

**Marina Cerqueira Araújo Thompson**

**IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS  
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRÓTESES  
DE VALVAS CARDÍACAS DE ORIGEM BIOLÓGICA**

Belo Horizonte  
2011

**Marina Cerqueira Araújo Thompson**

**IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS  
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PRÓTESES  
DE VALVAS CARDÍACAS DE ORIGEM BIOLÓGICA**

Monografia apresentada ao  
Programa de Pós Graduação  
em Microbiologia do Instituto de  
Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas  
Gerais, como Pré-requisito para  
a obtenção do Grau de  
Especialista em Microbiologia

**Orientadora: Profa. Fátima Soares Motta Noronha**

Belo Horizonte  
2011

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Microbiologia  
Curso de Especialização em Microbiologia**

**IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE MICRO-ORGANISMOS  
NO PROCESSO DE PRODUÇÃO  
DE VALVAS CARDÍACAS DE ORIGEM BIOLÓGICAS**

**Marina Cerqueira Araújo Thompson**

**Belo Horizonte, 25 de Fevereiro de 2011**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Fátima Soares Motta Noronha**  
(Orientadora)

---

**Profa. Viviane Alves Gouveia**  
(MEMBRO)

---

**Profa. Simone Gonçalves do Santos**  
(MEMBRO)

**Data de Aprovação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.**

## AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer que sozinhos somos incompletos e que a participação de outras pessoas foi fundamental em nossa caminhada.

Agradeço a Deus por ser luz em meu caminho; à minha mãe por me permitir a vida; à Bubu pelo amor incondicional, que sempre se doou por inteiro e abriu mão dos seus sonhos para viver os meus; à minha avó Flora pelas orações e pelo exemplo de força; aos meus padrinhos, primos e amigos pelos bons momentos, à D. Deilza, pelos incentivos; à professora Fátima pela orientação e paciência e aos profissionais da empresa onde este trabalho foi realizado, pelo apoio e por permitirem a divulgação dos resultados.

Agradeço especialmente ao meu marido, Mayerson, pelo amor, carinho e paciência e por, muitas vezes, me enxergar melhor do que sou e à Ana Elisa, que mesmo antes de nascer, já é uma benção em nossas vidas! Chega trazendo a nossa família momentos de intensa felicidade, cumplicidade e união.

Obrigada a todos que tornaram este trabalho mais fácil, mais prazeroso, mais construtivo, mais aconchegante e mais afetuoso!

“Para ser grande, sê inteiro:  
Nada teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa.  
Põe quanto és no mínimo que fazes.”  
(Fernando Pessoa)

## RESUMO

Próteses de valvas cardíacas são utilizadas para substituir, cirurgicamente, valvas do coração que apresentem alguma anomalia ou problema que impeça o seu funcionamento normal. As próteses biológicas de valvas cardíacas conservadas em soluções de glutaraldeído de baixas concentrações surgiram em 1974, e desde então, sua utilização é crescente. Com o aumento do uso de próteses valvares, aumentou também o número de relatos de infecções relacionadas a estes dispositivos. Nestes casos, os principais micro-organismos isolados são: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* spp., e fungos. Entretanto, nos últimos anos aumentou o número de casos de endocardite infecciosa causada por micobactérias em pacientes com próteses biológicas de valvas cardíacas. Apesar das principais fontes de contaminação de próteses de valvas cardíacas continuarem sendo inoculação de micro-organismos da microbiota da pele ou região adjacente durante o implante; inoculação do patógeno pelas mãos de membros do corpo clínico ou instrumentais e disseminação de patógeno por via hematogênica, relatos recentes alertam para a possibilidade de contaminação do paciente a partir do material utilizado na fabricação das próteses biológicas de valvas cardíacas. Para a realização desta monografia, acompanhamos o processo de produção de próteses biológicas de valvas cardíacas em um fabricante com objetivo de avaliar a presença de micro-organismos nas etapas que envolvem a produção destes dispositivos, identificar e verificar a susceptibilidade dos micro-organismos encontrados em soluções de glutaraldeído 0,2% e formaldeído 10%, utilizadas no processo produtivo. Das 51 amostras pré-esterilização avaliadas 84,3% apresentaram crescimento de micro-organismos e 100% dos micro-organismos isolados eram micobactérias de crescimento rápido *M. chelonae* / *M. abscessus*. Foi observado que quanto maior o tempo de processamento das próteses, maior a carga microbiana e maior a resistência dos micro-organismos isolados à solução de glutaraldeído 0,2%. Micobactérias isoladas de próteses com menor tempo de processamento (até 08 dias) também apresentaram sensibilidade a uma menor concentração de glutaraldeído (0,1%). Nenhum micro-organismo isolado apresentou resistência ao tratamento com solução de formaldeído 10%, etapa final do processo de montagem. Desta forma, é necessário que os fabricantes de próteses de valvas cardíacas avaliem a carga microbiana do tecido ao longo de suas linhas de montagem, bem como seus processos de triagem microbiológica e esterilização visto que a contaminação por micobactérias é caracterizada por crescimento lento e dificuldade de detecção.

**Palavras chaves:** *Mycobacterium* spp. de crescimento rápido, próteses de valvas cardíacas, glutaraldeído.

## ABSTRACT

Prosthetic heart valves are used to surgically replace heart valves which have an abnormality or problem that prevents its normal operation. The bioprosthetic heart valve preserved in low concentration glutaraldehyde solutions first appeared in 1974 and since then its use is growing. With the increased use of prosthetic valves, the number of reported infections related to these devices also increased. In these cases, the main isolated microorganisms are *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas* spp. and fungi. However, in recent years, the number of cases of infective endocarditis caused by mycobacteria in patients with bioprosthetic heart valve has increased. Despite the major sources of prosthetic heart valves contamination continues to be inoculation of microorganisms from the skin microbial flora or adjacent region during surgery; pathogen inoculation by the hands of the medical staff members or instrumental and pathogens dissemination through hematogenous via, recent reports alert to the possibility of patient contamination with the material used to manufacture the bioprosthetic heart valve. To elaborate this monograph, we follow the process of bioprosthetic heart valve production in a manufacturer to evaluate the presence of microorganisms in steps that involve the production of these devices, the identification and tests to verify the susceptibility of microorganisms in 0.2% glutaraldehyde solution and 10% formaldehyde, used during the process. We found that 84.3% of a total of 51 pre sterilization samples tested showed growth of microorganisms and 100% of the microorganisms isolated were rapidly growing mycobacterium *M. chelonae* / *M. abscessus*. It was observed that as greater the processing time of the prosthetic heart valves, greater were the microbial load and the resistance of the isolated microorganisms to 0.2% glutaraldehyde solution. Mycobacterium isolated from prosthetic heart valves, which were less time in processing (up to 08 days) also showed sensitivity to lower concentration of glutaraldehyde (0.1%). No microorganism isolated was resistant to the treatment with 10% formaldehyde solution, the final step of the assembly process. Thus, it is necessary that manufacturers of bioprosthetic heart valves assess the tissue microbial load along its assembly lines, as well as their procedures for screening and sterilization since mycobacteria contamination is characterized by slow growth and difficulty of detection.

**Key words:** rapidly growing *Mycobacterium* spp., prosthetic heart valves, glutaraldehyde.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema do coração apresentando as valvas e o fluxo sanguíneo.
- Figura 2 Substitutos valvares disponíveis atualmente no mercado.
- Figura 3 Fórmula molecular do Glutaraldeído.
- Figura 4 Representação esquemática das ligações inter e intramoleculares em uma fibra colágena pela polimerização do glutaraldeído.
- Figura 5 Representação esquemática da parede celular de Micobactérias.
- Figura 6 Distribuição dos casos de infecção por MNT notificados entre 2003 e 2008 no Brasil.
- Figura 7 Principais etapas do processo produtivo do fabricante avaliado.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Classificação das MNT de acordo com a produção de pigmento e tempo de crescimento (RUNYON, 1959).
- Tabela 2 Quantidade de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2% em função do tempo de processamento das valvas.
- Tabela 3 Número médio de dias de processamento e a carga média de micro-organismos presentes em cada grupo.
- Tabela 4 Crescimento da amostra Pro08 em soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%.
- Tabela 5 Crescimento da amostra Pro30 em soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%.
- Tabela 6 Crescimento da amostra Pro55 nas soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%.



## **LISTA DE GRÁFICOS**

- Gráfico 1 Casos de infecção por MNT notificados entre 2003 e 2008.
- Gráfico 2 Gráfico de dispersão XY da média do tempo de processamento das valvas em função da carga média de micro-organismos das soluções de glutaraldeído 0,2%.
- Gráfico 3 Curva de crescimento das amostras Pro30 e Pro55 nas soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%.

## **LISTA DE ANEXOS**

- Anexo 1 Composição do meio TSA.
- Anexo 2: Relatório de identificação de micro-organismos.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC:	American Type Culture Collection
DNA:	Desoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)
FDA:	Food and Drug Administration (Agência reguladora Norte Americana)
HPLC:	High-performance liquid chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
<i>hsp65</i> :	Heat shock protein gene (Gene que codifica proteína de choque térmico)
ISO:	International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)
MNT:	Micobactérias não da Tuberculose
PCR – RFLP:	Polymerase Chain Reaction - restriction fragment length polymorphism (Reação em Cadeia da Polimerase para Análise de Polimorfismo de Fragmentos de Restrição Enzimática)
RGM:	Rapidly growing mycobacteria (Micobactérias de Crescimento Rápido)
RNA:	Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico)
<i>rpoB</i> :	RNA polymerase beta-subunit encoding gene (Gene que codifica a subunidade $\beta$ da RNA polimerase)
rRNA:	Ribosomal Ribonucleic acid (RNA ribossômico)
TSA:	Ágar Tryptcaseína de Soja
UFC:	Unidade Formadora de Colônia
LJ:	Meio Löwenstein-Jensen

# SUMÁRIO

RESUMO .....	I
ABSTRACT .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABELAS .....	III
LISTA DE GRÁFICOS .....	IV
LISTA DE ANEXOS .....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	V
SUMÁRIO .....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Visão geral sobre o processo de produção de próteses de valvas cardíacas de origem biológica.....	4
3.2. Montagem e conservação das próteses valvares biológicas.....	6
3.3. Infecções em próteses médicas .....	7
3.4. Estrutura e características gerais da família <i>Mycobacteriaceae</i> .....	8
3.5. Gênero <i>Mycobacterium</i> spp. ....	9
3.6. Micobactérias de Crescimento Rápido (RGM) .....	10
3.7. Infecções associadas à <i>Mycobacterium</i> spp. de crescimento rápido.....	12
3.8. Infecções associadas à <i>Mycobacterium</i> spp. de crescimento rápido no Brasil .....	13
3.9. Resistência do gênero <i>Mycobacterium</i> a Desinfetantes e Antimicrobianos .....	14
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo geral .....	17
4.2. Objetivos específicos .....	17
5. METODOLOGIA.....	17
5.1. Investigação da presença de micro-organismos nas soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas para conservação das valvas ao longo da linha de montagem.....	18
5.2. Investigação da relação entre o tempo para o processamento das valvas e a presença de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2%.....	19
5.3. Identificação dos micro-organismos isolados .....	19
5.4. Comparação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de glutaraldeído 0,1% e 0,2%. 19	
5.5. Investigação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de formaldeído 10%. ....	20
6. RESULTADOS .....	21
6.1. Investigação da presença de micro-organismos nas soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas na conservação das valvas ao longo da linha de montagem.....	21
6.2. Investigação da relação entre o tempo para o processamento das valvas e a presença de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2% e tecido suíno.....	23
6.3. Identificação dos micro-organismos isolados .....	24
6.4. Comparação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de glutaraldeído 0,1% e 0,2%. 24	
6.5. Investigação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de formaldeído 10%. ....	26
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÕES.....	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

# 1. INTRODUÇÃO

A substituição valvar é uma terapêutica utilizada em casos graves de doenças valvares e é capaz de modificar favoravelmente o quadro clínico do paciente. Dentre os substitutos disponíveis para implante, destacam-se as próteses biológicas de valvas cardíacas.

As próteses biológicas de valvas cardíacas são produzidas utilizando folhetos de valvas suínas<sup>1</sup> ou folhetos produzidos com pericárdio bovino. A produção destas próteses valvares é um trabalho manual, que consiste essencialmente na execução de suturas que unem três folhetos a um anel de material polimérico. A complexidade da técnica utilizada para suturar os folhetos, as variações de forma e tamanho e a flexibilidade do material biológico contribuem para que o tempo de processamento (montagem) de uma prótese biológica de valva cardíaca seja muito variável.

As próteses biológicas de valvas cardíacas conservadas em soluções de glutaraldeído de baixas concentrações surgiram em 1974. Sua utilização, como agente fixador e conservador dos folhetos valvares, permitiu a estabilização do colágeno, reduziu as reações antigênicas e aumentou a resistência e durabilidade destas próteses. O glutaraldeído é o agente mais utilizado até os dias de hoje para a fixação química de próteses biológicas de valvas cardíacas.

O tempo de fixação e a concentração da solução de glutaraldeído são importantes na determinação da natureza da rede de ligações cruzadas formadas. Soluções de glutaraldeído em altas concentrações (acima de 2,5%) criam ligações cruzadas somente na superfície das fibras de colágeno, o que não é desejável. As concentrações das soluções de glutaraldeído utilizadas podem variar de 0,1 a 2,5%.

