq: Ciências Biológicas – 2.00.00.00-6

Microbiologia – 2.12.00.00-9

¹ Doutoranda em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

² Docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

³ Mestranda em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

⁴ Acadêmicos de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina – PR, Brasil.

⁵ Docente do Departamento de Microbiologia e Coordenadora do Programa de Mestrado/Doutorado em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina-PR, Brasil. Endereço profissional: Universidade Estadual de Londrina - Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Microbiologia - Campus Universitário, CEP: 86051-970, Londrina-PR, Caixa-Postal: 6001, Fone: (43) 3371-4494, Fax: (43) 3371-4207, E-mail: jspelayo@sercomtel.com.br.

RESUMO

Cateteres venosos centrais (CVC) são utilizados na terapia intravenosa com a finalidade de facilitar o diagnóstico e o tratamento do paciente, permitindo a administração de medicamentos, nutrição parenteral, também como acesso vascular para hemodiálise. Entretanto, o uso desses cateteres oferece riscos de infecção local e sistêmica, incluindo endocardite e bacteremia. O presente estudo teve por objetivo isolar microrganismos de CVC, utilizando a técnica de cultura semi-quantitativa, e identificar os mesmos, mediante provas bioquímicas convencionais e por sistema automatizado. Neste estudo, 198 pontas de CVC foram avaliadas e 105 (53%) foram consideradas positivas, ou seja, apresentaram crescimento microbiano ≥ 15 UFC. Os microrganismos encontrados foram os seguintes: 63,8% de bactérias Gram-positivas, 30,5% de bactérias Gram-negativas e 5,7% de leveduras. Os microrganismos predominantes foram: *Staphylococci* coagulase-negativa (35,2%), *Staphylococcus aureus* (25,7%), *Klebsiella pneumoniae* (8,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,6%), *Acinetobacter baumannii* (7,6%) e *Candida albicans* (4,7%). O aumento da incidência de infecção relacionada a cateter tem sido observado mundialmente, refletindo o aumento de procedimentos médicos invasivos, utilizados para o tratamento de pacientes. Este estudo possibilitou identificar os microrganismos predominantes em pontas de CVC, em um hospital escola da região de Londrina-PR. A identificação destes microrganismos é de extrema importância para se otimizar o tratamento da infecção e se estabelecerem medidas preventivas.

Palavras-chave: Cateter Venoso Central, cultura semi-quantitativa, microrganismos isolados.

ABSTRACT

Central Venous Catheters (CVC) are used in intravenous therapy in order to facilitate diagnosis and treatment. They allow medicine administration, parenteral nutrition and also vascular access in hemodialysis. However, the use of these catheters offers risks of systemic and local infection, including endocarditis and bacteremia. The aim of this study was to isolate microorganisms from CVC utilizing the semiquantitative culture technique, and to identify them through conventional biochemical tests and an automated system. For the study, 198 CVC tips were evaluated and 105 (53%) were considered positive, that is, showed microbial growth ≥ 15 CFU. The microorganisms found were the following: 63.8% Gram-positive bacteria, 30.5% Gram-negative bacteria, and 5.7% yeast. The most isolated were: coagulase-negative *Staphylococci* (35.2%), *Staphylococcus aureus* (25.7%), *Klebsiella pneumoniae* (8.5%), *Pseudomonas aeruginosa* (7.6%), *Acinetobacter baumannii* (7.6%) and *Candida albicans* (4.7%). The increase of infection cases related to catheter has been observed worldwide reflecting the increase of invasive medical procedures used to treat patients. This work allowed the identification of the microorganisms most frequently isolated from CVC tips at a teaching hospital in the region of Londrina-PR. The identification of these microorganisms is extremely important in order to optimize the treatment of the infections and to establish methods of prevention.

Key words: Central Venous Catheter, semiquantitative cultures, isolated microorganisms.

Introdução

Cateteres venosos centrais (CVC) são dispositivos que facilitam o tratamento e o diagnóstico do paciente. São usados na terapia intravenosa prolongada para administração de medicamentos, hemoderivados e soluções de nutrição parenteral, para monitorar a condição hemodinâmica do paciente e como acesso vascular para hemodiálise. Entretanto, o uso desses cateteres oferece riscos de infecção local e sistêmica, incluindo tromboflebite, endocardite, bacteremia e sepse (SADOYAMA; GONTIJO FILHO, 2002; DAVID et al., 2005).

A infecção associada ao uso de dispositivos intravasculares representa 10 a 20% de todas as infecções nosocomiais e é uma das causas mais freqüentes de morbidade e mortalidade, representando uma fonte de bacteremia e sepse em pacientes hospitalizados. Aproximadamente 65% dessas infecções resultam da migração de microrganismos da microbiota da pele, a partir do sítio de inserção do cateter, 30% da introdução de agentes microbianos intraluminal, por meio do sistema de infusão, e 5% por outras vias, como infusão de fluidos contaminados e focos infecciosos à distância. Aproximadamente 20 a 40% dos pacientes com CVC desenvolvem infecção local e 3 a 10% desenvolvem bacteremia e/ou sepse. Os custos de internação e o tempo de permanência hospitalar aumentam significativamente nos pacientes com bacteremia (SADOYAMA; GONTIJO FILHO, 2002; EGGIMANN; SAX; PITTET, 2004).

Os fatores de risco relacionados à infecção por cateteres intravasculares estão associados à duração do cateterismo, o local de inserção, o material do qual é constituído, a presença de múltiplos lumens, a repetição do cateterismo, a manipulação freqüente, o tipo de curativo usado, os microrganismos envolvidos na colonização do cateter, a doença de base e a gravidade do estado clínico do paciente, bem como as condições imunológicas do mesmo (DAROUCHE, 1999; BEGHETTO et al., 2002).

A dificuldade em diagnosticar infecções relacionadas ao uso de cateteres é um problema muito freqüente. A avaliação diagnóstica empregada baseia-se na suspeita clínica de infecção, ou seja, sinais

clínicos locais, como a presença de dor, calor, edema, eritema e exsudato purulento próximo ao local de inserção do cateter, e sinais sistêmicos como temperatura acima de 38 °C, tremores, hipotensão e taquicardia. O diagnóstico usualmente requer hemoculturas colhidas simultaneamente do cateter e de veias periféricas, além da remoção do cateter para a realização de cultura quantitativa ou semi-quantitativa. Embora esse tenha sido o procedimento utilizado, verifica-se que apenas 15 a 25% dos cateteres removidos por suspeita de infecção estejam realmente infectados (AOKI, et al., 2004; QUESADA, et al., 2005).

Apesar da alta especificidade do método de hemocultura, ele é pouco utilizado na rotina da prática clínica, devido a sua complexidade e custos elevados. Por outro lado, a cultura quantitativa é trabalhosa e dispendiosa, e isso dificulta sua implementação em laboratórios de análises clínicas. Assim, a definição dos critérios laboratoriais para o diagnóstico de infecção relacionada ao cateter (IRC) segue a técnica de Maki, Weise e Sarafin (1977), a qual consiste do rolamento da ponta (segmento) do cateter em placa de ágar sangue (AS). O diagnóstico definitivo é estabelecido quando o cateter apresentar cultura positiva com 15 ou mais Unidades Formadoras de Colônia (UFC), dado que constitui índice de infecção. A cultura semi-quantitativa da ponta de cateter é o método mais simples e mais frequentemente utilizado, e existem vários estudos comparando a sua importância (LIÑARES et al. 1985; COLLIGNON et al., 1986; AOKI, et al., 2004; HALL; FARR, 2004).

Os principais microrganismos causadores de IRC são: *Staphylococci* coagulase-negativa (SCN), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp., *Candida* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*. Esses microrganismos são provenientes da própria pele do paciente, do ambiente hospitalar ou veiculados pela equipe de saúde (SEIFERT et al., 1993; TRAUB et al., 2000; DUNNE, 2002; DAVID et al., 2005; QUESADA et al., 2005).

O presente estudo teve por objetivo isolar microrganismos de pontas de CVC por cultura semi-quantitativa e identificar os mesmos, utilizando-se de provas bioquímicas convencionais e por sistema automatizado.

Material e Métodos

Amostragem

Foi realizado um estudo prospectivo que incluiu 198 pontas de CVC, provenientes de pacientes internados no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de Junho de 2003 a Junho de 2004, com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UEL.

Coleta de amostras de cateteres e isolamento de microrganismos

Os cateteres foram retirados assepticamente do paciente e os segmentos distais cortados com tesoura ou bisturi esterelizado, com no máximo 4cm, e colocados dentro de frasco esterelizado e seco, em seguida enviados ao Laboratório de Microbiologia Clínica do HU. Estes foram processados dentro da primeira hora após a coleta e cultivados conforme a técnica semi-quantitativa de Maki, Weise e Sarafin (1977), a qual consiste do rolamento da ponta (segmento) do cateter em superfície de ágar suplementado com 5% de sangue de carneiro (AS). Após 24 a 48 horas de incubação, todas as placas foram inspecionadas quanto ao crescimento de microrganismos. Culturas com contagens iguais ou superiores a 15 UFC por placa foram indicativas de infecção significativa do cateter.

Identificação dos microrganismos

As colônias morfológicamente diferentes, isoladas na placa de AS, foram submetidas à coloração de Gram. As bactérias Gram-negativas (BGN) foram semeadas em ágar MacConkey (MC), incubadas por 24 horas a 37°C. Provas bioquímicas como: oxidase, EPM, MILi, Citrato (TOLEDO; FONTES; TRABULSI, 1982a, 1982b), arginina, ornitina, gelatina e crescimento a 42 e 44°C foram realizadas. Cocos Gram-positivos (CGP), catalase positiva, foram semeados em ágar Manitol (MT), submetidos ao teste de sensibilidade a bacitracina e novobiocina, coagulase e DNase. Quando a catalase foi negativa observou-se a hemólise em AS e realizou-se triagem bioquímica, para identificação das diferentes espécies de estreptococos. Todos os tubos e placas para triagem foram incubados por 24 horas a 37°C. Para identificação presuntiva de *Candida albicans*, foi realizado o teste da formação de tubo germinativo em soro humano fresco, após incubação a 35°C, durante 3 horas. A

estrutura de tubo germinativo pôde ser visualizada em microscópio óptico.

Também foi utilizado o sistema automatizado MicroScan WalkAway® – (Dade-Behring, West Sacramento- Ca, EUA) para confirmar a identificação realizada por provas bioquímicas convencionais.

Os microrganismos isolados foram estocados em ágar estoque (AE) a 4°C e em caldo de triptona de soja (TSB) com glicerol a 15% a -20°C.

Resultados e Discussão

As IRC são definidas pelo isolamento de microrganismos de um segmento do cateter, associadas aos sinais de bacteremia clinicamente aparente ou à infecção local. A presença de 15 ou mais UFC em culturas de pontas de cateteres tem sido associada a uma incidência de 16% de bacteremia. Os CVC contribuem com 75 a 90% de todas as infecções da corrente sanguínea, relacionadas a cateteres (EGGIMANN; SAX; PITTET, 2004; YOSHIDA et al., 2005).

O diagnóstico das IRC baseia-se em sinais clínicos locais e sistêmicos, associados à confirmação laboratorial, mediante culturas de pontas de cateteres (CPC) e/ou hemoculturas. O *Center for Disease Control and Prevention – CDC* (apud O'GRADY et al., 2002) recomenda a realização dessas culturas como parâmetro laboratorial para o diagnóstico das IRC.

Neste estudo, 198 pontas de CVC foram avaliadas, sendo que 105 (53%) foram consideradas positivas, apresenta crescimento microbiano ≥ 15 UFC. Este resultado é semelhante aos obtidos por Cheesbroug, Finch e Burden (1986) os quais relataram que 43,8% dos cateteres avaliados por cultura semi-quantitativa estavam colonizados. Storti (2002), estudando o mesmo material, observou 47,8% de colonização nas pontas de cateter. Segundo Eggiman, Sax e Pittet (2004), vários estudos, demonstrando diferentes taxas de colonização significativa do cateter e de infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateter, podem ser encontrados na literatura. Essas taxas variam de 5,8 a 71,4% para CPC e de 0,3 a 11% para bacteremia e/ou sepse. Essa variabilidade nas taxas de CPC pode ser justificada pelo fato de os estudos terem sido realizados em diferentes grupos de pacientes e para

diferentes terapias em uso de CVC, assim como pelo tipo de metodologia adotada para a CPC.

O processo infeccioso depende da eficiência com que o microrganismo consegue colonizar a pele, causar alterações patológicas no sítio de inserção e disseminar-se para a corrente sanguínea, ou a uma nova área. Jarvis (1996) considera que ocorre aumento do risco de infecção em pacientes imunocomprometidos por estados clínicos graves, em portadores de doenças de base e em extremos de idade.

Conhecer os agentes envolvidos na colonização e infecção por cateter é importante para a escolha da terapia antimicrobiana adequada e decisão de remoção do mesmo, uma vez que estes só devem ser retirados quando houver suspeita clínica ou laboratorial de infecção. Os microrganismos utilizam-se de 4 vias principais de acesso para colonizar o cateter: migração da microbiota da pele ao longo da superfície externa do cateter, a partir da área de inserção do mesmo; contaminação intraluminal do cateter por manipulação do sistema de infusão (conectores) pelos profissionais de saúde; administração de fluidos ou medicamentos contaminados e focos infecciosos a distância (DAROUICHE, 1999; BEGHETTO et al., 2002; TRAUTNER; DAROUICHE, 2004).

Os microrganismos que usualmente colonizam a superfície externa do cateter são os *Staphylococci* coagulase-negativa (SCN) e *Staphylococcus aureus*, enquanto patógenos nosocomiais como *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., e *Candida* sp. frequentemente colonizam o lúmen do cateter (TRAUTNER; DAROUICHE, 2004).

A presente pesquisa revelou que, dentre os microrganismos isolados, 63,8% eram bactérias Gram-positivas, 30,5% bactérias Gram-negativas e 5,7% leveduras. Pelletier et al. (2000) encontraram taxas de incidência de 73,7% para bactérias Gram-positivas, 16,9% para bactérias Gram-negativas e 9,4% para leveduras em CPC. Os autores determinaram que infecções da corrente sanguínea, relacionadas a cateter, estavam associadas com aumento significativo na porcentagem de microrganismos Gram-negativos.

Neste contexto, a Tabela 1 mostra, em ordem numérica decrescente, os microrganismos isolados das pontas de CVC, sendo predominantes SCN (35,2%) e *S. aureus* (25,7 %). Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com os encontrados por vários pesquisadores e relatados pelo *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNIS, 2001), que observaram taxas de 30 a 50% para SCN

e 5 a 20% para *S. aureus*. Esses microrganismos têm sido a causa mais comum de IRC, mas outros Gram-positivos, como *Streptococcus* sp. e *Enterococcus* sp., também podem estar envolvidos (LIÑARES et al., 1985; DIENER; COUNTINHO; ZOCOLLI, 1996; O'GRADY et al., 2002; TRAUTNER; DAROUICHE, 2004; QUESADA et al., 2005; DAVID et al., 2005).

Tabela 1

SCN e *S. aureus* são microrganismos encontrados, com relativa frequência, compondo a microbiota normal ou como causa de infecção em seres humanos. Dessa forma, componentes protéicos do hospedeiro, que estão recobrando a superfície interna e externa do cateter, permitem a aderência destes microrganismos, bem como a colonização do cateter pelos mesmos. SCN também possuem a capacidade de aderir à superfície livre desse dispositivo, após poucas horas de contato. *S. aureus*, por sua vez, utiliza o processo de trombogênese em seu benefício, para aderir e infectar o cateter. Uma vez aderidas, essas bactérias proliferam, formando múltiplas camadas e conseqüentemente o biofilme, o qual atua como barreira para os antibióticos, anticorpos, neutrófilos e macrófagos (DUNNE, 2002; SADOYAMA; GONTIJO, 2002; O'GRADY et al., 2002; QUESADA et al., 2005).

Os microrganismos Gram-negativos como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* foram isolados em taxas significativas, sendo de 8,5; 7,6 e 7,6% respectivamente. Nos últimos anos, tem ocorrido aumento no isolamento de bactérias Gram-negativas em CPC, as quais estão sendo consideradas patógenos emergentes causadores de infecções da corrente sanguínea relacionados a cateteres intravasculares. Estes agentes têm como habitat o trato gastrointestinal, a nasofaringe e a pele do paciente e usualmente colonizam instrumentos cirúrgicos e ambientes hospitalares úmidos. São também contaminantes de infusões e soluções intravenosas administradas, por meio do cateter e podem ser carregados pelas mãos dos profissionais de saúde. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* também apresentam propriedades de aderência e formação de biofilme específicas, o que favorece a colonização e a infecção (BEGHETTO et al., 2002; DUNNE, 2002; QUESADA et al., 2005).

Candida albicans foi o sexto microrganismo mais isolado das pontas de CVC (4,7%). Em estudo realizado por Pawar et al. (2004), foi observada uma taxa significativa de 11,7% de incidência para o gênero *Candida*, ao passo que Bouza, Burillo e Muñoz (2002) relataram uma taxa de 1,9%.

Leveduras do gênero *Candida* podem ser isoladas da boca, do tubo digestivo, do intestino, da orofaringe, da vagina e da pele de indivíduos saudáveis. Nos hospitais são importantes patógenos responsáveis por quadros de candidemias relacionadas a dispositivos intravasculares. Um aumento no número de IRC tem como causa a presença desses microrganismos que se tornam importantes patógenos oportunistas, principalmente para pacientes imunodeprimidos (DAROUICHE, 1999; DAVID et al., 2005).

Candida albicans apresenta, como principais fatores de patogenicidade e virulência, a capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios; o dimorfismo que auxilia a invasão tissular; uma termotolerância significativa e a produção de várias enzimas. A colonização e a infecção do cateter ocorrem devido à sua capacidade de aderência e formação de biofilme, semelhante ao mecanismo apresentado por *S. aureus* (DAROUICHE, 1999; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

O aumento de procedimentos médicos invasivos utilizados para o tratamento de pacientes críticos, tem-se refletido na elevação da incidência de IRC, observada mundialmente. Este estudo possibilitou conhecer os microrganismos mais freqüentemente isolados em pontas de CVC em um hospital-escola da região de Londrina-PR. Portanto, deve-se levar em consideração que a identificação desses microrganismos é de extrema importância para se otimizar o tratamento da IRC, assim como é necessário o estabelecimento de medidas preventivas, relacionadas aos dispositivos intravasculares.

Agradecimentos

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- AOKI, E.E.; GARCIA, L.B.; PIZOLLITTO, A.T.; PIZZOLITTO, E.L. Uso do método de cultura semi-quantitativa para estudo de bacteremia relacionada ao cateter venoso central utilizado por pacientes em hemodiálise. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.36, n.3, p.159-162, 2004.
- BEGHETTO, M.; VICTORINO, J.; TEIXEIRA, L.; AZEVEDO, M. Fatores de risco para infecção relacionada a cateter venoso central. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*, São Paulo, v.14, n.3, p.107-113, 2002.
- BOUZA, E.; BURILLO, A.; MUÑOZ, P. Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Chest*, Northbrook, v.112, p.235-243, 2002.
- CHEESBROUGH, J.S.; FINCH, R.G.; BURDEN, R.P.A. A prospective study of mechanisms of infection associated with hemodialysis catheters. *The Journal of infectious disease*, Chicago, v. 154, n. 4, p. 579-589, 1986.
- COLLIGNON, P.J.; SONI, N.; PEARSON, I.Y.; WOODS, W.P.; MUNRO, R.; SORRELL, T.C. Is semi quantitative culture of central vein catheter tips useful in the diagnosis of catheter-associated bacteremia? *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.24, n.4, p.532-535, 1986.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.36, n.5, p.599-607, 2003.
- DAROUICHE, R.O. Prevention of vascular catheter-related infections. *The Netherlands Journal of Medicine*, The Netherlands, v.55, p.92-99, 1999.
- DAVID, A.; RISITANO, D.C.; MAZZEO, G.; SINARDI, L.; VENUTI, F.S.; SINARDI, A.U. Central venous catheters and infections. *Minerva Anestesiologica*, Torino, v.71, n.9, p.561-564, 2005.
- DIENER, J.R.C.; COUNTINHO, M.S.S.A.; ZOCCOLI, C.M. Infecções relacionadas ao cateter venoso central em terapia intensiva. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v.42, n.4, p.205-214, 1996.
- DUNNE, W.M.JR. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.15, n.2, p.155-166, 2002.
- EGGIMANN, P.; SAX, H.; PITTET, D. Catheter-related infections. *Microbes and infection*, Paris, v.6, p.1033-1042, 2004.
- HALL, K.; FARR, B. Diagnosis and management of long-term central venous catheter infections. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, Chicago, v.15, p.327-334, 2004.
- JARVIS, W.R. The epidemiology of colonization. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, Chicago, v.17, n.1, p.47-52, 1996.
- LIÑARES, J.; SITEGES-SEERRA, A.; GARAU, J.; PÉREZ, J.L.; MARTÍN, R. Pathogenesis of catheter sepsis: a prospective study with quantitative and semi quantitative cultures of catheter hub and segments. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.21, n.3, p.357-360, 1985.
- MAKI, D.G.; WEISE, C.E.; SARAFIN, H.W. A semi quantitative culture method for identifying intravenous catheter infection. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 296, n.23, p.1305-1309, 1977.
- NNIS (NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001. *American Journal of Infection Control*, St. Louis, v.29, n.6, p.404-421, 2001.
- O'GRADY, N.P.; ALEXANDER, M.; DELLINGER, E.P.; GERBERDING, J.L.; HEARD, S.O.; MAKI, D.G.; MASUR, H.; MCCORMICK, R.D.; MERMEL, L.A.; PEARSON, M. L.; RAAD, I. I.; RANDOLPH, A.; WEINSTEIN, R.A. *Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Related Infections - Recommendations

and Reports. 51 (RR10): 1-26, 2002. Disponível em: <[http:// 65.54.246.250/ cgi-bin/](http://65.54.246.250/cgi-bin/). Acesso em 29 mar. 2004.

PAWAR, M.; MEHTA, Y.; PAWAN, K.; SHARMA, J.; GUPTA, A.; TREHAN, N. Central venous catheter –related blood stream infections: incidence, risk factors, outcome, and associated pathogens. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, Philadelphia, v.18, n.3, p.304-308, 2004.

PELLETIER, S. J.; CRABTREE, T.D.; GLEASON, T.G.; PRUETT, T.L.; SAWYER, R. G. Bacteremia associated with central venous catheter infection: is not an independent predictor of outcomes. *Journal of the American College of Surgeons*, New York, v.190, n.6, p.671-680, 2000.

QUESADA, R.M.B; CARRARA, F.E.; ROSS, C.; CALIXTO, L.A.; ROGERI, L.M.S.; PELAYO, J.S. Culturas de pontas de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.37, n.1, p.45-48, 2005.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: experiência de 96 pacientes no hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *NewsLab*, São Paulo, v. 54, p.160-168, 2002.

SEIFERT, H.; STRATE, A.; SCHULZE, A.; PULVERER, G. Vascular catheter-related bloodstream infection due to *Acinetobacter johnsonii* (formerly *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*): report of 13 cases. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v.17, n.4, p.632-636, 1993.

STORTI, A. *Avaliação da microbiologia em ponta de cateter intravenoso, por meio de cultura e a formação de biofilme por meio de microscópio eletrônico de varredura*. 2002. 113p. Tese (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.13. p.309-315, 1982a.