A utilização de próteses biológicas de valvas cardíacas é crescente no Brasil: as operações das valvas cardíacas realizadas no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tiveram um crescimento de 8,5%, entre os anos de 1980 e 1990, partindo de uma média de 400 operações/ano na década de 1980 para 434 operações/ano na década de 1990. O crescimento entre 2000 e 2007, em relação à década de 1990, foi ainda mais significativo (37,6%). Uma média de 597 operações valvares/ano foi realizada neste período.

Os procedimentos para implantação de próteses cardíacas nos EUA também estão em crescimento desde 2008 e pretendem alcançar a marca de 118.000 até 2015. Este crescimento está sendo impulsionado pelo envelhecimento da população visto que a incidência de doença

valvar em pessoas com mais de 65 anos é de 29%, mas aumenta para 37% em pessoas com mais 75 anos (GlobalData: US Prosthetic Heart Valves Market on reports-research.com).

As vendas da indústria de valvas cardíacas em todo mundo aumentaram de US\$ 910 milhões em 2002 para US\$ 1 bilhão em 2005 (VESELY, 2005). As vendas em 2009 atingiram quase US\$ 1,1 bilhão e estão projetadas para crescer aproximadamente 2-3% ao ano. Deste total, em todo o mundo, as vendas de próteses de valvas mecânicas contribuem com US\$ 313 milhões (30%) e as vendas de próteses de valvas biológicas com US\$770 milhões (70%). Enquanto as vendas de próteses de valvas mecânicas tendem a diminuir cerca de 1 a 2% por ano, as vendas de próteses de valvas biológicas tendem a crescer aproximadamente 5% por ano, sustentando o crescimento da indústria deste segmento (The Top 25 Manufacturers Of Heart Valve Repair & Replacement Devices Worldwide. Research Facts Ltd, Sep 2009, Pages: 58).

Trombose, sangramentos, deterioração da estrutura valvar, embolia e endocardite infecciosa são as principais causas de morte atribuídas às próteses biológicas de valvas cardíacas. Os principais micro-organismos associados à endocardite em próteses biológicas de valvas cardíacas são: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas* spp. e fungos.

A endocardite infecciosa causada por micobactérias em pacientes com próteses biológicas de valvas cardíacas, apesar de ser uma doença rara é quase sempre fatal. Nos últimos anos, o número de relatos aumentou, provavelmente porque as próteses biológicas de valvas cardíacas, ainda que conservadas em soluções de glutaraldeído de baixas concentrações, podem ser colonizadas por micro-organismos que resistem a estas soluções, entre eles algumas espécies de micobactérias.

Os trabalhos que relatam esse fato alertam para a possibilidade de contaminação do paciente a partir do material utilizado na fabricação das próteses biológicas de valvas cardíacas. Para a realização desta monografia, acompanhamos o processo de produção de próteses biológicas de valvas cardíacas em um fabricante no período de março de 2009 a novembro de 2010 e avaliamos a presença micro-organismos nas etapas que envolvem a produção destes dispositivos.

## 2. JUSTIFICATIVA

Próteses de valvas cardíacas são utilizadas para substituir, cirurgicamente, valvas do coração que apresentem alguma anomalia ou problema que impeça o seu funcionamento normal. Em alguns casos há a possibilidade de reparar a valva nativa, mas em outros há a necessidade de substituir a valva doente por uma prótese, que pode ser mecânica ou biológica. As próteses biológicas apresentam as seguintes vantagens quando comparadas às próteses mecânicas: dispensa de medicação anticoagulante e apresenta excelente desempenho hemodinâmico.

A utilização de técnicas de bioengenharia permitiu grandes avanços na produção de próteses biológicas de valvas cardíacas e resultou na utilização crescente destes dispositivos. Um dos avanços mais significativos nesta área foi o uso de glutaraldeído para promover ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno presente no tecido. Esta técnica permitiu promover a estabilização da estrutura interna do tecido, aumentando sua resistência e, conseqüentemente reduzindo significativamente a biodegradação das próteses biológicas de valvas cardíacas, um dos maiores empecilhos a utilização em grande escala das mesmas.

No fabricante acompanhado, com o objetivo de controlar a carga microbiana, as próteses são conservadas em solução de glutaraldeído 0,2% durante todo o período de montagem. Ao final desta etapa, as próteses são tratadas com solução de formaldeído 10% por no mínimo 24 horas. Após este tratamento as valvas são novamente transferidas para potes contendo solução de glutaraldeído 0,2% e seguem para a de fixação dos acessórios. Concluída esta etapa, as próteses valvares aguardam a esterilização e o processo de transferência asséptica para a embalagem final.

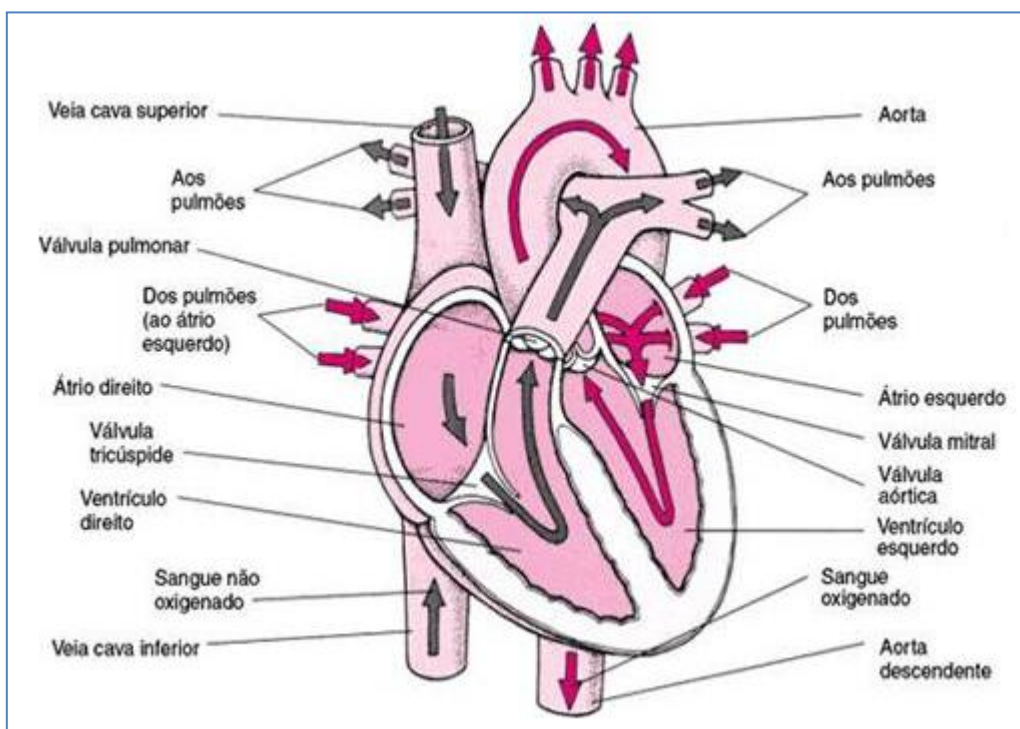
Por razões econômicas bem como de saúde e segurança ocupacional, para a indústria de produção de valvas cardíacas biológicas, procedeu-se um estudo avaliando a possibilidade de utilização de solução de glutaraldeído em uma menor concentração.

Para verificar a possibilidade de redução da concentração de glutaraldeído de 0,2% para 0,1% durante a montagem de próteses biológicas de valvas cardíacas (início da sutura até a fixação dos acessórios), é importante investigar a presença de microbiota na linha de montagem, até então desconhecida. Se necessário, também realizar uma avaliação dos padrões de susceptibilidade dos micro-organismos isolados frente às soluções de glutaraldeído de baixas concentrações (0,1% e 0,2%) para estabelecer métodos de controle e definir a concentração da solução de glutaraldeído apresentando a melhor razão custo / benefício.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Visão geral sobre o processo de produção de próteses de valvas cardíacas de origem biológica

Quatro valvas principais mantêm o sangue fluindo em uma só direção através do coração. O fluxo de sangue entre o átrio e ventrículo é controlado pela valva tricúspide no lado direito e pela valva mitral no lado esquerdo. As valvas, aórtica e pulmonar, controlam a passagem de sangue que sai do coração (**Figura 1**).



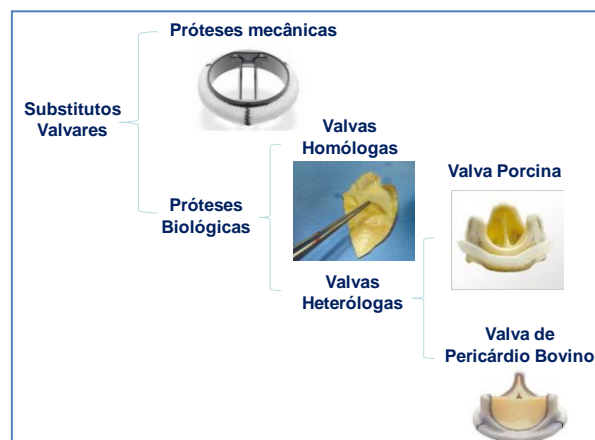
**Figura 1.** Esquema do coração apresentando as valvas e o fluxo sanguíneo

Os diferentes substitutos valvares disponíveis atualmente no mercado podem ser classificados em dois grandes grupos: próteses mecânicas e próteses biológicas, cada qual apresentando suas próprias vantagens e desvantagens. A principal vantagem das próteses mecânicas é sua longa durabilidade e, entre as desvantagens, estão incluídos a necessidade de uso permanente de medicação anticoagulante, com risco de complicações tromboembólicas e um desempenho hemodinâmico não fisiológico. As próteses biológicas dispensam o uso de medicação anticoagulante, apresentam excelente desempenho hemodinâmico, com redução da hipertrofia ventricular, menor problema de hemólise e nenhum problema de ruído. Entretanto, sua principal desvantagem é a progressiva degeneração, especialmente em jovens (MOL *et al.*, 2009).

As próteses biológicas de valvas cardíacas são usadas principalmente nas posições aórtica e pulmonar e ocasionalmente são invertidas e usadas para substituir a valva mitral (VESELY, 2005).

As próteses biológicas de valvas cardíacas mantêm o fluxo sanguíneo em sua forma unidirecional por meio de uma estrutura funcional extremamente dinâmica cujas principais características são: resistência a um estresse mecânico intenso e repetitivo, habilidade de adaptação e remodelação de tecido (MENDELSON & SCHOEN, 2006).

As próteses biológicas de valvas cardíacas são conhecidas há vários anos e podem ser subdivididas em dois tipos: valvas homólogas e valvas heterólogas (**Figura 2**).



**Figura 2.** Substitutos valvares disponíveis atualmente no mercado

As valvas homólogas são valvas humanas intactas obtidas a partir de doadores de órgãos e tecidos. Normalmente, são armazenadas por crio-preservação como um segmento aórtico ou pulmonar inteiro, separadas por tamanho e forma, para posterior implantação no receptor (VESELY, 2005). Entretanto, as valvas do paciente, assim como as valvas do doador, exibem variações individuais, o que pode significar um problema para encontrar tamanhos adequados. Além disso, ainda existe considerável discrepância entre a disponibilidade e a demanda.

As valvas heterólogas podem ser montadas com ou sem suporte e, de acordo com o material com que são fabricadas, podem ser classificadas em dois tipos: (I) valvas porcinas<sup>1</sup>, (II) valvas de pericárdio bovino. A valva Porcina<sup>1</sup> consiste de uma valva aórtica do porco intacta ou pode ser montada a partir de até 3 segmentos separados da aorta (cúspides) associados, o que permite melhorar a simetria da valva e, conseqüentemente, seu desempenho. A valva de pericárdio bovino é fabricada com até três peças separadas de



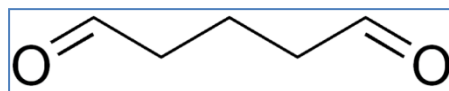
pericárdio dispostas em um suporte circular e costuradas, em uma configuração muito semelhante à da valva porcina<sup>1</sup>. Estas valvas são preparadas pelos fabricantes em várias configurações para facilitar a implantação (VESELY, 2005).

<sup>1</sup> O termo valva porcina é uma tradução de “Porcine valve” e é utilizado pelo fabricante para se referir às próteses valvares fabricadas a partir das valvas do porco. O termo valva suína somente é utilizado para se referir às valvas do porco antes de serem processadas.

### 3.2. Montagem e conservação das próteses valvares biológicas

Vários agentes químicos foram testados, em condições variadas de concentração, pH e temperatura em sua habilidade para estabilizar tecidos colágenos. O glutaraldeído, introduzido por CARPENTIER no final dos anos 1960, destacou-se como o mais efetivo em impedir a degeneração estrutural, macro e microscópica, recebeu aceitação generalizada e é o agente mais empregado comercialmente, até os dias de hoje, na estabilização de tecidos biológicos para a confecção de próteses biológicas de valvas cardíacas (BAUCIA *et al.*, 2006).

O glutaraldeído é uma molécula alifática de cinco carbonos com um grupo aldeído em cada extremidade da cadeia, o que o torna bifuncional (**Figura 3**). É facilmente encontrado, apresenta um custo não elevado e forma soluções aquosas que conseguem efetivamente promover ligações cruzadas no tecido em períodos de tempo relativamente curtos (KHOR, 1997).