TOLEDO, M.R.F.; FONTES, C.F.; TRABULSI, L.R. MILi - um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.13. p.230-235, 1982b.

TRAUB, B.; WALTER, H.; SCHWARZE, I.; BAUER, D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. *Chemotherapy*, New York, v.46, p.1-14, 2000.

TRAUTNER, B.W.; DAROUICHE, R.O. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Archives of Internal Medicine*, Chicago, v.164, p.842-850, 2004.

YOSHIDA, T; TSUSHIMA, K.; TSUCHIYA, A.; NISHIKAWA, N.; SHIRAHATA, K.; KANEKO, K; ITO, K.; KAWAKAMI, H.; NAKAGAWA, S.; SUZUKI, T.; KUBO, K.; IKEDA, S. Risk factors for hospital-acquired bacteremia. *Internal Medicine*, Tokyo, v.44, n.11, p.1157-1162, 2005.

Tabela 1 – Microrganismos: bactérias e leveduras, isoladas de pontas de cateteres venosos centrais, procedentes de pacientes internados no Hospital Universitário da UEL.

Microrganismos	Nº de isolados	Percentual (%)
Estafilococos coagulase-negativa	37	35,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	25,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09	8,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08	7,6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	08	7,6
<i>Candida albicans</i>	05	4,7
<i>Corynebacterium</i> sp	03	2,9
<i>Enterobacter cloacae</i>	03	2,9
<i>Proteus mirabilis</i>	02	1,9
<i>Escherichia coli</i>	01	1,0
<i>Citrobacter freundii</i>	01	1,0
<i>Candida</i> sp	01	1,0
Total	105	100

ARTIGO 2

TÍTULO RESUMIDO: Resistência de bactérias e ribotipagem**TÍTULO: Perfil de resistência de bactérias isoladas de cateteres venosos centrais a biocidas e ribotipagem de *Staphylococcus* sp.**

Claudia Ross*, Emerson José Venâncio**, Regina Mariuza Borsato Quesada***, Kathelin Melo Silva Lascowski*, Carlos Alfredo Salci Queiroz*, Jacinta Sanchez Pelayo[†]

Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. Caixa postal: 6001. Tel.: (43) 3371-4494, Fax: (43) 3371-4207

*Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

**Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

***Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil

Agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro

[†]Autor correspondente. E-mail: jspelayo@sercomtel.com.br

RESUMO

Objetivos. Estabelecer o perfil de resistência de bactérias isoladas de pontas de cateteres venosos centrais a biocidas e realizar a ribotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Materiais e métodos. O teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes foi realizado como descrito por Litsky e Litsky (1968). A sensibilidade a antimicrobianos foi determinada pela técnica de difusão em disco e pelo método de microdiluição em sistema automatizado. A ribotipagem foi realizada pela técnica de Ribosome Spacer-Polymerase Chain Reaction (RS-PCR).

Resultados. Duas (4%) cepas de *Staphylococcus* sp. foram resistentes ao PVP-I tópico 10% e 3 (6%) ao hipoclorito de sódio 1%. Entre as bactérias Gram-negativas, 1 (4%) foi resistente ao PVP-I tópico 10% e 4 (16%) ao hipoclorito de sódio 1%. A porcentagem de isolados de *Estafilococos* coagulase-negativa e *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos foi: ciprofloxacina (81,5 e 91,3%), eritromicina (81,5 e 100%), gentamicina (81,5 e 91,3%), oxacilina (96,3 e 95,7%), penicilina (100%), respectivamente. Em relação a *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, os isolados foram resistentes a amicacina (100, 75 e 60%), ampicilina-sulbactam (50, 62,5, e 100%), ciprofloxacina (100, 87,5, e 40%), gentamicina (100, 100 e 80%), respectivamente. Esses isolados também foram resistentes a cefotaxima e ceftazidima. *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentaram resistência ao imipenem. Cepas de *P. aeruginosa* (37,5%) foram resistentes ao meropenem. Para *S. aureus* foram observados 6 diferentes perfis de ribotipagem sendo o perfil I verificado em 21 (80,8%) cepas. Destas, 18 (69,2%) cepas ainda mostraram a mesma biotipagem e perfil de resistência a antimicrobianos. *S. epidermidis* apresentaram biotipagem e perfil de resistência a antimicrobianos diferentes, porém o mesmo perfil de ribotipagem.

Conclusão. Observou-se que as bactérias analisadas foram em sua maioria sensíveis aos anti-sépticos e aos desinfetantes de uso hospitalar. As bactérias estudadas mostraram altos níveis de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. A técnica de RS-PCR pode ser utilizada para a ribotipagem de cepas de *S. aureus*.

Palavras-chave: resistência, anti-sépticos, desinfetantes, antimicrobianos, ribotipagem

INTRODUÇÃO

O progresso tecnológico dos procedimentos médicos torna necessário o uso de cateteres venosos centrais (CVC) para facilitar o tratamento e o acompanhamento do paciente hospitalizado. No entanto, esses dispositivos oferecem riscos de infecção, local ou sistêmica, por microrganismos presentes no ambiente hospitalar ou da própria microbiota normal da pele do paciente. A maioria das infecções relacionadas a cateteres (IRC) são causadas por *Staphylococcus* sp., bacilos Gram-negativos e *Candida* sp. (Carson 2004).

Anti-sépticos e desinfetantes são amplamente utilizados nos hospitais para o controle e prevenção de IRC. Os anti-sépticos são usados durante o procedimento de inserção do cateter e nos cuidados diários com o sítio de inserção (Carson 2004). Os desinfetantes, por sua vez, são utilizados na desinfecção de artigos e de ambientes hospitalares.

Os anti-sépticos e desinfetantes têm em sua composição substâncias químicas como: fenol, aldeídos, álcool, biguanidas, metais pesados, peroxigênio, compostos halogenados, e compostos quaternários de amônia. Em geral, estes apresentam maior espectro de ação do que os antibióticos, e agem em múltiplos alvos da parede celular, da membrana citoplasmática e do citoplasma microbiano (Denyer & Stewart 1998, McDonnell & Russell 1999).

O uso contínuo de anti-sépticos e desinfetantes em ambientes hospitalares pode desencadear resistência bacteriana e em alguns casos contribuir para a resistência a antimicrobianos (McDonnell & Russell 1999, Reynaldo et al. 2004).

O uso de antimicrobianos para o tratamento de infecções hospitalares tem contribuído para a redução dos índices de mortalidade e morbidade dessas enfermidades, mas a resistência bacteriana a antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos e representa sério problema de saúde pública. Nos anos 1970 e início dos anos 1980, bactérias Gram-negativas resistentes eram o principal obstáculo terapêutico. Atualmente, bactérias Gram-positivas resistentes também ocupam papel de destaque (Swartz 2000).

Nas últimas décadas *Staphylococcus* sp. têm se destacado como freqüentes agentes etiológicos de infecções locais e sistêmicas associadas a CVC, bem como pela multiresistência aos antimicrobianos de uso hospitalar. A patogênese dessas infecções tem sido relacionada principalmente com a capacidade destes microrganismos de formar biofilme. Estima-se que a formação de biofilmes esteja associada a 65% das infecções nosocomiais (Mah & O'Toole 2001).

O método recomendado para a tipagem de cepas de *Staphylococcus* sp. baseia-se no perfil eletroforético do DNA genômico ribossomal através da eletroforese em campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis-PFGE) devido ao seu alto poder discriminatório. No entanto, este método é extremamente laborioso e exige equipamentos e produtos específicos. Em procariotos o operon que codifica DNA ribossomal (rDNA) contém as seqüências gênicas para as subunidades 16S, 23S e 5S em tandem e separadas por regiões intergênicas (ITS). Essas regiões apresentam um significativo grau de polimorfismo que permite a discriminação do gênero e espécie bacteriana (Jensen et al. 1993). A amplificação de fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rDNA pela técnica Ribosome Spacer-Polymerase Chain Reaction (RS-PCR), gera produtos do PCR que podem ser usados para identificação de gênero e espécie de procariotos. Além disso, essa técnica pode ser empregada para a ribotipagem de *S. aureus* (Jensen et al. 1993, Kumari et al. 1997, Oliveira & Ramos 2002).

O presente estudo teve por objetivos estabelecer o perfil de resistência de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de pontas de CVC de pacientes internados entre junho de 2003 a junho de 2004, no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), frente a anti-sépticos, desinfetantes e antimicrobianos de uso hospitalar; e realizar a ribotipagem de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, no intuito de contribuir para o controle desses microrganismos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas bacterianas

Foram estudadas 50 cepas de *Staphylococcus* sp. e 25 de bactérias Gram-negativas (tabela I) isoladas de pontas de cateteres venosos centrais (CVC) de pacientes internados no período de Junho de 2003 à Junho de 2004, no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UEL.

Foram incluídas neste estudo 3 cepas de *Staphylococcus aureus* (nº 200, 210, 216) e 2 de *S. epidermidis* (nº 206, 212) provenientes de laboratórios de Análises Clínicas da cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

Os microrganismos isolados foram identificados por técnicas convencionais e pelo sistema automatizado MicroScan-WalkAway® (Dade-Behring, West Sacramento, Ca, EUA). Através desse sistema também foram realizadas as biotipagens das cepas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Todos os microrganismos foram armazenados em ágar estoque (AE) a 4°C e em Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA) com glicerol a 15% a -20°C.

Teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes

Foram avaliados os seguintes anti-sépticos: polivinilpirrolidona iodada (PVP-I) tópico 10% (Riodeine, iodopovidona tópica, Rioquímica, São Paulo, Brasil), PVP-I degermante 10% (Riodeine, iodopovidona degermante, Rioquímica, São Paulo, Brasil), digluconato de clorexidina alcoólica 0,5% (Riohex 0,5%, Rioquímica, São Paulo, Brasil), digluconato de clorexidina degermante 2% (Riohex 2%, Rioquímica, São Paulo, Brasil). Quanto aos desinfetantes foram testados o hipoclorito de sódio 1% (Macroquímica, Paraná, Brasil) e ácido peracético/peróxido de hidrogênio 0,5% (Perezal®, Henkel-Ecolab, Alemanha).

Para verificação da esterilidade dos anti-sépticos e desinfetantes utilizados, 1,0 ml de cada produto foi colocado em 4 ml de TSB (Difco). Os tubos foram incubados por 24 h a 37°C e após, semeados em Tryptic Soy ágar (TSA) (Difco) e ágar MacConkey (MC)

(Bióbrás, Minas Gerais, Brasil). Os anti-sépticos e desinfetantes que apresentaram crescimento bacteriano foram descartados.

O teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes foi realizado de acordo com o descrito por Litsky e Litsky (1968) com algumas modificações. As cepas foram inoculadas em 3 ml de TSB (Difco) e incubadas a 37°C até atingirem o padrão de turbidez de 1,0 na escala MacFarland (10^8 Unidades Formadoras de Colônias/ml). Uma alíquota de 0,2 ml dessa suspensão foi adicionada a 0,8 ml de soro fetal bovino (Cutlab, São Paulo, Brasil) utilizado como matéria orgânica, sendo essa mistura adicionada a 4,0 ml dos anti-sépticos e desinfetantes de acordo com a diluição utilizada no hospital. Após a agitação manual durante 1 min os tubos foram deixados a temperatura ambiente durante 5 e 10 min para os anti-sépticos e 10 min para os desinfetantes. Uma alíquota de 0,1 ml dessa mistura foi semeada na superfície de TSA (Difco) com neutralizante tiosulfato de sódio 0,6% (Merck, Alemanha) para os anti-sépticos e para o desinfetante hipoclorito de sódio. Para o ácido peracético foi usado tiosulfato de sódio 0,25%. As placas foram incubadas durante 24-48 h a 37°C e após foram feitas as contagens das colônias. Como controle negativo foram realizados testes com salina 0,85% na ausência de material orgânico.