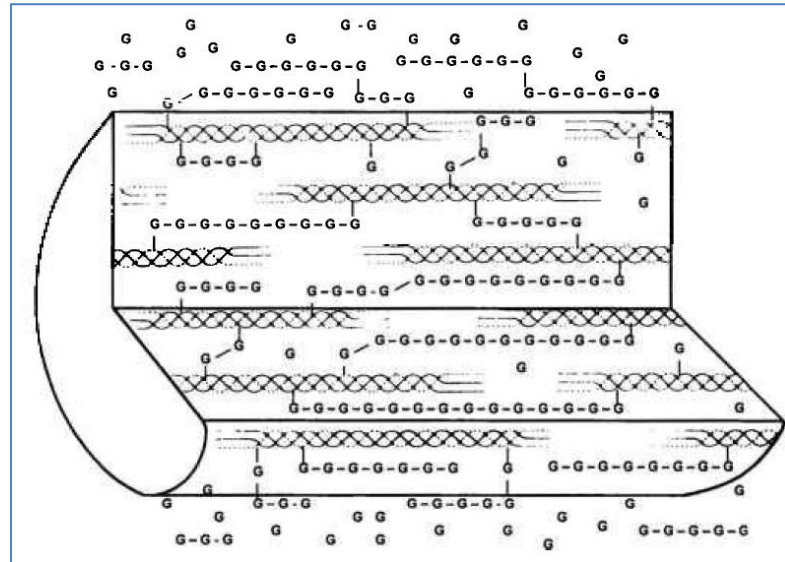


**Figura 3.** Fórmula molecular do Glutaraldeído

O glutaraldeído estabelece ligações cruzadas entre os grupos aldeído e amina das fibras colágenas (**Figura 4**), aumentando a estabilidade do tecido e, conseqüentemente, aumentando a resistência do material de forma mais eficaz que outras substâncias alternativas, como o formaldeído e o acetaldeído, por exemplo, que também podem ser utilizadas para esse fim (MIYAMOTTO *et al.*, 2009).

As técnicas de fixação não seguem um padrão único. Diferentes autores empregam diferentes concentrações de solução de glutaraldeído, tempos de fixação e temperaturas (VAN NOORT *et al.*, 1982; WEBB *et al.*, 1988; ROSSI *et al.*, 1990; GATTI *et al.*, 1991; JORGE-HERRERO *et al.*, 1991; BERNACCA *et al.*, 1992; XI *et al.*, 1992; HIRSCH *et al.*, 1993;

TAN *et al.*, 1993; CHANDA, 1994; CHANDA *et al.*, 1997; CARPENTIER *et al.*, 1998; CHANDY *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000). As concentrações das soluções de glutaraldeído podem variar de 0,1% a 2,5%, o tempo de fixação de duas horas a um mês e a temperatura de 2°C a 37°C.



**Figura 4.** Representação esquemática das ligações inter e intramoleculares em uma fibra colágena pela polimerização do glutaraldeído.

### 3.3. Infecções em próteses médicas

Com o aumento do uso de próteses médicas aumentou também o número de casos de infecções relacionadas a estes dispositivos, com impacto grave na saúde humana (ZHAO *et al.*, 2008).

Micro-organismos organizados em biofilme são a causa mais comum de infecção persistente, particularmente em pacientes que receberam implantes médicos como: tubos de ventilação, cateter venoso central, endopróteses e próteses de valvas cardíacas (GUNTHER *et al.*, 2009).

Os micro-organismos envolvidos em infecções de dispositivos médicos incluem: *Staphylococcus aureus*, mais associado a infecções de biomateriais metálicos, osso-articulação e tecido mole; *Pseudomonas aeruginosa*, relacionada principalmente a infecções em lentes de contato e *Staphylococcus epidermidis*, mais relacionado a infecções de polímeros como próteses de valvas cardíacas (ZHAO *et al.*, 2008).

A incidência de infecções associadas a próteses de valvas cardíacas, seja mecânica ou biológica, varia entre 2,25% e 9,50% (HINRICHSSEN, 2007). Embora a endocardite de

próteses valvares seja uma complicação rara, ela está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade (SAN MARTIN *et al.*, 2010). Mesmo com as melhorias na terapia médica e cirúrgica, a endocardite da prótese valvar apresenta um prognóstico grave e representa um desafio diagnóstico e terapêutico (HABIB *et al.*, 2008).

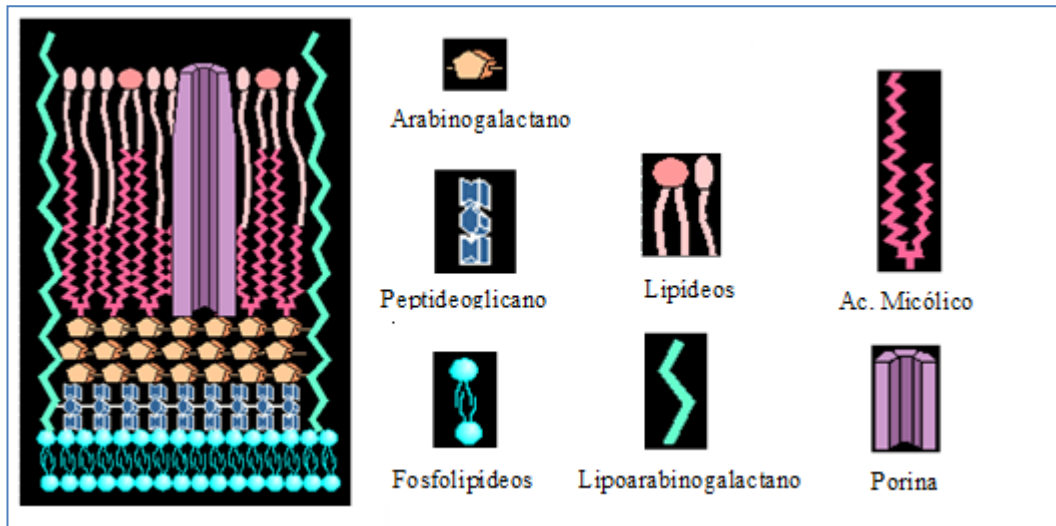
Geralmente a contaminação das próteses de valvas cardíacas ocorre pelo contato com micro-organismos da microbiota da pele ou região adjacente, durante o implante. O patógeno também pode ser oriundo das mãos do cirurgião ou corpo clínico, instrumentais ou alcançar a valva implantada por via hematogênica (HINRICHSEN, 2007). *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp. são os principais micro-organismos associados a endocardites de próteses valvares (ALONSO-VALLE *et al.*, 2010). Entretanto, um número considerável de casos (entre 11% e 20%) apresenta cultura negativa (HABIB *et al.*, 2008; ALONSO-VALLE *et al.*, 2010).

Chamamos atenção, neste trabalho, para o aumento nos últimos anos do número de relatos de endocardite associada às micobactérias presentes em próteses valvares (TSAI *et al.*, 2008; WARWICK *et al.*, 2008; BUSH *et al.*, 2010; STRABELLI *et al.*, 2010; TORRES-DUQUE *et al.*, 2010). É importante salientar que a maioria dos casos reportados envolve micobactérias de crescimento rápido (BUSH *et al.*, 2010). Estas espécies serão aqui referidas como RGM (*Rapidly Growing Mycobacteria*), um termo também utilizado na literatura.

### **3.4. Estrutura e características gerais da família *Mycobacteriaceae***

O gênero *Mycobacterium* é o único gênero da família *Mycobacteriaceae*. O nome do gênero foi proposto por Lehmann e Neumann em 1896 (GOODFELLOW & MAGEE, 1998), em referência à película formada por *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar à produzida por alguns fungos. Os micro-organismos pertencentes a este gênero se caracterizam como bacilos retos ou ligeiramente curvos, aeróbios, embora algumas espécies possam crescer em atmosfera com teor reduzido de O<sub>2</sub>, imóveis e não esporulados. Medem aproximadamente 0,2 a 0,6 x 1,0 a 10 µm e não apresentam cápsula. A morfologia da colônia depende da espécie, variando de lisa a rugosa e de não pigmentada a pigmentada. O pigmento pode ser amarelo, laranja ou, raramente, róseo, normalmente devido aos pigmentos carotenóides. Apresentam elevado conteúdo de lipídios na parede celular e produzem ácidos graxos conhecidos como ácidos micólicos, caracterizados principalmente pelo tamanho da cadeia que frequentemente contém de 60 a 90 átomos de carbono (KUBCA & WAYNE, 1984; GOODFELLOW & MAGEE, 1998; PFYFFER *et al.*, 2006; BRITO, 2008).

A parede celular de micobactérias (**Figura 5**) é constituída por uma camada de peptidoglicano, que se liga ao arabinogalactano por ligações fosfodiéster e mais externamente são encontrados os ácidos micólicos. Inseridos nesta camada lipídica são também encontrados lipoarabinomanosídeos e proteínas, entre elas, porinas (JUN *et al.*, 1995; BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002, BRITO, 2008; HETT & RUBIN, 2008).



**Figura 5.** Representação esquemática da parede celular de Micobactérias.  
Fonte: Adaptado de BRITO, 2008.

Devido às suas características exclusivas, a parede celular de micobactérias é impermeável a uma série de compostos, um recurso em parte responsável pela resistência a inúmeros agentes antimicrobianos (HETT & RUBIN, 2008).

Os métodos tradicionais de identificação de micobactérias são baseados em características fenotípicas (taxa de crescimento, testes bioquímicos, morfologia da colônia e pigmentação) e já são bem estabelecidos, padronizados e de baixo custo. Outros métodos de identificação, como estudos da composição dos ácidos micólicos por cromatografia e métodos moleculares também têm sido utilizados.

### 3.5. Gênero *Mycobacterium* spp.

O gênero *Mycobacterium* é mais conhecido por suas duas principais espécies patogênicas: *M. tuberculosis* e *M. leprae*, agentes causadores de duas das mais antigas doenças do mundo: tuberculose e hanseníase, respectivamente (HETT & RUBIN, 2008). Com a disponibilidade de sequenciamento de DNA ribossomal 16S, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e reação em cadeia da polimerase para análise de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática (PCR-RFLP), o número de novas espécies aumentou drasticamente. Assim, outras espécies denominadas “micobactérias não da tuberculose

(MNT)”, têm sido descritas nas últimas décadas associadas a infecções em seres humanos (SPRINGER *et al.*, 1995, TORTOLI *et al.*, 2009).

Na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” de J. P. EUZÉBY são citadas 149 espécies e 11 subespécies no gênero *Mycobacterium*, conforme <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html> em fevereiro de 2010.

A incidência de infecções e doenças por *M. tuberculosis* vem sendo combatida e reduzida em áreas do mundo com melhoria das condições socioeconômicas. Entretanto, com o surgimento de novas ferramentas para a identificação de espécies bacterianas, a frequência de isolamento de MNT vem aumentando, e sua relevância como causa de doenças humanas tornou-se evidente. Espécies de MNT são geralmente organismos ubíquos no ambiente. Elas têm sido recuperadas a partir de água, solo, animais domésticos e selvagens, leite e alimentos.

Em 1959, RUNYON propôs o primeiro sistema de classificação para estes microorganismos dividindo as MNT em quatro grupos de acordo com a taxa de crescimento, morfologia da colônia e pigmentação na presença e ausência de luz (**Tabela 1**). Embora seja antiga essa classificação ainda é utilizada e permite que laboratórios de micobactérias identifiquem espécies de MNT mais facilmente, resultando em uma caracterização mais clara das espécies encontradas nos diferentes quadros clínicos ou síndromes associadas com este gênero de bactérias. Esta classificação permanece até os dias atuais.

No Grupo IV são encontrados complexos de espécies que apresentam um crescimento rápido. Esta é uma característica que as distingue de outras espécies deste gênero que apresentam um crescimento lento podendo demorar semanas para que suas colônias sejam vistas.

### 3.6. Micobactérias de Crescimento Rápido (RGM)

As RGM capazes de causar doenças ao homem pertencem, basicamente, aos grupos *M. fortuitum*, *M. chelonae-abscessus* e *M. smegmatis* (SOROUSH *et al.*, 2009).

Na última classificação o grupo *M. fortuitum* era composto por *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. houstonense*, *M. septicum* e *M. boenickei* (PITOMBO, *et al.*, 2009). Entretanto, existe ainda um debate sobre se *M. mageritense* pertence ao grupo *M. fortuitum* ou *M. smegmatis* (BROWN ELLIOTT & WALLACE, 2002; ADÉKAMBI *et al.*, 2004; PITOMBO *et al.*, 2009).

**Tabela 1.** Classificação das MNT de acordo com a produção de pigmento e tempo de crescimento (RUNYON, 1959).

<b>Grupos</b>	<b>Pigmentação</b>	<b>Tempo de crescimento</b>
<b>Grupo I</b>	<b>Fotocromógenas</b> (Colônias desenvolvem pigmento após exposição à luz)	<b>Lento</b> (produzem colônias visíveis em meios sólidos em mais de 7 dias)
<b>Grupo II</b>	<b>Escotocromógenas</b> (Colônias desenvolvem pigmento na presença ou ausência de luz)	<b>Lento</b>
<b>Grupo III</b>	<b>Acromógenas</b> (Colônias não desenvolvem pigmento)	<b>Lento</b>
<b>Grupo IV</b>	Produtoras ou não de pigmento	<b>Rápido</b> (produzem colônias visíveis em meios sólidos em menos de 7 dias)

O grupo denominado *M. chelonae-abscessus* seria formado por cinco espécies: *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*, *M. bolletii* e *M. massiliense* (DUARTE *et al.*, 2009). Contudo, devido ao alto grau de similaridade na sequência dos genes *rpoB*, *hsp65* e 16S rRNA de isolados clínicos de *M. massiliense* e *M. bolletii* entre si e com *M. abscessus*, uma nova reestruturação do complexo *M. chelonae-abscessus* está sendo proposta, na qual apenas três espécies estariam presentes, sendo que *M. abscessus* seria dividida em duas sub-espécies: *M. abscessus subsp abscessus* e *M. abscessus subsp massiliense* (LEAO *et al.*, 2009). Ao pesquisar a literatura, é importante reconhecer a dificuldade de se estabelecer quais espécies são responsáveis pelos casos de doenças associadas a este grupo. Isto é particularmente relevante para o período de 1972 a 1992 (maioria antes de 1990), quando se considerava *M. chelonae* e *M. abscessus* como uma mesma espécie (*M. chelonei*, mais tarde alterado para o latim correto: *M. chelonae*) (BROWN ELLIOTT & WALLACE, 2002).

O grupo *M. smegmatis* era composto por *M. smegmatis*, *M. wolinskyi* e *M. goodii* (PITOMBO *et al.*, 2009). O primeiro isolado do grupo *M. smegmatis*, foi identificado por Lustgarten em 1885 e recebeu esta denominação devido às secreções genitais (esmegma) recuperadas em um paciente com úlcera peniana. A primeira série de pacientes clínicos foi relatada por WALLACE *et al.* (1988) quando 22 isolados clínicos foram caracterizados. Os autores observaram que os isolados eram heterogêneos e os dividiram em três grupos com base nos diferentes padrões de suscetibilidade a antimicrobianos. Mais tarde, em 1999, estes três grupos foram estudados mais detalhadamente, incluindo homologias de DNA e passaram a ser considerados como três espécies distintas: *M. smegmatis sensu stricto*, *M. wolinskyi* e *M.*

*goodii*. Os dois últimos nomes foram assim atribuídos em homenagem a Emanuel Wolinsky e Robert Good, dois líderes no campo de MNT (BROWN ELLIOTT & WALLACE, 2002).

### 3.7. Infecções associadas à *Mycobacterium* spp. de crescimento rápido

Surtos, pseudo-surtos e casos de infecções relacionadas a procedimentos médicos causadas por RGM têm sido relatadas desde 1938 (DUARTE *et al.*, 2009). Infecções não relacionadas a procedimentos médicos, usualmente estão associados à exposição a águas de recreação com cloração inadequada, contendo grande número de bactérias, destacando assim a ubiquidade destes micro-organismos no ambiente. De fato, as RGM foram isoladas de diversas fontes ambientais, incluindo ambientes aquáticos, como água de torneira tratada (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; DUARTE *et al.*, 2009; RESTREPO, 2009, SOROUSH *et al.*, 2009) e solo de praticamente todas as regiões mundiais (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002).

As RGM apresentam grande capacidade de sobreviver e se multiplicar em diversas condições ambientais como grandes variações de temperatura e pH e apresentam também grande resistência à desinfecção por cloro (LECLERC *et al.*, 2002).

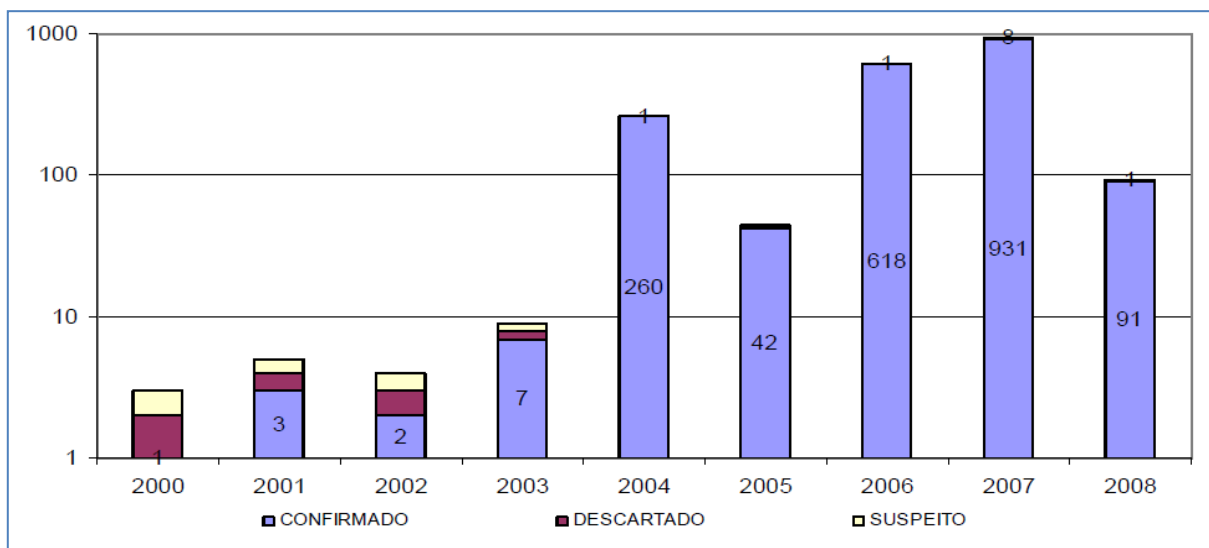
A ubiquidade dessas espécies contribui para que as RGM estejam associadas a uma ampla variedade de infecções em seres humanos: infecções de lesões pós-traumáticas localizadas, infecções de córnea pós-traumática ou pós-cirúrgica, infecções de pele disseminadas em pacientes que fazem uso de corticóides ou quimioterápicos devido a transplante de órgãos, artrites reumatóides ou outras doenças autoimunes e infecções associadas a cateteres (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002), infecção do local cirúrgico após mamoplastia (SAMPAIO *et al.* 2006, CARDOSO *et al.* 2008), infecções de sítio cirúrgico, de pele e tecidos moles após cirurgias laparoscópicas, sessões de mesoterapia, injeção de medicações farmacológicas e/ou homeopáticas com finalidade cosmética, injeção intramuscular de contraceptivo, acupuntura, lipoaspiração, injeção de silicone, após diálise (CARDOSO *et al.* 2008, VIANA-NIERO *et al.* 2008, PITOMBO *et al.*, 2009) e devido a implantes de próteses de valvas cardíacas contaminadas (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002; STRABELLI *et al.*, 2010).



### 3.8. Infecções associadas à *Mycobacterium* spp. de crescimento rápido no Brasil

Apesar da inexistência, no Brasil, de estudos epidemiológicos precisos envolvendo, fatores de riscos para os diferentes casos, a utilização de glutaraldeído a 2% de origem comercial deve ser considerada como de suma importância. Soluções comerciais contendo esses compostos como base ativa, foram utilizadas na maioria dos hospitais que apresentaram casos suspeitos ou confirmados de infecções associadas à RGM.

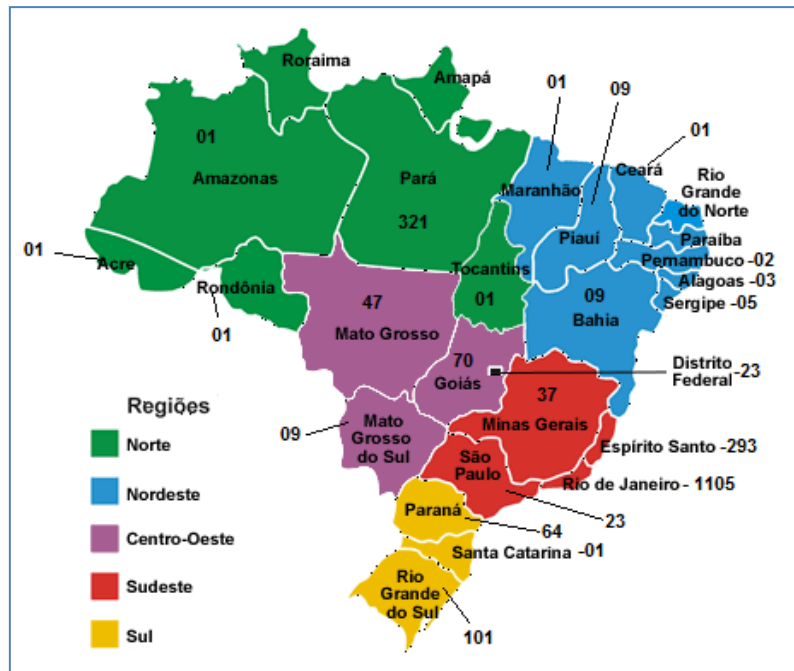
De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no período entre janeiro de 2003 até abril de 2008, no Brasil, foram notificados 2128 casos de infecção por MNT (**Gráfico 1**). Foram confirmados: 1105 casos no Rio de Janeiro; 321 no Pará; 293 no Espírito Santo; 101 no Rio Grande do Sul; 70 em Goiás, 64 no Paraná; 47 no Mato Grosso; 37 em Minas Gerais; 23 tanto em São Paulo quanto no Distrito Federal; 09 em cada um dos estados: Piauí; Mato do Grosso do Sul e Bahia; 05 em Sergipe; 03 em Alagoas; 02 em Pernambuco. Um caso foi confirmado em cada um dos estados: Acre, Amazonas, Ceará, Maranhão, Rondônia, Santa Catarina e Tocantins (**Figura 6**). Nenhum caso foi notificado em 2009.



**Gráfico 1.** Casos de infecção por MNT notificados entre 2003 e 2008.

Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/notificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf)





**Figura 6.** Distribuição dos casos de infecção por MNT notificados entre 2003 e 2008 no Brasil. Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite\\_micobacteria/notificados.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/hotsite_micobacteria/notificados.pdf)

A maioria dos micro-organismos isolados nos espécimes clínicos era pertencente ao complexo *M. chelonae-abscessus* (principalmente *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. massiliense*) e *M. fortuitum*, sendo a maioria dos surtos registrados no Brasil causados por *M. massiliense* (BRASIL, 2008).

A ANVISA publicou o primeiro informe técnico em 2005 contendo informações sobre diagnóstico, tratamento, prevenção e meios de notificação dos casos suspeitos ou confirmados de infecção por MNT (BRASIL, 2005). No ano de 2007 foram publicados quatro informes técnicos a respeito do assunto. Apesar da ausência de informações sobre a exata fonte desses micro-organismos, as medidas preventivas giram em torno de cuidados a serem adotados durante o reprocessamento de instrumentais: limpeza rigorosa, uso da solução de glutaraldeído a 2% por no mínimo 10 horas e até mesmo, substituição de esterilizantes químicos líquidos por esterilização a vapor ou esterilizantes gasosos.

### 3.9. Resistência do gênero *Mycobacterium* a Desinfetantes e Antimicrobianos

De forma geral, as bactérias usam uma série de estratégias para adquirir resistência a medicamentos. Estas podem ser resumidas em basicamente quatro categorias: (1) mecanismos de barreira (menor permeabilidade e bombas de efluxo), (2) degradação ou inativação da droga como p. ex.,  $\beta$ -lactamases, (3) modificações do alvo da droga, p. ex., mutação em um

gene chave e (4) produção de moléculas que mimetizam o alvo da droga, p. ex., produção de proteínas de ligação a penicilinas alteradas, que passam a não sofrer ação da droga (HETT & RUBIN, 2008; LI & NIKAIDO, 2009).

A resistência natural de micobactérias aos agentes antibacterianos frequentemente usados pode ser explicada, em primeiro lugar, pela presença de sua parede celular característica que exibe permeabilidade significativamente reduzida para muitos compostos. Em combinação com a baixa taxa de difusão através da parede celular, micobactérias podem utilizar outros mecanismos como: bombas de efluxo, enzimas de modificação ou degradação da droga, enzimas de modificação do alvo da droga e produção de moléculas que mimetizam este alvo (HETT & RUBIN, 2008).

Uma vez que os biocidas tendem a agir concomitantemente em vários locais do micro-organismo, a resistência é geralmente mediada por mecanismos não específicos. Bombas de efluxo apresentam potencial para atuar em uma ampla faixa de compostos quimicamente semelhantes e resultam tanto em bactérias resistentes a biocidas quanto a antimicrobianos (FRAISE, 2002). Por exemplo, estudos realizados com cepas mutantes de *M. smegmatis* deletadas para os genes *lfrA* e *mshA*, que codificam, respectivamente a principal bomba de efluxo e porina desta espécie, mostraram que, na ausência da principal porina de *M. smegmatis*, MspA, as células tornam-se mais resistentes a diversos antimicrobianos, glutaraldeído e orto-ftaldeído. Por outro lado, quando a principal bomba de efluxo de *M. smegmatis*, LfrA, é deletada, a cepa mutante apresenta um aumento na susceptibilidade a isoniazida, rifampicina, etambutol e ciprofloxacina. Estes resultados colocam em evidência que a porina MspA é um canal importante para a entrada de antimicrobianos e desinfetantes nas células e que o efluxo ativo através da bomba de efluxo LfrA está envolvido na resistência a diversos antimicrobianos em *M. smegmatis* (SANDER *et al.*, 2000, SVETLÍKOVA *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes são obtidos quando se compara a cepa padrão de *M. chelonae* (ATCC357552) susceptível a desinfetantes (glutaraldeído e orto-ftaldeído) e antimicrobianos com isolados clínicos que apresentam altos níveis de resistência. A cepa padrão apresenta três genes que codificam proteínas semelhantes à porina MspA de *M. smegmatis* enquanto a cepa resistente apresenta mutação nestes genes que resultam em defeito na atividade da porina (SVETLÍKOVA *et al.*, 2009).