Em todos os testes foram utilizados microrganismos padrões cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro - RJ), preconizados para a análise de anti-sépticos e desinfetantes: *Staphylococcus aureus* - ATCC 6538, *Escherichia coli* - ATCC 11229, *Salmonella choleraesuis* - ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC15442 (Romão 1992).

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A sensibilidade a antimicrobianos foi avaliada pela técnica de difusão em disco segundo Bauer et al. (1966) e pelo o método de microdiluição em caldo no sistema automatizado MicroScan-WalkAway® (Dade-Behring, West Sacramento, Ca, EUA). Os discos de

antimicrobianos (Cecon®, São Paulo, Brasil; Cefar®, Jurubatuba, São Paulo, Brasil; Laborclin, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil; Newprov®, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) utilizados foram os seguintes: amicacina (30µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), cefalotina (30µg), cefotaxima (30µg), cefoxitina (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (5µg), clindamicina (2µg), colistina (10µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), oxacilina (1µg), penicilina (10UI), piperacilina-tazobactam (100/10µg), rifampicina (5µg), sulfametoxazol-trimetoprima (23.75/1.25µg), tetraciclina (30µg), vancomicina (30µg). O E test (Oxoid, Inglaterra, UK) foi usado para a confirmação de resistência a antimicrobianos. As bactérias foram testadas frente aos principais antimicrobianos utilizados no HU e os resultados interpretados de acordo com os critérios recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005).

Ribotipagem das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*

As 26 cepas de *S. aureus* sendo 23 da coleção do presente estudo (Tabela I) e 3 provenientes de outros laboratórios (nº 200, 210, 216), e as 24 de *S. epidermidis* sendo 22 do presente estudo (Tabela I) e 2 de outros laboratórios (nº 206, 212), foram submetidas a ribotipagem através da técnica de RS-PCR (Ribosome Spacer-Polymerase Chain Reaction) conforme descrita por Kumari et al. (1997).

RESULTADOS

Teste de sensibilidade a anti-sépticos e desinfetantes

Todas as cepas estudadas foram sensíveis aos anti-sépticos: PVP-I degermante 10%, clorexidina alcoólica 0,5%, e clorexidina degermante 2%. Porém, 2 (4%) cepas de *Staphylococcus* sp. (*S. aureus* e *S. haemolyticus*) e 1 (4%) de bactéria Gram-negativa (*Klebsiella pneumoniae*) foram resistentes ao PVP-I tópico 10% (Tabela II).

Quanto aos desinfetantes verificou-se que todas as cepas estudadas foram sensíveis ao ácido peracético 0,5%. Por outro lado, com relação ao hipoclorito de sódio 1%, 3 (6%) cepas

de *Staphylococcus* sp. (1 *S. aureus*, 1 *S. epidermidis*, 1 *S. hominis*) e 4 (16%) de bactérias Gram-negativas (1 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *K. pneumoniae*, 1 *Proteus mirabilis*) foram resistentes (Tabela II).

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O perfil de resistência a antimicrobianos apresentado pelas cepas de Estafilococos coagulase-negativa (ECN) e *Staphylococcus aureus* foi: ciprofloxacina (81,5 e 91,3%), eritromicina (81,5 e 100%), gentamicina (81,5 e 91,3%), oxacilina (96,3 e 95,7%), respectivamente. Nenhuma cepa apresentou resistência a vancomicina e todas foram resistentes a penicilina (Fig. 1).

A Fig. 2 mostra o perfil de resistência a antimicrobianos apresentado pelas cepas *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Klebsiella pneumoniae*: amicacina (100, 75 e 60%), ampicilina-sulbactam (50, 62,5, e 100%), ciprofloxacina (100, 87,5, e 40%), gentamicina (100, 100 e 80%), respectivamente. Todos os isolados das 3 espécies foram resistentes a cefotaxima e ceftazidima. As cepas de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* apresentaram 37,5% e 75% de resistência, respectivamente, ao imipenem, enquanto que todas as cepas de *K. pneumoniae* foram sensíveis. Por outro lado, 80% das cepas de *K. pneumoniae* foram produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (dados não mostrados). Com relação ao meropenem todas as cepas de *A. baumannii* foram sensíveis enquanto 37,5 % das cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes. Já em relação a colistina todos os isolados mostraram-se sensíveis.

Biotipagem das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*

Foram analisadas 26 cepas de *S. aureus*, sendo 23 da coleção do presente estudo e 3 provenientes de outros laboratórios. Verificou-se que 23 cepas apresentaram o biotipo 317177, incluindo entre estas as 3 cepas de outros laboratórios (Tabela III).

Foram analisadas 24 cepas de *S. epidermidis*, sendo 22 da coleção deste estudo e 2

provenientes de outros laboratórios da cidade de Londrina. Entre as cepas de *S. epidermidis* detectou-se vários biotipos, sendo os mais observados: 317164, 307064, 707064 (Tabela IV).

Ribotipagem das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*

Foram analisadas 26 cepas de *S. aureus*, sendo 23 da coleção do presente estudo e 3 provenientes de outros laboratórios. Entre as 23 cepas, 21 (80,8%) apresentaram o mesmo ribotipo. Observou-se que 18 (69,2%) destas cepas de *S. aureus* também apresentaram o mesmo biotipo e perfil de resistência a antimicrobianos. As 3 cepas provenientes de outros laboratórios apresentaram perfis diferentes de ribotipagem (Tabela III).

Os resultados obtidos pela ribotipagem das 26 cepas de *S. aureus* mostraram a presença de 6 diferentes tipos de perfis para *S. aureus*, designados de I, II, III, IV, V e VI. A Tabela III mostra que o perfil I foi detectado em 21 cepas de *S. aureus* que também foram multiresistentes a antimicrobianos, sendo que 20 apresentavam o biotipo 317177 e apenas 1 cepa, o biotipo 713176. Todos os outros ribotipos de II a VI foram observados em apenas 1 cepa.

O perfil II foi detectado em 1 cepa com a biotipagem 313157 e o perfil III em 1 cepa com o biotipo 317157. Os perfis IV, V, VI foram observados nas cepas de *S. aureus* provenientes de outros laboratórios e que apresentaram a mesma biotipagem 317177. Observou-se também que os perfis de ribotipagem de II-VI estavam associados com cepas de *S. aureus* que mostraram menor resistência a antimicrobianos (Tabela III).

Os perfis I, III e IV foram detectados em cepas oxacilina resistentes e os perfis II, V, VI em cepas oxacilina sensíveis. Os fragmentos resultantes do RS-PCR variaram dentro de uma faixa de 350 a 1 300 pares de bases (pb) com 5 a 8 fragmentos por isolados, aproximadamente (Fig. 3).

Foram analisadas 24 cepas de *S. epidermidis* (Tabela IV), sendo 22 da coleção deste estudo e 2 provenientes de outros laboratórios da cidade de Londrina. Estas cepas

apresentaram diferentes biotipos e perfis de resistência a antimicrobianos. No entanto, todas as cepas mostraram o mesmo ribotipo por RS-PCR, designado de perfil I, sendo este totalmente diferente dos perfis encontrados para *S. aureus*. Os fragmentos resultantes variaram dentro de uma faixa de 350 a 1 100 pb com 5 fragmentos por isolados, aproximadamente (Fig. 3).

As cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* provenientes de outros laboratórios foram utilizadas neste estudo com o intuito de validar os resultados encontrados.

DISCUSSÃO

As infecções relacionadas a cateteres venosos centrais (IR-CVC) incluem a infecção local e a sistêmica. A infecção local caracteriza-se por sinais inflamatórios e drenagem purulenta no sítio de inserção do cateter e a infecção sistêmica pela invasão do microrganismo na corrente sanguínea (O'Grady et al. 2002).

Estudos mostram que os principais microrganismos causadores de IR-CVC são *Staphylococcus* sp., provenientes da microbiota de pele do paciente ou veiculados pela equipe de saúde (O'Grady et al. 2002, Quesada et al. 2005), e os bacilos Gram-negativos originados do ambiente hospitalar ou de infecções cruzadas (Dunne 2002, Quesada et al. 2005).

Os microrganismos causadores da IR-CVC colonizam o sítio de inserção do CVC e podem se deslocar pela superfície externa do cateter. Muitas vezes estes microrganismos podem ser introduzidos intra-lúmen e colonizar a superfície interna do cateter. Para prevenir a colonização e a IR-CVC é necessária a realização da anti-sepsia da pele antes do procedimento de inserção do CVC e no cuidado diário com o mesmo (Humar et al. 2000, Rutala et al. 2000, Carson 2004).

No presente estudo verificou-se o perfil de resistência de microrganismos isolados de pontas de CVC frente a anti-sépticos e desinfetantes de uso padronizado no hospital.

Observou-se que a maioria das cepas de *Staphylococcus* sp. e de bactérias Gram-negativas foram sensíveis aos anti-sépticos e aos desinfetantes.

A presença de cepas resistentes aos anti-sépticos e aos desinfetantes pode ser o resultado do uso indiscriminado destes produtos em ambientes hospitalares. Tem sido detectado um aumento do número de cepas resistentes a anti-sépticos e desinfetantes catiônicos, quaternários de amônia, clorexidina, amidinas e acridinas em cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*, o que pode ser decorrente da aquisição de plasmídeos ou de alterações na estrutura da parede celular. Em bactérias Gram-negativas a resistência a anti-sépticos e desinfetantes aparentemente está relacionada à natureza da parede destas bactérias (McDonnell & Russell 1999; Poole 2002).

O PVP-I é a solução anti-séptica mais utilizada em inserção de CVC no hospital em estudo, mas vários trabalhos têm mostrado que a clorexidina tem melhor ação na redução da colonização bacteriana e conseqüente IR-CVC. Inclusive o Center for Disease Control and Prevention (CDC) tem recomendado o uso de clorexidina para cuidados com o sítio de inserção do cateter (O'Grady et al. 2002). A melhor ação da clorexidina está relacionada a sua não neutralização por substâncias orgânicas como ocorre com o PVP-I e ao não surgimento de cepas resistentes a ação da mesma. Além do que, bactérias têm mostrado resistência ao PVP-I, mas não a clorexidina (Hanazaki et al. 1999, Sassone et al. 2003).

O hipoclorito de sódio 1% é uma solução desinfetante freqüentemente utilizada para a desinfecção do ambiente e dos artigos hospitalares. No presente estudo verificou-se que 16% das cepas de bactérias Gram-negativas e 6% das cepas de *Staphylococcus* sp. foram resistentes ao hipoclorito. Estes níveis de resistência podem refletir o uso indiscriminado desse desinfetante no hospital e sugerir o desenvolvimento de resistência bacteriana e a seleção de cepas resistentes a esse desinfetante na concentração de uso (Poole 2002, Chitnis et al. 2004).

Outro problema relacionado ao controle de infecções em hospitais e na comunidade é a resistência a antimicrobianos. A resistência ocorre por mecanismos como a inativação enzimática da droga por diferentes tipos de enzimas, pela alteração da permeabilidade da membrana celular que impede a penetração do antibiótico e sua ação, e pelo efluxo ativo de antibióticos contribuindo para a concentração inadequada dos mesmos e conseqüentemente uma ação não efetiva (Jones 1999). Além disso, deve-se levar em consideração que microrganismos que colonizam cateteres e implantes médicos podem formar biofilme, o qual atua como barreira para antibióticos, anti-sépticos e desinfetantes, bem como para a ação do sistema imunológico (Dunne 2002).

No presente estudo, altos níveis de resistência a oxacilina e a outros antimicrobianos de uso clínico foram detectados em cepas de *Estafilococos* coagulase-negativa (ECN) e *S. aureus*. A incidência de estafilococos resistentes a oxacilina tem aumentado e níveis elevados de resistência têm sido observados. Além disso, cepas oxacilina resistentes têm mostrado resistência cruzada a outros grupos de antibióticos como beta-lactâmicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas e tetraciclina (Sader et al. 2001, Blatt & Piazza 2004, von Baum et al. 2005).