Alterações na parede celular também apresentam um papel importante na resistência cruzada entre biocidas e antimicrobianos, provavelmente por redução da permeabilidade (FRAISE, 2002). Estudos mostram que em *M. chelonae* a redução na susceptibilidade ao

glutaraldeído foi associada com a redução na susceptibilidade a rifampicina e etambutol. Na fração de lipoarabinogalactano da parede celular, as cepas resistentes a glutaraldeído apresentam menos arabinose, manose e galactose e mais glicose do que a cepa sensível. Alterações nos monossacarídeos das frações de arabinogalactano e arabinomanano podem contribuir para permeabilidade reduzida da parede celular, reduzindo a penetração do glutaraldeído e etambutol e dificultando sua ação nos sítios alvo (MANZOR *et al.*, 1999, MILLER *et al.*, 2006).

Em circunstâncias normais, *M. chelonae* tem uma parede celular bem estruturada com uma bicamada de resíduo de ácido micólico, que é relativamente impermeável. Os componentes glicolipídicos principais, lipomananos ou lipoarabinomananos, são muito diferentes em *M. chelonae* quando comparadas com outras espécies de micobactérias já estudadas. Entretanto, ainda existem poucos estudos correlacionando patogenicidade e estrutura da parede celular de *M. chelonae* (HAY, 2009).

Alterações microbianas que resultam em resistência cruzada entre biocidas e antimicrobianos são motivos de preocupação nos dias atuais. Em 1903 FRIEDMAN isolou pela primeira vez, *M. chelonae* de ambientes atipicamente associados à micobactérias. Atualmente, já foi relatado que estes micro-organismos são capazes de se multiplicar tanto em água natural quanto em água tratada e tem sido reportado como um organismo problemático em hospitais, sendo associado com fluidos de hemodiálise e algumas soluções desinfetantes. Além disso, já foram descritas amostras de *M. chelonae* capazes de manter a viabilidade e multiplicar-se por no mínimo 30 dias em água destilada a 25°C (PITOMBO *et al.*, 2009) e grande número de isolados de *M. smegmatis* que são capazes de crescer a 45°C (BROWN-ELLIOTT & WALLACE, 2002). Existem ainda estudos descrevendo uma possível resistência de organismos do grupo *M. chelonae-M. abscessus* e *M. mucogenicum* ao processo de cloração utilizado para tratamento de água de piscinas ou de consumo, e tratamentos com glutaraldeído, cloreto de benzalcônio, compostos organomercuriais, clorexidina e até mesmo autoclavagem (PITOMBO *et al.*, 2009).

A formação de biofilmes também pode auxiliar na sobrevivência e propagação de micro-organismos. Um experimento utilizando tubos polivinilcloreto preenchidos com água destilada e, em seguida, inoculados com bactérias mostrou que *M. chelonae* (e outros organismos que não micobactérias) sobrevive à adição de germicidas como o desinfetante Iodofor, detergente fenólicos, compostos de amônio quaternário, formaldeído 2% e glutaraldeído 2%. Amostras extraídas do tubo após o experimento mostraram que as bactérias foram incorporadas ao material extracelular, sugerindo que o processo de crescimento

resultou na formação de uma barreira protetora. Ainda não está claro como é a estrutura de biofilme no qual *M. chelonae* está presente (HAY, 2009).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Investigar a susceptibilidade dos micro-organismos encontrados em soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas durante o processo de montagem de próteses de valvas cardíacas biológicas.

### 4.2. Objetivos específicos

- Investigar a presença de micro-organismos nas soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas na preservação das valvas ao longo da linha de montagem;
- Investigar a relação entre o tempo para o processamento das valvas e a presença de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2%;
- Identificar os micro-organismos isolados;
- Comparar a habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de glutaraldeído 0,1% e 0,2%;
- Investigar a habilidade de crescimento de micro-organismos isolados em solução de formaldeído 10%.

## 5. METODOLOGIA

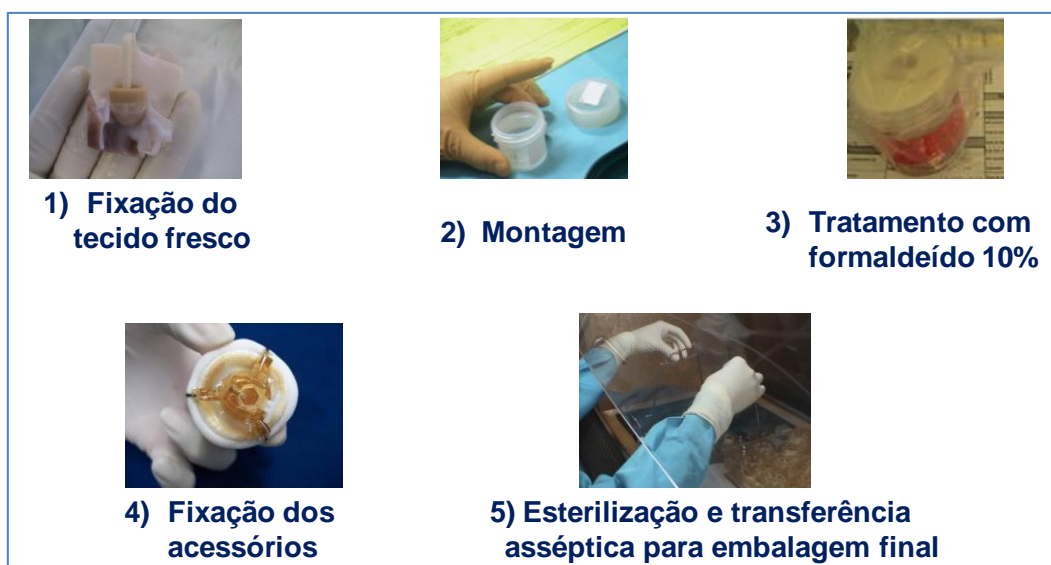
Este trabalho é uma coletânea de dados resultantes de avaliações realizadas pelo Setor de Controle de Qualidade Microbiológico de um fabricante de próteses de valvas cardíacas biológicas. O fabricante avaliado é uma empresa multinacional de grande porte, líder mundial em tecnologia de próteses de valvas cardíacas, cujos produtos são vendidos em mais de 100 países. A unidade de fabricação do Brasil é certificada pela ANVISA, FDA e ISO.

Neste fabricante, as principais etapas do processo produtivo são (**Figura 7**):

- 1) Fixação do tecido fresco: realizada com glutaraldeído, que estabelece ligações cruzadas entre as fibras colágenas e aumenta a estabilidade do tecido.
- 2) Montagem: Sutura manual dos folhetos ao anel polimérico. Nesta etapa as valvas são conservadas em potes individuais contendo solução de glutaraldeído 0,2% com o

objetivo de reduzir a carga microbiana sem danificar o material. Entretanto, do ponto de vista econômico e de saúde e segurança ocupacional, seria interessante utilizar uma solução de glutaraldeído de menor concentração, 0,1%, por exemplo.

- 3) Tratamento com formaldeído 10%: imersão da valva durante 24 horas em pote individual contendo solução de formaldeído 10%.
- 4) Fixação dos acessórios: nesta etapa as valvas permanecem nos potes individuais contendo solução de glutaraldeído 0,2%.
- 5) Esterilização química e transferência asséptica para a embalagem final.



**Figura 7.** Principais etapas do processo produtivo do fabricante avaliado

A utilização dos dados apresentados e discutidos é do conhecimento e tem a permissão do fabricante.

### **5.1. Investigação da presença de micro-organismos nas soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas para conservação das valvas ao longo da linha de montagem**

Com o auxílio de pipetas estéreis, foram coletados 10 mL de soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas para a conservação de 51 valvas ao longo da linha de montagem. As amostras foram armazenadas em tubos estéreis identificados com o número de série e o tempo de processamento da valva e informações sobre a coleta (data e hora).

Os testes das amostras foram realizados no mesmo dia da coleta por espalhamento em superfície de placas de TSA (ágar triptcaseína de soja) (**Anexo 1**). Foram realizadas diluições decimais seriadas das soluções de glutaraldeído 0,2% até  $10^{-6}$ . Aplicou-se 1 mL de cada

diluição em placas de TSA que foram, então, incubadas por 14 dias em aerobiose em estufa com temperatura média de 32°C. Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi contado em cada placa e o resultado calculado em número de UFC por mL de solução para cada amostra.

## **5.2. Investigação da relação entre o tempo para o processamento das valvas e a presença de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2%**

As 51 amostras coletadas de solução de glutaraldeído 0,2% foram separadas em 4 grupos de acordo com o número de dias de processamento das valvas.

- Grupo A: tempo de processamento entre 1 e 9 dias
- Grupo B: tempo de processamento entre 10 e 19 dias
- Grupo C: tempo de processamento entre 20 e 29 dias
- Grupo D: tempo de processamento igual ou superior a 30 dias

Calculou-se o número médio de dias de processamento e a carga média de micro-organismos de cada grupo. Estes valores foram utilizados para a construção de um gráfico de dispersão XY.

## **5.3. Identificação dos micro-organismos isolados**

Os micro-organismos recuperados em cultura foram enviados a um laboratório terceirizado e identificados por sequenciamento da região 16S rDNA.

## **5.4. Comparação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de glutaraldeído 0,1% e 0,2%**

Foram utilizados micro-organismos isolados das soluções de glutaraldeído 0,2% de valvas com 08, 30 e 55 dias em processamento, denominados Pro08, Pro 30 e Pro 55, respectivamente.

As colônias microbianas referentes a cada amostra valvar crescidas no cultivo primário em placas de agar TSA foram diluídas em 10 mL de solução salina 0,9% de modo a obter uma concentração de  $10^5$  UFC/mL.

Em frascos de vidro estéreis, foram adicionados 29,7 mL de solução de glutaraldeído preparada na hora a uma quantidade de aproximadamente 5 g de tecido suíno e 0,3 mL da suspensão de micro-organismos. Foram preparados 3 frascos com solução de glutaraldeído 0,1% e 3 frascos com solução de glutaraldeído 0,2% para cada amostra. Dois frascos

contendo 30 mL de solução de glutaraldeído e aproximadamente 5 g de material biológico, um para cada concentração da solução de glutaraldeído, foram utilizados como controle do experimento. Os frascos foram mantidos em estufa com temperatura média de 24°C durante 30 dias. A quantidade de tecido e o volume de solução de glutaraldeído usados no experimento são semelhantes àqueles utilizados para a fabricação de uma valva cardíaca. A temperatura utilizada para a incubação dos frascos testes é semelhante àquela da linha de montagem.

O conteúdo dos frascos teste e controle foram avaliados após 1, 4, 8, 16 e 30 dias de incubação em estufa com temperatura média de 24°C. Foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$  das soluções de glutaraldeído dos frascos. As amostras foram testadas por espalhamento em superfície, aplicando-se 1 mL de cada diluição em placas de TSA. As placas foram incubadas por 14 dias em aerobiose em estufa com temperatura média de 32°C. Após o período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado em cada placa e o resultado calculado em número de UFC por mL de solução.

### **5.5. Investigação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de formaldeído 10%.**

Foram utilizados micro-organismos isolados das soluções de glutaraldeído 0,2% de valvas com 30 e 55 dias em processamento, denominados Pro 30 e Pro 55, respectivamente.

As colônias microbianas referentes a cada amostra valvar crescidas no cultivo primário em placas de agar TSA foram diluídas em 10 mL de solução salina 0,9% de modo a obter uma concentração de  $10^5$  UFC/mL.

Em frascos de vidro estéreis, foram adicionados 29,7 mL de solução de formaldeído 10%, preparada na hora a uma quantidade de aproximadamente 5 g de tecido suíno e 0,3 mL da suspensão de micro-organismos. Foram preparados 3 frascos com solução de formaldeído 10% para cada amostra. Um frasco contendo 30 mL de solução de formaldeído 10% e aproximadamente 5 g de material biológico foi utilizado como controle do experimento. Os frascos foram mantidos em estufa com temperatura média de 24°C durante 24 horas, condição semelhante àquela da linha de montagem.

O conteúdo dos frascos teste e controle foram testados após 24 horas de incubação em estufa com temperatura média de 24°C. Foram realizadas diluições decimais seriadas até  $10^{-6}$  das soluções de formaldeído dos frascos. As amostras foram testadas por espalhamento em superfície, aplicando-se 1 mL de cada diluição em placas de TSA. As placas foram incubadas por 14 dias em aerobiose em estufa com temperatura média de 32°C.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Investigação da presença de micro-organismos nas soluções de glutaraldeído 0,2% utilizadas na conservação das valvas ao longo da linha de montagem

Durante todo o período de montagem, as valvas são conservadas em solução de glutaraldeído 0,2%. Para a determinação da efetividade da ação da solução de glutaraldeído 0,2% ao longo da linha de montagem de valvas cardíacas biológicas foi realizada uma pesquisa da presença de micro-organismos durante o processamento das valvas.

Micro-organismos foram recuperados em 43 (84,3%) das 51 amostras de solução de glutaraldeído 0,2% (**Tabela 2**) avaliadas por cultivo em placas de TSA. A análise dos números de UFC mostra uma variação de 0 a  $1,6 \times 10^5$ . É interessante observar que existem períodos maiores de tempo de processamentos que apresentam números baixos. Entretanto, de maneira geral quanto maior o tempo de processamento maior o número de UFC encontrado. Pode-se observar maior frequência de UFC quando o tempo de confecção das valvas é superior a 20 dias.

**Tabela 2.** Quantidade de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2% em função do tempo em processamento das valvas.