A resistência a oxacilina tem importantes implicações porque freqüentemente o paciente necessita de isolamento e uso de vancomicina para o tratamento da infecção. É importante salientar que todos os isolados deste estudo foram sensíveis a vancomicina, uma alternativa para casos de infecções graves. Outros estudos já têm mostrado o isolamento de cepas de *Staphylococcus* sp. em vários países com reduzida sensibilidade ou resistentes a vancomicina (Hiramatsu et al. 1997, Smith et al. 1999, Bobin-Dubreux et al. 2001, Chang et al. 2003, Palazzo et al. 2005).

No presente estudo as cepas de ECN e *S. aureus* também apresentaram altos níveis de resistência a outros antimicrobianos de uso clínico como: ciprofloxacina, clindamicina,

eritromicina, gentamicina e penicilina. Estes altos níveis de resistência em amostras hospitalares têm sido observados por outros autores (Sader et al. 2001, Almer et al. 2002, Hariharan et al. 2003).

Bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* são importantes patógenos nosocomiais responsáveis por infecção em indivíduos imuno-deprimidos e apresentam altos níveis de resistência a vários antimicrobianos de uso clínico (Quinn 1998).

Neste estudo, as cepas de *A. baumannii* analisadas apresentaram 100 % de resistência a ciprofloxacina, as cefalosporinas de terceira geração e aos aminoglicosídeos testados. Para sulfametoxazol-trimetoprima a resistência foi de 87,5%. Ainda, níveis de resistência de 50% e 37,5% foram verificados para ampicilina-sulbactam e imipenem, respectivamente.

O crescimento da resistência a carbapenêmicos é esperado, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos (cefalosporinas, carbapenêmicos, ciprofloxacina e amicacina) em alguns hospitais, os quais apresentam alta incidência de enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e hiperprodutoras de enzimas AmpC (Hsueh et al. 2002). Cezário et al. (2004) sugerem que o uso de imipenem para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pode estar relacionado com a emergência de cepas resistentes de *A. baumannii*.

É interessante notar que todas as cepas de *A. baumannii* do presente estudo foram sensíveis ao meropenem. Isolados de *A. baumannii*, principalmente aqueles recuperados de pacientes com infecções nosocomiais, são freqüentemente resistentes a múltiplos agentes antimicrobianos, incluindo cefalosporinas, aminoglicosídeos e quinolonas (Hsueh et al. 2002).

No presente estudo, todas as cepas de *P. aeruginosa* mostraram resistência as cefalosporinas de terceira geração (cefotaxima e ceftazidima), a gentamicina e a sulfametozaxol-trimetoprima. Altos níveis de resistência variando entre 62,5% e 87,5%

também foram observados para ciprofloxacina, piperacilina-tazobactam, amicacina, ampicilina-sulbactam.

Ainda, as cepas de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo apresentaram altos níveis de resistência ao imipenem (75%) e ao meropenem (37,5 %), mas todas foram sensíveis a colistina. No Brasil, este microrganismo apresenta altos níveis de resistência aos carbapenêmicos e cerca de 15 a 35% destes são resistentes a todos antimicrobianos disponíveis para uso clínico (Sader et al. 2001, Gales et al. 2001). A polimixina B ou a colistina, embora altamente tóxica, vem sendo utilizada para tratar infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes, sensíveis somente a este agente (Levin et al. 1999).

Entre os bacilos Gram-negativos fermentadores estudados foi observado que 80% das cepas de *K. pneumoniae* são ESBL e que estas apresentaram 100% de resistência as cefalosporinas de amplo espectro. Embora as taxas de cepas produtoras de ESBL possam variar de uma região para outra, de um hospital para o outro, essas taxas no Brasil são muito altas. Sader et al. (2001), em estudo realizado no Brasil, afirmam que mais de 50% das cepas de *K. pneumoniae* foram caracterizadas como produtoras de ESBL. Cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL mostram *in vitro* resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos associados a inibidores de beta-lactamases (ampicilina-sulbactam e piperacilina-tazobactam), mas o mecanismo de resistência envolvido ainda não está completamente elucidado.

Para ampicilina-sulbactam a resistência das cepas de *K. pneumoniae* foi de 100% e para piperacilina-tazobactam 80%. No presente estudo, a resistência a estes antimicrobianos associados foi elevada como mostrado em outros trabalhos (Gales et al. 1997, Roland et al. 2000, Sader et al. 2001). Além do mais, um número significativo de cepas de *K. pneumoniae* mostraram resistência para amicacina (60%), sulfametoxazol-trimetoprima (60%) e ciprofloxacina (40%). Por outro lado, todas as cepas foram sensíveis ao imipenem mostrando

que há poucas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL.

Os resultados do presente estudo mostraram um aumento significativo nos níveis de resistência de todos os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos analisados frente aos antimicrobianos de uso clínico, quando comparados com estudo retrospectivo realizado no mesmo hospital por Quesada et al. (2005), sugerindo o uso indiscriminado desses antimicrobianos no ambiente hospitalar ocasionando a seleção de cepas resistentes.

Considerando os altos níveis de resistência antimicrobianos encontrados entre as cepas de *Staphylococcus* sp. foram realizadas a biotipagem e a ribotipagem das cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* para uma melhor caracterização das cepas descritas neste trabalho.

Quando analisados os resultados da ribotipagem isoladamente verificou-se 6 diferentes perfis (perfis de I a VI) para as cepas de *S. aureus*. A Tabela III mostra que o perfil I foi detectado em 21 (80,8%) cepas de *S. aureus* que também foram multiresistentes aos antimicrobianos. É importante notar que 18 destas cepas mostraram o mesmo biotipo e perfil de resistência a antimicrobianos. Estes resultados em conjunto sugerem a presença de um clone de *S. aureus* presente no ambiente hospitalar. Contudo, para a confirmação desta possibilidade há a necessidade de se realizar técnicas mais sensíveis como PFGE que é capaz de discriminar cepas com o mesmo ribotipo (Kumari et al. 1997). Dentre essas 21 cepas de *S. aureus*, 1 cepa (nº 14) foi resistente ao PVPI-tópico 10%. Ainda, se observou que os outros perfis de ribotipagem encontrados (perfil II-VI) estavam associados com cepas de *S. aureus* que mostraram uma menor resistência a antimicrobianos.

Interessantemente, os achados do presente estudo mostraram uma boa correlação entre o perfil de ribotipagem, de resistência a antimicrobianos e de biotipagem para cepas de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Kumari et al. (1997) e Oliveira e Ramos (2002).

Os resultados ainda mostraram que entre as cepas de *S. epidermidis* existiram diferentes perfis de biotipagem e de resistência a antimicrobianos. Por outro lado, a ribotipagem resultou na identificação de apenas um perfil de fragmentos de DNA indicando baixa sensibilidade da técnica em discriminar entre cepas de *S. epidermidis*.

Apesar de PFGE ser o método recomendado para a tipagem molecular de cepas de *Staphylococcus* sp., a técnica de RS-PCR pode ser de grande valia para a ribotipagem de cepas de *S. aureus*, principalmente quando envolvidas em surtos hospitalares, uma vez que é um método rápido, barato, reprodutível, e quase tão discriminatório quanto o PFGE (Kumari et al. 1997). Para *S. epidermidis* a técnica de RS-PCR foi de pouca utilidade para a tipagem molecular uma vez que detectou apenas um ribotipo.

Neste estudo a técnica de RS-PCR possibilitou identificar e diferenciar as cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* através da obtenção de perfis diferentes para estas cepas. Resultados semelhantes aos apresentados foram observados por Jensen et al. (1993) em estudo de identificação de vários grupos de bactérias usando RS-PCR, que incluiu 8 diferentes gêneros, entre estes: *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Yersinia*.

O desenvolvimento de resistência bacteriana nos diferentes microrganismos, Gram-positivos e Gram-negativos, representa um constante desafio em todo o mundo. Conhecer os microrganismos e o perfil de resistência destes frente aos anti-sépticos, desinfetantes e antimicrobianos de uso padronizado em hospitais regionais é de extrema importância para se adequar e racionalizar o uso dos mesmos à realidade de cada instituição.

REFERÊNCIAS

- Almer LS, Shortridge VD, Nilius AM, Beyer JM, Soni NB, Bui MH, Stone GG, Flamm RK 2002. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43: 225-232.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol* 36: 49-52.
- Blatt JM, Piazza CE 2004. Perfil de sensibilidade de cepas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativo* isolados em pacientes internados. *RBAC* 36: 129-131.
- Bobin-Dubreux S, Reverdy M-E, Nervi C, Rougier M, Bolmström A, Vandenesch F, Etienne J 2001. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 349-352.
- Carson SM 2004. Chlorhexidine versus povidone-iodine for central venous catheter site care in children. *J Pediatr Nurs* 19: 74-80.
- Cezário RC, Ribas RM, Abdallah VOS, Carneiro CL, Gontijo Filho PP 2004. Infection and colonization by gram-negative bacilli in neonates hospitalized in high risk nursery at Uberlandia federal university hospital: etiology, resistant phenotypes and risk factors. *Braz J Microbiol* 35: 193-198.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrick JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 348: 1342-1347.

- Chitnis V, Chitnis S, Patil S, Chitnis D 2004. Practical limitations of disinfection of body fluid spills with 10,000 ppm sodium hypochlorite (NaOCl). *Am J Infect Control* 32: 306-308.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS 2005. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, M100-S15*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 25(1).
- Denyer SP, Stewart GSAB 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *Int Biodeterior Biodegradation* 41: 261-268.
- Dunne, WM Jr 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15: 155-166.
- Gales AC, Bolmström A, Sampaio J, Jones RN, Sader HS 1997. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis* 1: 196-203.
- Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal, R 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect. Dis* 32: S146-S155.
- Hanazaki K, Shingu K, Adachi W, Myazaki T, Amano J 1999. Chlorhexidine dressing for reduction in microbial colonization of the skin with central venous catheters: a prospective randomized controlled trial. *J Hosp Infect* 42: 166-168.
- Hariharan S, Nanduri SB, Moseley HS, Areti KY, Jonnalagadda R 2003. Spectrum of microbes and antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit, Barbados. *Am J Infect Control* 31: 280-287.

- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40: 135-136.
- Hsueh P-R, Teng L-J, Chen C-Y, Chen W-H, Yu C-J, Ho S-W, Luh K-T 2002. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 8: 827-832.
- Humar A, Ostromecki A, Direnfeld J, Marshall JC, Lazar N, Houston PC, Boiteau P, Conly JM 2000. Prospective randomized trial of 10% povidone-iodine versus 0.5% tincture of chlorhexidine as cutaneous antiseptics for prevention of central venous catheter infection. *Clin Infect Dis* 31: 1001-1007.
- Jensen, MA, Webster JA, Straus N 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol* 59:945-952.
- Jones RD 1999. Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. *Am J Infect Control* 27: 351-363.
- Kumari DN, Keer V, Hawkey PM, Parnell P, Joseph N, Richardson JF, Cookson B 1997. Comparison and application of ribosome spacer DNA amplicon polymorphisms and pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 881-885.
- Levin AS, Barone AA, Penco J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, Manrique EI, Costa SF 1999. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 28: 1008-1011.

- Litsky BY, Litsky W 1968. Investigations on decontamination of hospital surfaces by the use of disinfectant-detergents. *Am J Public Health Nations Health* 58:534-543.
- Mah T-F, O'Toole GA 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9: 34-39.
- McDonnell G, Russell, AD 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 147-179.
- O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, Gerberding JL, Heard SO, Maki DG, Masur H, McCormick RD, Mermel LA, Pearson ML, Raad II, Randolph A, Weinstein RA 2002. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23: 759-769.
- Oliveira AM, Ramos MC 2002. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz J Med Biol Res* 35: 175-180.
- Palazzo ICV, Araujo MLC, Darini ALC 2005. First report vancomycin-resistant Staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. *J Clin Microbiol* 43: 179-185.
- Poole K 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J appl Microbiol Symp Suppl* 92: 55S-64S.
- Quesada RMB, Carrara, FE, Ross C, Calixto LA, Rogeri LMS, Pelayo JS 2005. Culturas de pontas de cateteres venosos centrais e perfil de resistência aos antimicrobianos de uso clínico. *RBAC* 37: 45-48.
- Quinn JP 1998. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 27: S117-S124.
- Reynaldo MB, Flores MB, Viegas Caetano JA, Magarinos M Del C. Eficácia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la metilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev Panam Salud Publica* 16: 187-192.

- Roland RK, Mendes RE, Silbert S, Bolsoni AP, Sader HS 2000. *In vitro* antimicrobial activity of piperacillin/tazobactam in comparison with other broad-spectrum beta-lactams. *Braz J Infect Dis* 4: 226-235.
- Romão CMCA 1992. *Métodos para análise microbiológica de saneantes com ação antimicrobianas*. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Rio de Janeiro.
- Rutala WA, Barbee SL, Aguiar NC, Sobsey MD, Weber DJ 2000. Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21: 33-38.
- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN 2001. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 5: 200-214.
- Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R Jr 2003. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine *in vitro*. *Int Endod J* 36: 848-852.
- Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR 1999. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 340: 493-501.
- Swartz MN 2000. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2009-2016.
- von Baum H, Ober JF, Wendt C, Wenzel RP, Edmond MB 2005. Antibiotic-resistant bloodstream infections in hospitalized patients: specific risk factors in a high-risk population? *Infection* 33: 320-326.

TABELA I
Microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de pontas de CVC

Microrganismos	n° de cepas
<i>Staphylococcus aureus</i>	23
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3
<i>Staphylococcus hominis- hominis</i>	1
<i>Staphylococcus hominis- novobiosepticus</i>	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1

TABELA II
Perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* sp. e de bactérias Gram-negativas ao PVP-I tópico 10% e ao hipoclorito de sódio 1% de uso hospitalar

Microrganismos	nº de cepas	PVP-I tópico 10%		hipoclorito de sódio 1%
		5 min	10 min	10 min
<i>Staphylococcus aureus</i>	26 ^a	1	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24 ^a	0	0	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ^b	3	1	1	0
<i>Staphylococcus hominis-hominis</i>	1	0	0	0
<i>Staphylococcus hominis-novobiosepticus</i>	1	0	0	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^c	5	1	0	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	1
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	0	0

^aCepas da coleção do presente estudo e cepas provenientes de outros laboratórios. ^bA cepa resistente ao PVP-I tópico 10% nos tempos de 5 e 10 min é a mesma. ^cA cepa resistente ao PVP-I tópico 10% também foi resistente ao hipoclorito de sódio 1%.

TABELA III
Perfil de resistência e tipagem de cepas de *Staphylococcus aureus*

nº da cepa	Perfil de resistência a antimicrobianos	Biotipo	Ribotipo
13	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	317177	I
14, 17, 22, 26, 31, 35, 48, 54, 67, 69, 70, 96, 97, 119, 120, 121,123, 125	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, TET	317177	I
75	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, TET	713176	I
16	ERI, PEN	313157	II
103	CFL, CFO, ERI, OXA, PEN	317157	III
116	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	317177	I
200 ^a	CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	317177	IV
210 ^a	CLI, ERI, PEN	317177	V
216 ^a	CLI, ERI, PEN	317177	VI

CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxetina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina. ^aCepas provenientes de outros laboratórios da cidade de Londrina.

TABELA IV
Perfil de resistência e tipagem de cepas de *Staphylococcus epidermidis*

nº da cepa	Perfil de resistência a antimicrobianos	Biotipo
3	CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF, TET	307064
4	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, OXA, PEN	307064
5	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	217164
8	1 CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	202020
28	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	337764
45	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	757164
84	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	307064
92, 102	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, RIF	707064
20	CIP, CFL, CFO, OXA, PEN	317164
23	CFL, CFO, GEN, OXA, PEN	317164
24	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	317164
29	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	307064
39	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	317064
57	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	707064
60	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	703064
63	CIP, CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN	317364
32	CLI, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, TET	317164
49	CIP, CFL, CFO, OXA, PEN, RIF	717064
98	CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, TET	317164
111	CIP, CFL, CFO, ERI, GEN, OXA, PEN, TET	313164
126	CIP, CFO, CFL, OXA, PEN, TET	317164
206 ^a	CFO, OXA, PEN	307120
212 ^a	PEN	303164

CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; CFL: cefalotina; CFO: cefoxetina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina. ^aCepas provenientes de outros laboratórios da cidade de Londrina.

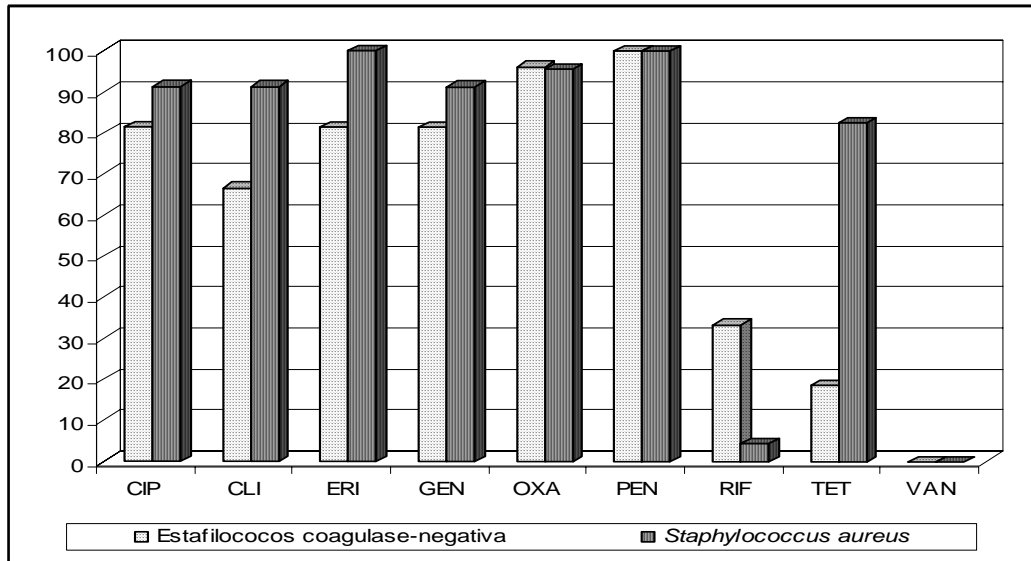


Fig. 1: distribuição em percentagem das cepas resistentes de Estafilococos coagulase-negativa e *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de uso clínico. CIP: ciprofloxacina; CLI: clindamicina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina; RIF: rifampicina; TET: tetraciclina; VAN: vancomicina.

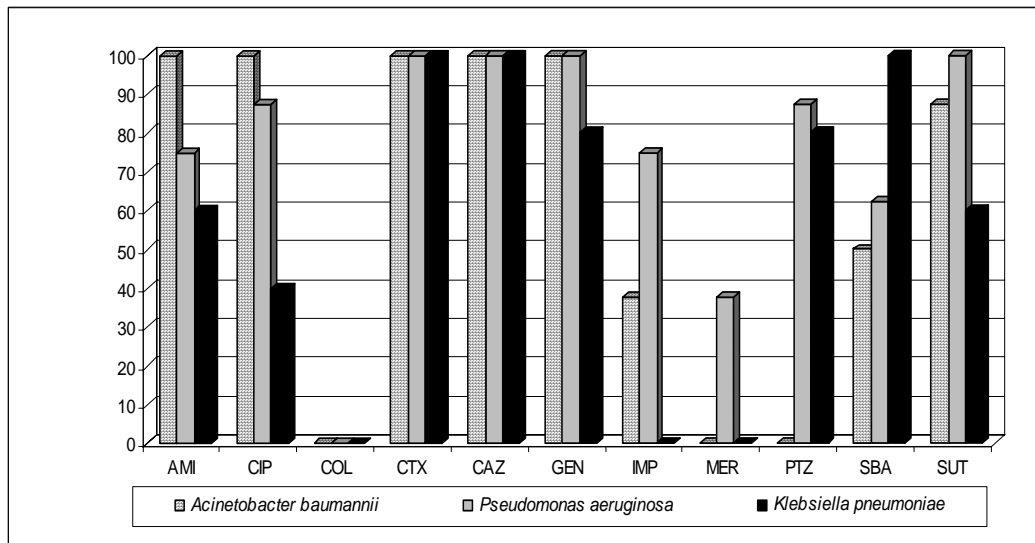


Fig. 2: distribuição em percentagem das cepas resistentes de bacilos Gram-negativos aos antimicrobianos de uso clínico. AMI: amicacina; CIP: ciprofloxacina; COL: colistina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; GEN: gentamicina; IMP: imipenem; MER: meropenem; PTZ: piperacilina-tazobactam; SBA: ampicilina-sulbactam; SUT: sulfametoxazol-trimetoprima. Para *A. baumannii* não foram testados COL e PTZ. Para *K. pneumoniae* não foram testados COL e MER.

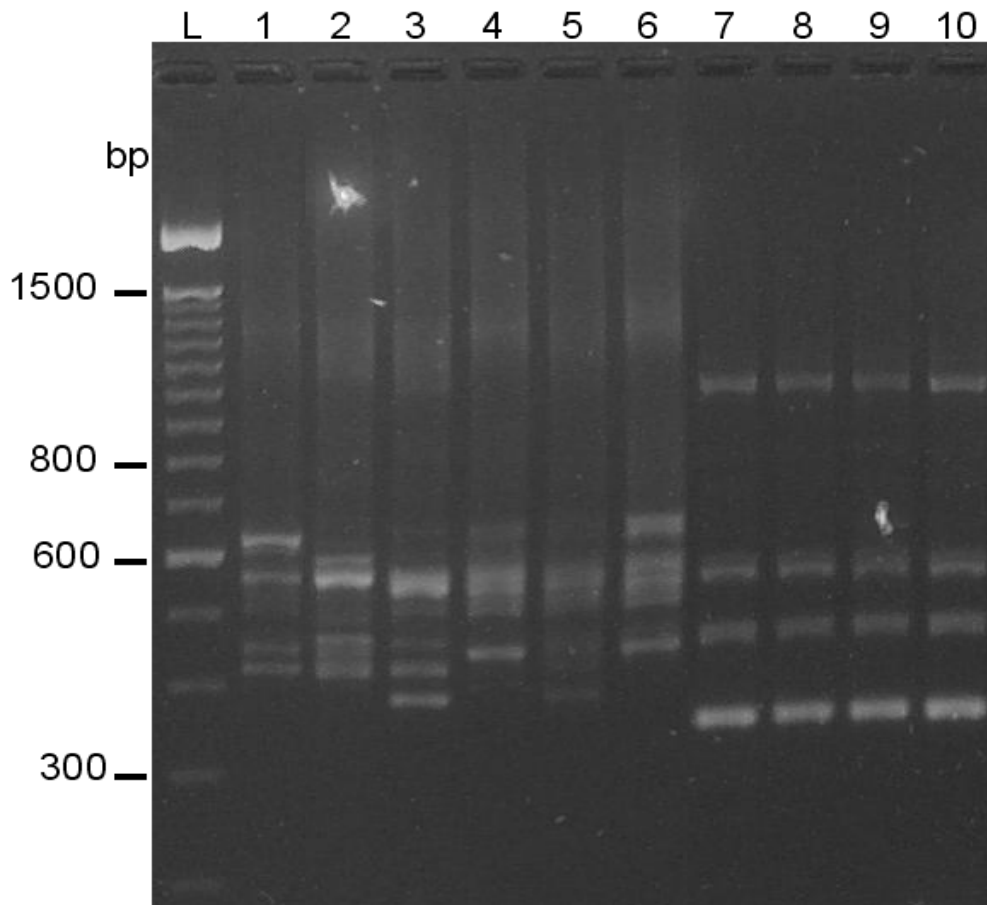


Fig. 3: RS-PCR de cepas representativas de *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* isoladas de pontas de CVC de pacientes internados no HU da UEL e de cepas representativas de *S. aureus* e *S. epidermidis* provenientes de outros laboratórios da cidade de Londrina-PR-Brasil. L: 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); 1: cepa de *S. aureus* (nº 14) com perfil 1; 2: cepa de *S. aureus* (nº 16) com perfil 2; 3: cepa de *S. aureus* (nº 103) com perfil 3; 4: cepa de *S. aureus* (nº 200) com perfil 4; 5: cepa de *S. aureus* (nº 210) com perfil 5; 6: cepa de *S. aureus* (nº 216) com perfil 6; 7-10: cepas de *S. epidermidis* com perfil 1.