Tempo de processamento (dias)	Resultado (UFC/mL)
1	15
3	10
4	7
5	430
5	133
5	7
5	3
5	30
6	1
6	11
6	2
7	1
7	1
8	910
9	180
10	56000
11	0
11	39



12	15
12	0
13	14
17	7
18	11
18	2390
19	20
19	0
20	11300
20	0
20	11
21	8
21	0
22	4500
24	0
24	1
24	0
25	0
26	6700
27	1227
28	48000
30	990
31	63
31	17200
31	7700
33	1610
34	0
35	14
35	650
51	7200
55	160000
106	9300
130	71000

É importante mencionar que, a visualização das colônias somente foi possível após aproximadamente 10 dias de incubação. De maneira interessante, somente duas morfologias foram observadas nas placas que apresentaram crescimento:

- Morfologia 1: circular, umbonada lisa, brilhante, viscosa, branca.
- Morfologia 2: circular, umbonada, rugosa, seca, embaçada, branca.

A morfologia 1 estava presente somente nas placas referentes às valvas com menor tempo de processamento (até 20 dias), ao passo que a morfologia 2 estava mais presente nas placas referentes às valvas com maior tempo de processamento, acima de 20 dias, aparecendo em menor número nas placas referentes às valvas com menor tempo de processamento. Representantes das duas morfologias foram submetidos à coloração de Gram. Apesar de

terem se corado mal, ambos apresentaram-se como bastonetes Gram positivos. Em seguida, representantes das duas morfologias foram submetidos à coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen e apresentaram-se como bastonetes álcool – ácido resistentes.

## 6.2. Investigação da relação entre o tempo para o processamento das valvas e a presença de micro-organismos na solução de glutaraldeído 0,2% e tecido suíno

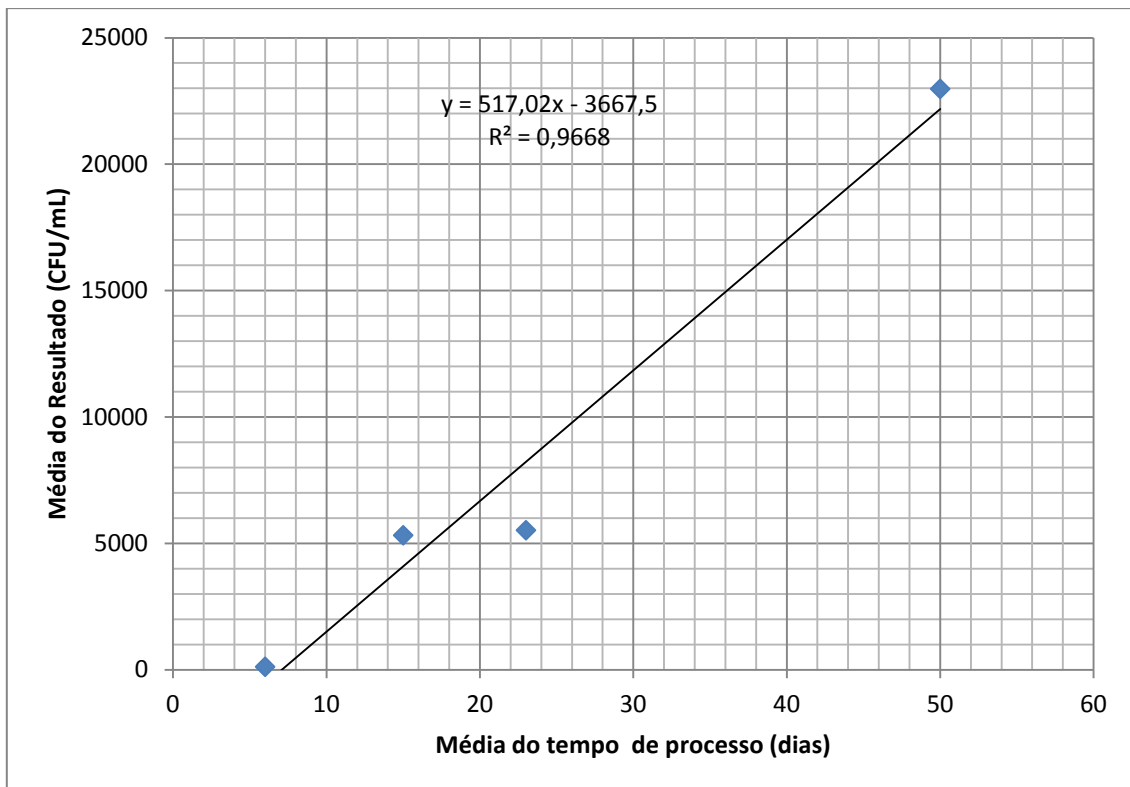
A **Tabela 3** apresenta os números médios de dias de processamento das valvas e a carga média de micro-organismos encontrada em cada grupo. Observa-se que no Grupo A, correspondente ao período inicial de processamento, até 9 dias, o número médio de UFC é muito mais baixo do que aquele observado nos outros grupos. No outro extremo verificamos que aquelas valvas com tempo de processamento superior a 30 dias apresentam uma carga maior de micro-organismos. Por outro lado, pode-se verificar que a média de UFC encontrada nos Grupos B e C são semelhantes. Ou seja, na média, processamentos variando entre 10 e 30 dias apresentam riscos semelhantes de contaminação.

**Tabela 3.** Número médio de dias de processamento e a carga média de micro-organismos presentes em cada grupo

Grupo	Número de dias para o processamento	Número de amostras	Número médio de dias para o processamento	Média (UFC/mL)
A	1 a 9	15	6	116
B	10 a 19	11	15	5318
C	20 a 29	13	23	5519
D	30 ou mais	12	50	22977

As observações acima ficam ainda mais claras quando os resultados são mostrados em um gráfico de dispersão apresentando um grau de variância explicada de 96,7% (**Gráfico 2**). Estes resultados mostram com evidência que quanto menor o tempo de processamento da valva, menor é o risco de contaminação por micro-organismos.

**Gráfico 2.** Gráfico de dispersão XY da média do tempo de processamento das valvas em função da carga média de micro-organismos das soluções de glutaraldeído 0,2%.



### 6.3. Identificação dos micro-organismos isolados

Quatro micro-organismos recuperados em cultura, dois de cada morfologia foram identificados por sequenciamento da região 16S rDNA:

- Morfologia 1 (amostras Pro08 e Pro17)
- Morfologia 2 (amostras Pro30 e Pro55)

As quatro amostras foram identificadas como *Mycobacterium abscessus* (99,99%) / *Mycobacterium chelonae* (99,99%), duas micobactérias de crescimento rápido (RGM). As espécies apresentaram percentuais de correspondência idênticos o que não permitiu sua diferenciação após o sequenciamento de um fragmento amplificado de 500 pares de base (Anexo 2).

### 6.4. Comparação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de glutaraldeído 0,1% e 0,2%

Os controles do experimento não exibiram crescimento.

A **Tabela 4** apresenta a carga média da amostra Pro08 ao longo do tempo. Pode-se observar que não houve crescimento no tempo avaliado nas soluções de glutaraldeído 0,1 e 0,2%.

**Tabela 4.** Crescimento da amostra Pro08 em soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%

Dias de incubação	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,1%	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,2%
01	00	00
04	00	00
08	00	00
16	00	00
30	00	00

A carga média da amostra Pro30 ao longo do tempo está apresentada na **Tabela 5**. Apesar do declínio inicial do número de UFC desta amostra nas duas diluições de glutaraldeído (dia 04), as colônias que permaneceram viáveis aparentemente passam por um período de adaptação e no dia 08 estão na fase logarítmica de crescimento na solução de glutaraldeído 0,1%. Este processo é atrasado quando a incubação ocorre na solução de glutaraldeído 0,2%, pois somente no dia 16 a fase logarítmica pode ser observada.

Pode-se observar ainda que o número de UFC é sempre menor para as colônias submetidas ao tratamento com glutaraldeído 0,2%.

**Tabela 5.** Crescimento da amostra Pro30 em soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%

Dias de incubação	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,1%	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,2%
01	333	440
04	270	223
08	2123	190
16	32433	2253
30	2286667	267333

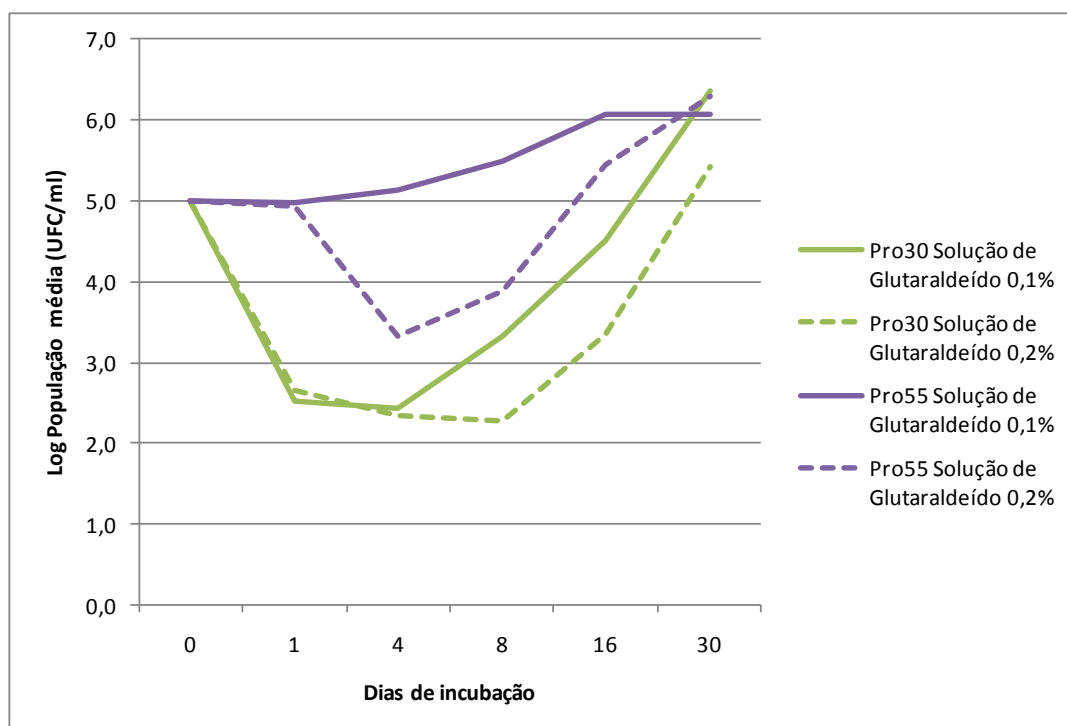
A avaliação da amostra Pro55 mostrou que não houve um declínio inicial do número de células quando a incubação ocorre na solução de glutaraldeído 0,1%. Podemos observar ainda que, ao final do período de incubação, o número de UFC nas soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2% é praticamente o mesmo:  $10^6$ . A carga média da amostra Pro55 ao longo do tempo está apresentada na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Crescimento da amostra Pro55 nas soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%

Dias de incubação	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,1%	População média (UFC/ml) Solução de Glutaraldeído 0,2%
01	93000	86000
04	139000	2110
08	310000	7700
16	1150000	284000
30	1200000	2000000

O log dos resultados das amostras Pro30 e Pro55 foi utilizado para construção das curvas de crescimento (**Gráfico 3**).

**Gráfico 3.** Curva de crescimento das amostras Pro30 e Pro55 nas soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%



### 6.5. Investigação da habilidade de crescimento dos micro-organismos isolados em solução de formaldeído 10%.

Não foi observado crescimento de RGM em nenhuma das amostras avaliadas após 24 horas, indicando que o tratamento com solução de formaldeído 10% é eficiente para reduzir números elevados de RGM observados durante as fases iniciais da montagem.

## 7. DISCUSSÃO

Próteses de valvas cardíacas são utilizadas para substituir, cirurgicamente, valvas doentes do coração (**Figura 1**), que apresentam funcionamento anormal e melhoram significativamente a qualidade de vida do paciente. Os diferentes substitutos valvares disponíveis atualmente no mercado podem ser classificados em dois grandes grupos: próteses mecânicas e próteses biológicas (**Figura 2**).

O mercado mundial de próteses de valvas cardíacas está em expansão desde 2001 (VESELY, 2005). Atualmente, as próteses de valvas cardíacas biológicas representam 70% do total de vendas da indústria deste segmento e seu uso tende a crescer em média 5% por ano. Este crescimento é esperado devido ao envelhecimento da população, à preferência contínua por próteses de valvas cardíacas de origem biológica e aos avanços das técnicas de bioengenharia que prometem inovações de produtos e melhorias tecnológicas para melhorar sua durabilidade.

Em paralelo ao crescimento do uso das próteses biológicas de valvas cardíacas, nos últimos anos, aumentou também o número de casos de infecções relacionadas a estes dispositivos.

Para que a falta de qualidade das próteses não comprometa o crescimento do segmento e, principalmente, não cause danos ao paciente, é necessário conhecer os riscos associados ao processamento das próteses valvares biológicas e monitorá-los.

Para o monitoramento da carga microbiana realizado nesta monografia adotamos uma abordagem que avalia a presença de micro-organismos utilizando a solução de glutaraldeído 0,2% (**Figuras 3 e 4**), onde as valvas permanecem armazenadas ao longo da linha de montagem e não a própria valva. Esta pode ser uma alternativa importante para a avaliação da carga microbiana de próteses valvares tendo em vista o custo financeiro, uma vez que as valvas não são perdidas quando submetidas aos testes microbiológicos. Além disso, do ponto de vista técnico esta abordagem evita as etapas de extração, uma vez que é difícil o trabalho com o material após a montagem das próteses. A utilização desta abordagem nos permitiu realizar o teste em um maior número de amostras (51 amostras). Uma abordagem diferente, utilizando diretamente fragmentos de valvas aórticas incubados em 4 meios de cultura distintos (meios de Thioglycollate, Brain-Heart-Infusion, Sabouraud-Dextrose líquido e Micosel), foi utilizada por CASAGRANDE *et al.* em 1986 também para avaliar a carga microbiana de próteses de valvas biológicas. Ressaltamos a dificuldade de acesso de forma mais detalhada, às abordagens utilizadas para o monitoramento de carga microbiana ao longo

de linhas de montagem de próteses de valvas cardíacas, visto que este monitoramento, quando realizado, o é pelo fabricante, que não tem interesse em divulgar a abordagem metodológica utilizada.