ARTIGO 3

Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from central venous catheters, using phenotypic methods and their correlation with the presence of the genes *icaA* and *icaD*

Claudia Ross^a, Emerson José Venâncio^b, Regina Mariuza Borsato Quesada^c, Raquel Girardello^a, Jacinta Sanchez Pelayo^{a*}

^aDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

^bDepartamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

^c Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

Abbreviated Title: **Detection of biofilm formation in *Staphylococcus* sp.**

* Corresponding author. Address: Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Campus Universitário, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil. Caixa postal: 6001. Tel.: (43) 3371-4494, Fax: (43) 3371-4207.

E-mail address: jspelayo@sercomtel.com.br

Summary

S. aureus and *S. epidermidis* are important etiologic agents of infections related to central venous catheters (CVC) which have the capacity to produce biofilms. The formation of biofilms depends on the production of a substance called polysaccharide intercellular adhesin (PIA) whose synthesis is controlled by the *ica* operon. The aim of the present study was: to investigate the presence of the genes *icaA* and *icaD* using the polymerase chain reaction (PCR) in a collection of 43 strains of *Staphylococcus* sp. (23 strains of *S. aureus* and 20 of *S. epidermidis*), to characterize these microorganisms with respect to the production of biofilm using the polystyrene microplate (PM) and Congo red agar (CRA) methods; and to determine the efficacy of the methods utilized. In this study, the *icaA1* and *icaD1* gene sequences were found in 22 (95.7%) strains of *S. aureus* and *icaA2* and *icaD2* gene sequences in 16 (80%) strains of *S. epidermidis*. All 23 (100%) isolates of *S. aureus* and 19 (95%) of *S. epidermidis* were found to be biofilm producers with the PM assay. Only 1 (4.3%) strain of *S. aureus* and 7 (35%) of *S. epidermidis* were positive in the CRA assay. In the present study, the PM assay was more effective than CRA in detecting the biofilm phenotype.

keywords: biofilm detection; *ica* genes; polystyrene microplate; Congo red agar.

Introduction

Staphylococcus aureus and *S. epidermidis* are important etiologic agents of infections related to intravascular catheters.¹ It has been shown that *S. aureus* and *S. epidermidis* are capable of forming biofilms. Biofilm formation involves two stages. Initially, bacteria adhere to the catheter by complex processes through physico-chemical interactions involving protein components of the cell surface and polysaccharides, and later adhered bacteria proliferate and accumulate in multiple layers forming a biofilm.^{2,3}

The formation of biofilms depends on the production of an exopolysaccharide substance called polysaccharide intercellular adhesin (PIA). PIA mediates intercellular bacterial adhesion and allows bacterial growth in extensive cellular agglomerates resulting in the formation of a biofilm structure. It is a polysaccharide whose structure is unique, where it is a linear homoglycan composed of N-acetylglycosamine connected by β -1,6 linkages. It is synthesized *in vitro* from UDP-N-acetylglycosamine by the enzyme N-acetylglycosaminyl transferase, which is encoded by the gene *icaA* localized at the *ica* (intercellular adhesion) locus. Enzymes involved in the synthesis of PIA are coded by the *ica* operon which comprises the genes *icaA*, *icaD*, *icaB* and *icaC* and the regulatory gene *icaR*.^{3,4,5}

The functional interaction between *icaA* and *icaD* is necessary for the establishment of β -1,6 linkages between N-acetylglycosamine residues. Only when the *icaAD* genes are co-expressed with *icaC* is the chain complete and PIA synthesized. The activity of the gene *icaB* is unknown, but it is believed to code for a deacetylase that removes some acetyl groups producing positively charged glycosamine residues. *icaR* in turn is a gene repressor controlling the expression of PIA synthesis.^{3,4,5}

The capacity to produce biofilms, dependent on the presence of the *ica* operon, plays an important role in the pathogenesis of *S. aureus* and *S. epidermidis* and in the characterization of virulent strains involved in infections associated with implantable medical devices. Biofilm favors the adherence of microorganisms and their maintenance, because it impedes the action of the immune system of the individual and of the antimicrobial agents. In the specific case of central venous catheters (CVC), these microorganisms can cause local and/or systemic infection.⁶⁻⁸

The capacity of biofilm formation of *Staphylococcus* can be investigated by genotypic and

phenotypic methods. PCR (polymerase chain reaction) is a molecular technique that permits the detection of genes that code for the synthesis of PIA and that comprise the *ica* operon present in *S. epidermidis* and *S. aureus*.^{2,9-11}

Among the classic phenotypic methods for the detection of biofilm production, the one that stands out is the polystyrene microplate (PM) assay developed by Christensen *et al.*¹² and modified by Stepanović *et al.*¹³ This assay allows the quantitative measurement of the formation of biofilm in microplates by spectrophotometric reading.

Another method utilized is the Congo red agar assay (CRA) described by Freeman *et al.*, which allows the identification of biofilm producing strains which stain black, in contrast to red-staining non producers.¹⁴

The aim of the present study was to investigate the presence of the *icaA* and *icaD* genes using PCR in a collection of 23 strains of *S. aureus* and 20 of *S. epidermidis* isolated from CVC tips; to characterize these microorganisms with respect to biofilm production using the phenotypic assays PM and CRA; and to determine any correlation between the phenotypic methods of detecting biofilm production and genotyping for the *icaA* and *icaD* genes.

Methods

Bacterial strains

In this study, 43 strains of *Staphylococcus* sp. were examined, where 23 were of *S. aureus* and 20 of *S. epidermidis*, isolated from CVC tips of patients admitted during the period of June, 2003 to June, 2004 at University Hospital (HU), State University of Londrina (UEL), with the approval of the Ethics in Research Committee of UEL. The microorganisms isolated were stored in stock agar at 4 °C and in tryptic soy broth (TSB) (Difco, Detroit, MI, USA) with 15% glycerol at -20 °C.

The strains of *S. aureus* (ATCC 35556) and *S. epidermidis* (ATCC 35984), biofilm producers, were used as positive controls in all the experiments carried out.

Detection the *icaA* and *icaD* genes with PCR

All 43 *Staphylococcus* isolates were screened for the presence of the *icaA* and *icaD* genes. The detection of the *icaA* and *icaD* genes was carried as described by Arciola *et al.*¹⁵ Table I shows the

primer sequences, sizes of amplified DNA fragments, and conditions and cycles of amplification for all sequences studied.

Phenotypic detection of biofilm formation by the polystyrene microplate assay (PM)

Adhesion to an inert surface was assayed employing the method described by Stepanovic *et al.*¹³ Bacterial isolates were grown overnight at 37 °C in TSB (Difco) supplemented 1% glucose (TSBG) (Difco). The cultures were diluted 1:200 in TSBG, and 200 µL of this suspension were added to sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, Naperville, IL, USA), and incubated for 24 h at 37°C. TSBG alone was used as negative control. After this period, the content of each well was aspirated, and the wells were washed three times with 250 µL of sterile physiological saline (PS). The attached bacteria were fixed with 200 µL of 99% methanol (Merck, Darmstadt, Germany) per well, and after 15 min the plates were emptied and allowed to dry. The plates were stained for 5 min with 200 µL of 2% Hucker crystal violet per well. Excess stain was rinsed off by placing the plate under running tap water. The plates were air-dried, and the optical density (OD) of each well was measured at 570 nm with a Micro-ELISA Autoreader (MultiScan EX, LabSystem, Uniscience). All the assays were performed in triplicate and the mean OD (ODa) was used to determine the degree of adherence. This value was compared with the OD of the TSBG. To determine the degree of adherence, the following classification was used: non-adherent ($ODa \leq OD$), weakly adherent ($OD < ODa \leq 2 \times OD$), moderately adherent ($2 \times OD < ODa \leq 4 \times OD$) and strongly adherent ($4 \times OD < ODa$).

Phenotypic detection of biofilm producers in Congo red agar (CRA)

All of the bacteria studied in this work were seeded in CRA plates to detect the production of biofilm. CRA medium was prepared by adding 0.8 g Congo red (Sigma) and 36 g saccharose (Sigma) to 1 L of brain heart infusion agar (BHI) (Oxoid, Hampshire, UK). The samples of *Staphylococcus* sp. were grown in BHI broth (Oxoid) at 37 °C for 24 h. After, they were seeded in CRA and incubated at 37 °C for 48-72 h for strains *S. aureus* and for 24 h for strains of *S. epidermidis*. Afterward, the plates were kept at room temperature for 24 h and then read. The samples that showed black colonies in CRA were considered biofilm producers, and those stained red, non producers.¹⁵

Results

Detection of *icaA* and *icaD* by PCR

The *icaA1* and *icaD1* genes were found in 22 (95.7%) strains of *S. aureus* (Table II) and *icaA2* and *icaD2* genes in 16 (80%) strains of *S. epidermidis* (Table III).

Phenotypic detection of biofilm formation by polystyrene microplate assay (PM)

All of the isolates of *S. aureus* examined were biofilm producers with PM. Of these, 13 strains (56.6%) showed the strongly adherent phenotype, 5 (21.7%) the moderately adherent and 5 (21.7%) the weakly adherent (Table II). Nineteen (95%) strains of *S. epidermidis* studied were biofilm producing. Among these, 6 (30%) isolates showed the strongly adherent phenotype, 9 (45%) the moderately adherent, 4 (20%) the weakly adherent. Only 1 (5%) strain was not a biofilm producer using the PM assay (Table III).

Phenotypic detection of biofilm by CRA

Of the 43 strains of *Staphylococcus* studied only 1 (4.3%) of *S. aureus* and 7 (35%) of *S. epidermidis* were positive with CRA (Tables II and III).

Discussion

Biofilm plays an important role in the adherence of pathogenic microorganisms to polymers that constitute prostheses and catheters.^{17,18} Microorganisms often involved in infections related to this type of material have been shown to be *S. aureus* and *S. epidermidis*, whose formation of biofilm is mediated by an exopolysaccharide substance known as PIA, a product of the *ica* operon. Biofilm has been considered the major factor of the virulence of these bacteria.^{3,4,5}

The present study investigated the presence of the genes *icaA* and *icaD* in a collection of 23 strains of *S. aureus* and 20 of *S. epidermidis* isolated from CVC tips by the PCR technique. Of the isolates examined, 95.7% of *S. aureus* and 80% of *S. epidermidis* were positive for the genes *icaA* and *icaD*. The result obtained for *S. aureus* differs from that of Arciola *et al.* who found 61% of *S. aureus* isolates from intravenous catheters positive for *icaA* and *icaD*.¹⁵ The reason for this difference appears to be that Arciola *et al.* did not use specific primers for *icaA* and *icaD* of *S. aureus* but did in the case of *S. epidermidis*. In works by other investigators, 100% of *S. aureus* isolates studied were found to be *ica* positive when utilizing specific primers.^{2,19} In relation to frequency of the genes *icaA* and *icaD* in

strains of *S. epidermidis*, the finding of 80% positivity is in accordance with the values reported by other investigators.²⁰⁻²² Meanwhile, other works show positive rates for *ica* operon in *S. epidermidis*, varying 40% to 70%.^{10,11,15,23}

All of the strains used in this study were submitted to the classic detection methods for the biofilm producing phenotype, that is, the PM and CRA assays. The production of biofilm appears to be regulated by environmental conditions *in vitro* which interfere in the expression of the *ica* operon. This regulation can exist *in vivo* and possibly play a role in the pathogenesis of infections related to biomaterials.^{3,24-27}

The PM assay does not allow the direct detection of PIA, but does make it possible to measure quantitatively bacterial biofilm.^{10,20,23,28-30} All of the isolates of *S. aureus* (100%) examined were biofilm producers in PM. A similar result (88.9%) was found by Ammendolia *et al.*³¹ On the other hand, in a study by Knobloch *et al.*, only 57.1% of the isolates of *S. aureus* showed the positive phenotype in PM.³² However, negative results were also found for all the samples studied by other investigators.^{2,16,33} The discrepancy among these results can be explained by the involvement of environmental factors which interfere in the regulation of the expression of the *ica* operon and consequently with biofilm formation *in vitro*. With the PM assay, 95% of the isolates of *S. epidermidis* were also shown to be biofilm producers. This percentage was higher than those found by others where levels varied 61% to 87%.^{14,20,21,23} Only one strain of *ica* positive *S. epidermidis* showed the negative phenotype in PM, probably due to the involvement of environmental factors interfering in biofilm formation *in vitro*. However, the occurrence of the formation of biofilm in the PM assay by *ica*-negative strains of *S. aureus* (1) and *S. epidermidis* (4) can be explained by the involvement of *ica*-independent factors which mediate the adherence of these bacteria. Such factors include adhesins present in the bacterial cell wall capable of adhering to components present on the surface of polymers.³

The CRA assay is not a quantitative method, but has been widely utilized for the identification of strains of *Staphylococcus* sp. that are producers and non-producers of biofilm.^{10,11,15,18,20,34} The exact mechanism of this test is not clear, but it is known that biofilm producing strains stain black and non-producers stain red. Surprisingly, in the present study, only one (4.3%) isolate of *S. aureus* and 7

(35%) of *S. epidermidis* produced biofilm in the CRA assay. These results differ from those of Arciola *et al.* who found 61% positivity in isolates of *S. aureus* by the CRA assay.¹⁵ Also, the result obtained in the present study for isolates of *S. epidermidis* was lower than those obtained in other studies with values of 49 to 87%.^{10,11,14,15,17,20,23,27,34} More studies using this method are needed, since its mechanism is not completely elucidated. Moreover, this technique has been more utilized in studies of *S. epidermidis* and in few works with *S. aureus*.

Interesting results could be observed when comparing the phenotypic and genotypic methods used in the present study. Better agreement was found between the PM and PCR methods (95.7% for *S. aureus* and 75% for *S. epidermidis*), compared to that between CRA and PCR (8.6% for *S. aureus* and 55% for *S. epidermidis*). When comparing CRA and PM, little agreement was also observed between these methods (4.3% for *S. aureus* and 30% for *S. epidermidis*). In a similar study by Arciola *et al.* with only isolates of *S. epidermidis*, an agreement was also found between PM and PCR (77.5%), but on the contrary, they obtained optimal agreement between PCR and CRA (96%) and between CRA and PM (81%).²³ However, in the study by Knobloch *et al.* who evaluated different methods for the detection of biofilm formation for isolates of *S. aureus*, there was little concordance between CRA and MP (3.8%).³²

S. aureus and *S. epidermidis* are the Gram-positive bacteria most frequently associated with infections related to CVC. The study of the presence and expression of *ica* genes in these bacteria and the extreme importance for understanding their mechanisms of adhesion and colonization, help in the development of preventive and therapeutic measures for the eradication of biofilms associated infections in hospitals. In the present study, the PCR method allowed the detection of *ica* genes in the isolates examined, and the PM assay was more effective than CRA in detecting the biofilm-forming phenotype.

Acknowledgements

CAPES provided financial support. Dr. A. Leyva assisted with the translation and editing of the manuscript.

References

1. Eggimann P, Sax H, Pittet D. Catheter-related infections. *Microbes Infect* 2004; **6**:1033-1042.
2. Cramton SE, Gerke C, Scnell NF, Nichols WW, Götz F. The inter-cellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* 1999; **67**:5427-5433.
3. Götz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 2002; **43**:1367-1378.
4. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of inter-cellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996; **20**:1083-1091.
5. Gerke C, Kraft A, Sübmuth R, Schweitzer O, Götz F. Characterization of the *N*-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosyntheses of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion. *J Biol Chem* 1998; **273**:18586-18593.
6. Pugliese G. Reducing risks of infection during vascular access. *J Intraven Nurs* 1997; **20**:11-13.
7. Sadoyama G, Gontijo Filho PP. Colonizações do sítio de inserção e da ponta do cateter vascular central: experiência de 96 pacientes no hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *NewsLab* 2002; **54**:160-168.
8. David A, Risitano DC, Mazzeo G, Sinardi L, Venuti FS, Sinardi AU. Central venous catheters and infections. *Minerva Anesthesiol* 2005; **71**:561-564.
9. Arciola CR, Collamati S, Donati E, Montanaro L. A rapid PCR-method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol* 2001; **10**:130-137.
10. Silva GDI de, Kantzanou M, Justice A, et al. The *ica* operon and biofilm *Staphylococci* associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002; **40**:382-388.

11. Chaieb K, Mahdouani K, Bakhrouf A. Detection of *icaA* e *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *J Hosp Infect* 2005; **61**:225-230.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985; **22**:996-1006.
13. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000; **40**:175-179.
14. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; **42**:872-874.
15. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2151-2156.
16. Rohde H, Knobloch JK-M, Horstkotte MA, Mack D. Correlation of *Staphylococcus aureus* *icaADBC* genotype and biofilm expression phenotype. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:4595-4596.
17. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (*ica*) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J Biomed Mater Res* 2002; **59**:557-562.
18. Kiem S, Oh, WS, Peck KR, *et al.* Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on capacity adhering to polyurethane surface. *J Korean Med Sci* 2004; **19**:779-782.
19. Fowler Jr VG, Fey PD, Reller LB, Chamis AL, Corey GR, Rupp ME. The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med Microbiol Immunol* 2001; **189**:127-131.

20. Ziebhür W, Heilmann C, Götz F, *et al.* Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* 1997; **65**:890-896.
21. Fitzpatrick F, Humphreys H, Smyth E, Kennedy CA, O' Gara JP. Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Hosp Infect* 2002; **52**:212-218.
22. Klug D, Wallet F, Kacet S, Courcol RJ. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:3348-3350.
23. Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, *et al.* Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of *ica* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res* 2006; **76A**:425-430.
24. Mack D, Rohde H, Dobinsky S, *et al.* Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesion and biofilm formation. *Infect Immun* 2000; **68**:3799-3807.
25. Rohde H, Knobloch JK-M, Horstkotte, MA, Mack D. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesion synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. *Med Microbiol Immunol* 2001; **190**:105-112.
26. Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, *et al.* Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesion synthesis. *J Bacteriol* 2003; **185**:2879-2886.

27. Arciola CR, Gamberini S, Campoccia D, *et al.* A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J Biomed Mater Res* 2005; **75A**:408-413.
28. Vogel L, Sloos JH, Spaargaren J, Suiker I, Dijkshoorn L. Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; **36**:139-141.
29. Gelosia A, Baldassarri L, Deighton M, van Niguyen T. Phenotypic and genotypic markers of *Staphylococcus epidermidis* virulence. *Clin Microbiol Infect* 2001; **7**:193-199.
30. Krepsky N, Ferreira RBR, Nunes APF, *et al.* Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. *Curr Microbiol* 2003; **46**:280-286.
31. Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciolla CR, Baldassari L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by Staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:3235-3238.
32. Knoblock JK-M, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 2002; **191**:101-106.
33. McKenney D, Pouliot KL, Wang Y, *et al.* Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo*-expressed antigen. *Science* 1999; **284**:1523-1527.
34. Arciola CR, Campoccia D, Gamberini S, Cervellati M, Donati E, Montanaro L. Detection of slime production by means of optimized congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. *Biomaterials* 2002; **23**:4233-4239.

Table I Primer sequences, sizes of amplified DNA fragments and amplifications used in this study

Gene	Primer sequence (5'→3')	Amplified fragment size (bp)	Anneling and Cycles	Control strains positives	Reference
<i>IcaA1</i>	ACACTTGCTGGCGCAGTCAA (F) ^a	188	60 °C (30 s) (50 cycles)	<i>S. aureus</i> ATCC 35556	Rohde <i>et al.</i> (2001) ¹⁶
	TCTGGAACCAACATCCAACA (R) ^b				
<i>IcaD1</i>	ATGGTCAAGCCAGACAGAG (F)	198	60 °C (30 s) (50 cycles)	<i>S. aureus</i> ATCC 35556	Rohde <i>et al.</i> (2001) ¹⁶
	AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA (R)				
<i>IcaA2</i>	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA (F)	188	60 °C (30 s) (50 cycles)	<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	Arciola <i>et al.</i> (2001) ¹⁵
	TCAGGCACTAACATCCAGCA (R)				
<i>IcaD2</i>	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG (F)	198	60 °C (30 s) (50 cycles)	<i>S. epidermidis</i> ATCC35984	Arciola <i>et al.</i> (2001) ¹⁵
	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA (R)				

^a(F), forward.^b(R), reverse.

Table II Genotypic and phenotypic characteristics of *ica* positive and negative *S. aureus*

Strains n.	PCR ^a	CRA ^b	PM ^c
	<i>icaA1/icaD1</i>	72h	
ATCC 35556	+/+	+	SA
103	+/+	+	WA
31	+/+	-	SA
54	+/+	-	SA
14	+/+	-	SA
16	+/+	-	SA
17	+/+	-	SA
22	+/+	-	SA
96	+/+	-	SA
67	+/+	-	SA
69	+/+	-	SA
70	+/+	-	SA
75	+/+	-	SA
13	+/+	-	SA
121	+/+	-	SA
26	+/+	-	MA
35	+/+	-	MA
116	+/+	-	MA
119	+/+	-	MA
120	+/+	-	MA
48	+/+	-	WA
97	+/+	-	WA
125	+/+	-	WA
123	-/-	-	WA

^aPCR, polymerase chain reaction; +/+, positive/positive; -/-, negative/ negative.

^bCRA, Congo red agar; +, positive; -, negative.

^cPM, polystyrene microplate; SA, strongly adherent; MA, moderately adherent; WA, weakly adherent.

Table III Genotypic and phenotypic characteristics of *ica* positive and negative *S. epidermidis*

Strain n.	PCR ^a	CRA ^b	PM ^c
	<i>icaA2/icaD2</i>	48h	
ATCC35984	+/+	+	SA
3	+/+	+	SA
4	+/+	+	SA
5	+/+	+	SA
28	+/+	+	MA
60	+/+	+	WA
63	+/+	+	WA
102	+/+	+	NA
126	+/+	-	SA
84	+/+	-	SA
29	+/+	-	MA
92	+/+	-	MA
8	+/+	-	MA
39	+/+	-	MA
49	+/+	-	MA
57	+/+	-	MA
45	+/+	-	WA
32	-/-	-	SA
98	-/-	-	MA
111	-/-	-	MA
23	-/-	-	WA

^aPCR, polymerase chain reaction; +/+, positive/positive; -/-, negative, negative.

^bCRA, Congo red agar; +, positive; -, negative.

^cPM, polystyrene microplate; SA, strongly adherent; MA, moderately adherent; WA, weakly adherent; NA, non-adherent.