Das 51 amostras de solução de glutaraldeído 0,2% avaliadas, 43 (84,3%) apresentaram crescimento de micro-organismos (**Tabela 2**). As contagens observadas nas soluções de glutaraldeído 0,2% que apresentaram crescimento variaram consideravelmente: de 1 UFC/ml a  $1,6 \times 10^5$  UFC/ml. Apesar de existirem valvas com períodos longos de processamento que apresentaram baixas contagens de micro-organismos, de maneira geral, quanto maior o tempo de processamento das valvas maior a quantidade de micro-organismos encontrada (**Tabela 3**). Esta relação entre a quantidade de micro-organismos e o tempo de processamento das valvas pode ser comprovada com o percentual de variância explicada de 96,7% (**Gráfico 2**). Este percentual indica um bom ajuste dos valores experimentais em relação aos valores previstos pelo modelo.

É interessante verificar que, em todas as placas que apresentaram crescimento, somente duas morfologias de colônias foram observadas, ambas bastonetes álcool – ácido resistentes. As quatro amostras, duas de cada morfologia, enviadas para a identificação molecular (**Anexo 2**), foram identificadas como duas espécies de micobactérias de crescimento rápido (RGM-Grupo IV) (**Tabela 1**), *Mycobacterium abscessus* (99,99%) / *Mycobacterium chelonae* (99,99%). Esta diferença de morfologia entre colônias de *M. chelonae* submetidas ao tratamento com glutaraldeído também foi relatada por MANZOOOR *et al.* (1999). Estes autores observaram que as colônias de *M. chelonae* de cepas resistentes ao glutaraldeído eram consideravelmente mais secas e cerosas do que as colônias de cepas sensíveis, que se apresentavam lisas e brilhantes. Uma provável explicação apresentada neste trabalho para estas alterações na morfologia das colônias é a alteração na composição da parede da bactéria (**Figura 5**). Sendo assim, é possível que esta diferença morfológica observada entre as nossas colônias também seja devida à diferença de resistência do micro-organismo à solução de glutaraldeído (**Tabelas 4, 5 e 6 e Gráfico 3**).

Apesar do meio TSA ser capaz de promover o crescimento de uma grande diversidade de micro-organismos apenas crescimento de micobactérias foi observado. Este fabricante de próteses produz seu próprio meio TSA que é submetido a testes de controle de qualidade incluindo não só sua esterilidade como a habilidade em permitir o crescimento de outras bactérias antes de ser liberado para a utilização (**Anexo 1**). Desta forma, existe mesmo uma grande probabilidade que as micobactérias observadas sejam realmente provenientes das

soluções de glutaraldeído 0,2% testadas e que estas soluções não estejam contaminadas por outros tipos de bactérias.

A presença destas micobactérias na linha de montagem de valvas cardíacas deve ser considerada porque as valvas são armazenadas em solução de glutaraldeído de baixa concentração (0,2%) ao longo de todo o processo de montagem e já existem diversos relatos de micobactérias resistentes a soluções de glutaraldeído até a 2% (FONTANA, 2008; JÚNIOR *et al.*, 2008; LORENA *et al.*, 2009; PITOMBO *et al.*, 2009; LORENA *et al.*, 2010). Este fato reforça a necessidade dos fabricantes de próteses de valvas cardíacas avaliarem periodicamente a carga microbiana do material ao longo de suas linhas de montagem bem como seus processos de triagem microbiológica, esterilização e embalagem para não comprometer a segurança dos pacientes.

As micobactérias isoladas na linha de montagem de valvas cardíacas são consideradas micobactérias de crescimento rápido (RGM) (**Tabela 1**), ou seja, capazes de crescer em até 7 dias de cultivo (normalmente em 3 ou 4). Entretanto, o menor tempo para a visualização das colônias neste trabalho foi de 10 dias. Este fato pode estar relacionado à utilização de placas de TSA no lugar de meios específicos para micobactérias. De maneira geral, a maioria das espécies de RGM pode ser cultivada em meios de cultura bacteriológicos simples contendo aminoácidos, glicerol e sais minerais (PITOMBO *et al.*, 2009). Entretanto, é importante estabelecer os meios de cultura e condições de incubação para favorecer a recuperação destas micobactérias e sua caracterização. Apesar de placas de TSA já terem sido utilizadas por TIWARI *et al.* em 2003 para avaliar a atividade desinfetante do cloreto de benzalcônio contra *M. abscessus*, a cultura de bactérias do gênero *Mycobacterium* geralmente é realizada em meios a base de ovos como o meio Löwenstein-Jensen (L.J.), que apresenta grande capacidade de tamponamento, contém glicerol e asparagina como fontes de carbono e nitrogênio e permite o crescimento da maioria das espécies de micobactérias (PFYFFER *et al.*, 2003). Outros meios solidificados à base de ágar, como o 7H10 e 7H11 de Middlebrook, também podem ser utilizados e propiciam crescimento mais rápido de micobactérias (SOMOSKÖVI *et al.*, 1999). Quanto à temperatura de incubação (média 32°C), foi utilizada uma temperatura semelhante à do corpo humano, onde as valvas são implantadas.

Um maior tempo para a visualização das colônias pode também ser devido à resistência das micobactérias ao glutaraldeído uma vez que um possível mecanismo de resistência destas bactérias ao sanitizante (mutação de genes que codificam porinas) pode tornar o crescimento mais lento por dificultar a entrada de nutrientes na célula (SVETLÍKOVA *et al.*, 2009).



O crescimento lento das micobactérias reforça a necessidade dos fabricantes de próteses de valvas cardíacas adequarem suas metodologias de testes de controle de qualidade. Esta necessidade foi inicialmente observada por CASAGRANDE *et al.* em 1986, que observou que as culturas permaneciam estéreis após 72 horas de incubação, mas colônias de micobactérias de crescimento rápido podiam ser visualizadas entre o 5º e 10º dia de incubação, enfatizando a necessidade de manter a incubação dos testes por, no mínimo 15 dias.

Em relação aos padrões de crescimento em soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%, é possível observar que existe diferença entre as amostras com diferentes tempos de processamento. Os micro-organismos isolados de valvas com menor tempo de processamento (Pro08) apresentaram a menor resistência entre os testados. Não foram observadas células viáveis da amostra Pro08 (oito dias de processamento), após 24 horas de exposição às soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2% (**Tabela 4**). A amostra Pro55, obtida de valva com tempo de processamento de 55 dias é mais resistente às soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2% do que a amostra Pro30, obtida de valva com tempo de processamento de 30 dias (**Tabelas 5 e 6**). Ambas as amostras são mais resistentes à solução de glutaraldeído 0,1% do que à solução de glutaraldeído 0,2% (**Gráfico 3**). Entretanto, tanto a amostra Pro30 quanto a amostra Pro55 são capazes não somente de sobreviver às soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2%, mas também de se multiplicar nestas soluções, alcançando níveis de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL, o que poderia explicar o fato de que micobactérias têm sido relatadas como contaminantes intrínsecos de valvas cardíacas armazenadas em soluções de glutaraldeído 0,2% desde 1977 (LASKOWSKI, 1977; STRABELLI *et al.* 2010).

A diferença de resistência observada entre as amostras de uma espécie frente às soluções de glutaraldeído 0,1% e 0,2% neste estudo já havia sido observada em estudos anteriores com *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. avium*. CARSON *et al.* (1978) relatou diferença de resistência a desinfetantes químicos entre cepas de *M. chelonae* e *M. fortuitum* e PINHEIRO (2001), observou esta diferença em cepas de *M. avium*. É interessante observar que os estudos de CARSON *et al.* (1978) e PINHEIRO (2001) foram realizados após poucos dias de exposição às soluções de glutaraldeído ao passo que, o presente estudo é mais extenso, com 30 dias de duração.

As amostras Pro30 e Pro55 não apresentaram sobreviventes após 24 horas de exposição à solução de formaldeído 10%, indicando que o tratamento realizado neste fornecedor de valvas cardíacas é eficiente para a eliminação de micobactérias das valvas após o processo de montagem. A eliminação de micobactérias resistentes à solução de

glutaraldeído de baixa concentração após tratamento com soluções de formaldeído também foi observada por CASAGRANDE *et al.* em 1986. Os autores demonstraram que a micobactéria isolada resistente ao glutaraldeído 0,625%, foi completamente eliminada após tratamento com formaldeído a 4%, 2% e mesmo quando estava na concentração de 1%.

Micobactérias vem sendo relatadas como contaminantes importantes de valvas cardíacas (TSAI *et al.*, 2008; WARWICK *et al.*, 2008; BUSH *et al.*, 2010; STRABELLI *et al.*, 2010; TORRES-DUQUE *et al.*, 2010); entretanto, as principais fontes de contaminação em casos de endocardites relacionados a implantes de valvas cardíacas mencionadas na literatura continuam sendo inoculação de micro-organismos da microbiota da pele ou região adjacente durante o implante; inoculação do patógeno pelas mãos de membros do corpo clínico ou instrumentais e disseminação de patógeno por via hematogênica (HINRICHSEN, 2007).

É importante, no entanto, chamar a atenção para o fato de que relatos recentes sobre a presença de micobactérias em valvas cardíacas, supostamente estéreis (STRABELLI *et al.*, 2010) trazem ao foco o fato de que casos de endocardites associados a implantes de valvas cardíacas podem também estar relacionados à contaminação do tecido durante a montagem das valvas cardíacas acompanhada de procedimentos inadequados de triagem e esterilização. Preocupante é o fato de que a endocardite causada por micobactérias caracteriza-se por longos períodos de incubação e hemocultura negativa. O longo período de incubação entre o implante da prótese e a manifestação clínica da endocardite, dificulta o estabelecimento de uma relação causa – efeito da contaminação, que algumas vezes é desvinculada erroneamente da contaminação da prótese. Os resultados negativos para hemocultura dificultam o diagnóstico e o tratamento.

Sendo assim, é necessário que fabricantes de valvas cardíacas realizem um exame cuidadoso dos níveis de carga microbiana do tecido ao longo de suas linhas de montagem, bem como de seus processos de triagem microbiológica e esterilização, pois micobactérias são capazes de permanecer por períodos prolongados em fluidos com baixa concentração de nutrientes. Além disso, é sempre importante lembrar que a contaminação por micobactérias é caracterizada por seu crescimento lento e pela dificuldade de detecção.

## 8. CONCLUSÕES

- É necessário controlar o tempo de processamento das próteses de valvas biológicas, pois este influencia a carga microbiana presente nas próteses e a resistência dos microorganismos à substância conservante.
- Se o tempo de processamento das próteses de valvas biológicas fosse reduzido para até 08 dias, a solução de glutaraldeído 0,1% poderia ser utilizada para conservação das valvas ao longo da linha de montagem.
- É importante que os fabricantes de próteses de valvas cardíacas avaliem periodicamente a carga microbiana presente no material ao longo de suas linhas de montagem, bem como de seus processos de triagem microbiológica e esterilização.
- É recomendável que os laboratórios de controle de qualidade das indústrias de próteses cardíacas desenvolvam metodologias adequadas (meio de cultura, temperatura e tempo de incubação) para a detecção de micobactérias associadas ao processo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI, T. M. *et al.* Amoebal coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, V. 42, N.12, p.5493–5501, 2004.

ALONSO-VALLE, H. *et al.* Clinical course and predictors of death in prosthetic valve endocarditis over a 20-year period. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, V. 139, p. 887-893, 2010.

BAUCIA J.A. *et al* Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. *Braz J Cardiovasc Surg*, V. 21, N. 2, p. 180-187, 2006.

BERNACCA, G. M. *et al.* Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model. *Biomateriais*, V. 13, N. 6, p. 345-352, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Braga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3º ED. Rio de Janeiro, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRITO, A.C. Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em saúde pública. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Sao Paulo, Faculdade de Saúde Publica. Departamento de Serviços de Saúde Publica, 2008.

BROWN-ELLIOTT, B.A. & WALLACE, R.J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, V. 15, N. 4, p. 716–746, 2002.

BUSH, L. M. *et al.* Mycobacterial Prosthetic Valve Endocarditis. *Current Infectious Disease Reports*, V. 12, N. 4, p. 257 - 265, 2010

CARDOSO A.M. *et al.* Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes Infect.*, V. 10, N. 14-15, p. 1552-1557, 2008.

CARPENTIER A. From valvular xenografts to valvular bioprosthesis (1965 – 1977). *Med. Instrum*, V. 11, N. 2, p. 98 – 101, 1977.

CARPENTIER, S. M. *et al.* Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses. *Ann. Thorac. Surg.*, V. 66, N. 6, p. S264-S268, 1998.

CARSON, L. A. *et al.* Growth Characteristics of Atypical Mycobacteria in Water and Their Comparative Resistance to Disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 36, N. 6, p. 839 - 846, 1978.

CASAGRANDE, I. S. J. *et al.* Micobactérias atípicas em bioprotese: causa potencial de endocardite com culturas negativas. *Rev. bras. cir. cardiovasc.*, V. 1, N. 1, p. 40 - 43, 1986.

CHANDA, J. *et al.* Heparin in calcification prevention of porcine pericardial bioprostheses. *Biomateriais*, V. 18, N. 16, p. 1109-1113, 1997.

CHANDA, J. Posttreatment with amino compounds effective in prevention of calcification of glutaraldehyde treated pericardium. *Artif. Organs*, V. 18, N. 5, p. 408-410, 1994.

CHANDY, T *et al.* Changes in pericardial calcification due to antiplatelet agents: in vitro studies. *Artif. Organs*, V. 22, N. 8, p. 666- 671, 1998.

DUARTE, R.S. *et al.* Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*. *Journal of Clinical microbiology*. V. 47, N. 7, p. 2149–2155, 2009.

FONTANA, R.T. As Micobactérias de Crescimento Rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. *Rev Bras Enferm*, V. 61, N. 3, p. 371 - 376, 2008.

FRAISE AP. Biocide abuse and antimicrobial resistance—a cause for concern? *J Antimicrob Chemother*, V. 49, N. 1, p. 11–12, 2002.

GATTI, A. M. *et al.* Calcification of chemically treated bovine pericardium. *Int. J. Artif. Organs*, V. 14, N. 10, p. 647-654, 1991.

GOODFELLOW, M. & MAGEE, J.G. Taxonomy of Mycobacteria, p.1-49. In: GANGADHARAM, P.R.J. & JENKINS, P.A (ed.). Mycobacteria I: Basic aspects. Chapman & Hall, New York, 1998.

GUNTHER, F. *et al.* Host defence against Staphylococcus aureus biofilms infection: Phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). Molecular immunology, V. 46, N. 8-9, p. 1805 - 1813, 2009.

HABIB, G. *et al.* Prosthetic Valve Endocarditis: Current Approach and Therapeutic Options. Progress in Cardiovascular Diseases, V. 50, N. 4, p. 274-281, 2008.

HAY, R.J. Mycobacterium chelonae – a growing problem in soft tissue infection. Current Opinion in Infectious Diseases. V. 22, N. 2, p. 99-101, 2009.

HETT, E. C. & RUBIN E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. Microbiology and molecular biology reviews, V. 72, N. 1, p. 126–156, 2008.

HINRICHSEN, S. L. A Tecnovigilância e o controle de Infecções. Qualidade: uma rotina necessária. Prática Hospitalar, Ano IX, N. 50, p. 135 – 144, 2007.

HIRSCH, D. *et al.* Effects of metallic ions and diphosphonates on inhibition of pericardial bioprothetic tissue calcification and associated alkaline phosphatase activity. Biomateriais, V. 14, N. 5, p. 371-377, 1993.

JORGE-HERRERO, E. *et al.* Study of the calcification of bovine pericardium: Analysis of the implication of lipids and proteoglycans. Biomateriais, V. 12, N. 7, p. 683-689, 1991.

JUN, L. *et al.* Fluidity of the lipid domain of cell wall from Mycobacterium chelonae. Proc. Natl. Acad. Sci. V.92, N.24, p. 11254-11258, 1995.

JÚNIOR *et al.*, Infecção por micobactéria após videoartroscopia: o glutaraldeído pode ser o culpado? Estudo experimental in vitro. Rev Bras Ortop, V. 43, N. 6, p. 256 - 260, 2008.

KHOR, E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. Biomateriais, V. 18, N. 2, p. 95-105, 1997.

KUBCA, G.P. & WAYNE, L.G. The Mycobacteria: A sourcebook. 15ed. Part A, p.177-193. New York: Marcel Dekker, 1984.

LASKOWSKI, L. F. *et al.* Fastidious Mycobacteria Grown from Porcine Prosthetic-Heart-Valve Cultures. N Engl J Med., V, 297 p. 101 – 102, 1977.

LEAO, S. *et al.* Characterization of Mycobacteria from a Major Brazilian Outbreak Suggests that Revision of the Taxonomic Status of Members of the *Mycobacterium chelonae* – *M. abscessus* Group is Needed. Journal of Clinical microbiology, V. 47, N. 9, p. 2691–2698, 2009.

LECLERC, H. *et al.* Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. Critical Reviews in Microbiology, V. 28, N. 4, p. 371–409, 2002.

LEE, W. K. *et al.* Heparinized bovine pericardium as a novel cardiovascular bioprosthesis. Biomaterials, V. 21, N. 22, p. 2323-2330, 2000.

Li, X.Z. & Nikaido, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs, V. 69, N. 12, p. 1555-1623, 2009.

LORENA, N. S. O. *et al.*, Infecção por micobactérias de crescimento rápido após procedimentos videocirúrgicos - a hipótese do glutaraldeído. Rev. Col. Bras. V. 36, N. 3, p. 266 - 267, 2009.

LORENA, N. S. O. *et al.*, Mycobacterium massiliense BRA100 strain recovered from postsurgical infections: resistance to high concentrations of glutaraldehyde and alternative solutions for high level disinfection. Acta Cirúrgica Brasileira, V. 25, N. 5, p. 455 - 459, 2010.

MANZOOR, S.E. *et al.* Reduced glutaraldehyde susceptibility in Mycobacterium chelonae associated with altered cell wall polysaccharides. J. Antimicrob. Chemother, V. 43, N. 6, p. 759- 765, 1999.

MENDELSON, K. & SCHOEN, F.J. Heart Valve Tissue Engineering: Concepts, Approaches, Progress, and Challenges. Annals of Biomedical Engineering, V. 34, N. 12, p. 1799–1819, 2006.

MILLER, C.D. *et al.* Diversity of soil mycobacterium isolates from three sites that degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology*, V. 102, N. 6, p. 1612–1624, 2007.

MIYAMOTTO M *et al.* Resistência tensional do pericárdio bovino fixado em glutaraldeído comparada com a da veia safena magna. *J Vasc Bras*, V. 8, N. 2, p. 103-111, 2009.

MOL, A. *et al.* Tissue engeneering of heart valves: advances and current challenges. *Experts Review of Medical. Devices*, V. 6, N. 3, p. 259-275, 2009.

PFYFFER, G.E. *et al.* Mycobacterium: general characteristics, laboratory detection and staining procedures. In: MURRAY, P.R., BARON, E. J., JORGENSEN, J.H., LANDRY, M.L., PFALLER, M.A. *Manual of clinical Microbiology*. V.1 p. 543 - 572, 2006.

PINHEIRO, S.R. Avaliação da atividade micobactericida de desinfetantes químicos sobre estirpes de *Mycobacterium avium*, isoladas de suínos abatidos no estado de Santa Catarina, no ano de 1999. Tese (livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

PITOMBO, M. B. *et al.* Infecções por micobactérias de crescimento rápido resistentes a desinfetantes: uma problemática nacional? *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, V. 31, N.11, 2009.

RESTREPO, A.V. Pesquisa de Micobactérias Ambientais em água de torneira, luvas e soluções utilizadas em procedimentos cirúrgicos no Hospital Universitário Getúlio Vargas - Manaus/AM. *Acta Amaz*, V. 39, N. 4, p. 889-899, 2009.

ROSSI, M. A. *et al.* Lipid extraction attenuates the calcific degeneration of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *J. Exp. Pathol. (Oxford)*, V. 71, N. 2, p. 187-196, 1990.

RUNYON E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North. Am.* V. 43, N. 1, p. 273-290, 1959.

SAMPAIO, J. L. M. *et al.* An Outbreak of Keratitis Caused by *Mycobacterium immunogenum*. *Journal of Clinical Microbiology*, V. 44, N. 9, p. 3201–3207, 2006.



- SAN MARTIN, J. *et al.* Relevance of Clinical Presentation and Period of Diagnosis in Prosthetic Valve Endocarditis. *J Heart Valve Dis.*, V. 19, N. 1, p. 131 - 138, 2010.
- SANDER, P. *et al.* Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiology Letters*, V. 193, N. 1, p. 19–23, 2000.
- SOMOSKÖVI Á., Magyar P. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with MB Redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimen. *Journal of Clinical Microbiology*, V. 37, N. 5, p. 1366–1369, 1999.
- SOROUSH, S. *et al.* Characterisation of porin genes from *Mycobacterium fortuitum* and their impact on growth. *BMC Microbiology*, V. 9, N. 31, p. 1471-1488, 2009.
- SPRINGER, B. *et al.* Phylogeny of the Mycobacterium chelonae-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of Mycobacterium mucogenicum sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, V. 45, N. 2, p. 262–267, 1995.
- STRABELLI, TM, *et. al.* Mycobacterium chelonae valve endocarditis resulting from contaminated biological prostheses. *J Infect.* V. 60, N.6, p. 467-473, 2010.
- SVETLÍKOVA, Z. *et al.* Role of Porins in the Susceptibility of Mycobacterium smegmatis and Mycobacterium chelonae to Aldehyde-Based Disinfectants and Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, V. 53, N. 9, p. 4015–4018, 2009.
- TAN, W. M. *et al.* Trivalent metal ions in the prevention of calcification in glutaraldehyde treated biological tissues. Is there a chemical correlation? *Biomaterials*, V. 14, N. 13, p. 1003-1007, 1993.
- TIWARI, T. S. P. *et al.* Forty Years of Disinfectant Failure: Outbreak of Postinjection Mycobacterium abscessus Infection Caused by Contamination of Benzalkonium Chloride. *CID*, V, 36 p. 954 – 962, 2003.
- TORRES-DUQUE, C. A. *et al.* Disseminated mycobacteriosis affecting a prosthetic aortic valve: first case of Mycobacterium peregrinum type III reported in Colombia. *Biomédica*, V. 30, N. 3, p. 332 - 337, 2010.

TORTOLI, E. *et al.* *Mycobacterium insubricum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, V. 59, N. 6, p. 1518-1523, 2009.

TSAI, W. *et al.* *Mycobacterium abscessus* Endocarditis: A Case Report and Literature Review. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, V. 24, N. 9, p. 481-486, 2008.

VAN NOORT, R. *et al.* A study of the effects of glutaraldehyde and formaldehyde on the mechanical behavior of bovine pericardium. *Biomaterials*, V. 3, N. 1, p. 21-26, 1982.

VESELY, I. Heart Valve Tissue Engineering. *Circulation Research*. V. 97, N.8 p. 743-755, 2005.

VIANA-NIERO, C. *et al.* Molecular Characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in Isolates Collected from Outbreaks of Infections after Laparoscopic Surgeries and Cosmetic Procedures *Journal of Clinical Microbiology*, V. 46, N. 3, p. 850–855, 2008.

WALLACE, R. J. *et al.* Human disease due to *Mycobacterium smegmatis*. *J Infect Dis*, V. 158, N. 1, p. 52–59, 1988.

WARWICK, R.M. *et al.* *Mycobacteria* and allograft heart valve banking: an international survey. *Journal of Hospital Infection*, V. 68, N. 3, p. 255-261, 2008.

WEBB, C. L. *et al.* Aminodiphosphonate or Al preincubation inhibits calcification of aortic homografts in the rat subdermal model. *ASAIO Journal*, V. 34, N. 3, p. 851-854, 1988.

XI, T. *et al.* Prevention of tissue calcification on bioprosthetic heart valve by using epoxy compounds: a study of calcification tests in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.*, V. 26, N. 9, p. 1241-1251, 1992.

ZHAO, Q. *et al.* Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. *Medical Engineering & Physics*, V. 30, N. 3, p. 341 - 349, 2008.

## ANEXO 1 – Composição do meio TSA

<b>Componente</b>	<b>Quantidade (g/L)</b>
Peptona de Caseína	15,0
Peptona de Soja	5,0
Cloreto de Sódio	5,0
Agar – Agar	15,0

Nota: o meio TSA utilizado nos estudos é produzido pelo próprio fabricante de próteses e é submetido a um rígido controle de qualidade antes de ser liberado para a utilização. No mínimo 10% de cada lote de meio produzido é pré-incubado em estufa com temperatura média de 32 °C por 3 dias e em estufa com temperatura média de 24 °C por 5 dias para controle de esterilidade. Além disso, cada lote de meio é submetido ao teste para avaliação da habilidade de promover crescimento. Neste teste, o meio é inoculado com cepas padrão (ATCC) dos seguintes micro-organismos: *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que devem ser capazes de crescer.

ANEXO 2 – Relatório de identificação de micro-organismos

LINE NO.	SAMPLE ID LABEL	MICROORGANISM IDENTIFICATION	MATCH %	DATA BASE	CONFIRM TEST	LAB COMMENTS
1	10-0021	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99.58	B		
2	10-0023	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i>	99.99 99.99	B		The DNA sequences of the organisms identified cannot be differentiated using 500 base pair or the full gene sequencing method.
3	10-0024	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i>	99.99 99.99	B		The DNA sequences of the organisms identified cannot be differentiated using 500 base pair or the full gene sequencing method.
4	10-0025	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i>	99.99 99.99	B		The DNA sequences of the organisms identified cannot be differentiated using 500 base pair or the full gene sequencing method.
5	10-0026	<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i>	99.99 99.99	B		The DNA sequences of the organisms identified cannot be differentiated using 500 base pair or the full gene sequencing method.
6	09-0270	<i>Acremonium strictum</i>	100.0	F		

Nota: uma vez que o Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico deste fabricante envia vários micro-organismos para identificação. Para facilitar o controle, as amostras recebem um código sequencial à medida que são enviadas. As amostras deste estudo correspondem aos códigos 10-0023 (amostra Pro 08), 10-0024 (amostra Pro17), 10-0025 (amostra Pro30) e 10-0026 (amostra Pro55).