

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA**

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM PONTA DE CATETER
VENOSO CENTRAL POR REACÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE**

MARISTELA OLIVEIRA LARA

BELO HORIZONTE, MG

2018

Maristela Oliveira Lara

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM PONTA DE CATETER
VENOSO CENTRAL POR REACÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Saúde Pública.

Orientadora: Prof^a Dr^a Carla Jorge Machado

Belo Horizonte, MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramirez

Vice-reitora

Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor da Pós-Graduação

Prof^a. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Ado Jorio de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina

Prof. Humberto José Alves

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco

Chefe de Departamento de Medicina Preventiva e Social

Prof. Antônio Thomáz G. da Matta Machado

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA

Coordenadora

Prof^a. Eli Iola Gurgel Andrade

Subcoordenadora

Prof^a. Luana Giatti Gonçalves

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública

Prof^a. Eli Iola Gurgel Andrade-Titular

Prof. Francisco de Assis Acurcio-Suplente

Prof^a. Sandhi Maria Barreto -Titular

Prof^a. Valéria Maria de Azeredo Passos -Suplente

Prof^a. WaleskaTeixeira Caiaffa -Titular

Prof^a. Cibele Comini César -Suplente

Prof^a. Luana Giatti Gonçalves -Titular

Prof^a. Amélia Augusta de Lima Friche -Suplente

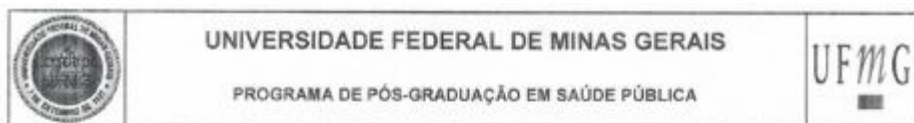
Prof^a. Mariangela Leal Cherchiglia -Titular-

Prof^a. Ada Ávila Assunção –Suplente

Daniela Pena Moreira (representante discente)

Lívia Lovato Pires de Lemos (representante discente)

FOLHA DE APROVAÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM PONTA DE CATETER VENOSO CENTRAL
POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE


MARISTELA OLIVEIRA LARA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SAÚDE PÚBLICA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em SAÚDE PÚBLICA, área de concentração SAÚDE PÚBLICA.


Aprovada em 03 de abril de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Carla Jorge Machado - Orientadora
UFMG


Prof(a). Marcelo Carneiro
Universidade Santa Cruz do Sul




Prof(a). Juliana Ladeira Garbaccio
PUC Minas


Prof(a). Julliana de Oliveira Marcatto
UFMG


Prof(a). Adriana Cristina de Oliveira
UFMG

Belo Horizonte, 3 de abril de 2018.

ATA DE DEFESA

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</p> <p>PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE PÚBLICA</p>	
---	---	---

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MARISTELA OLIVEIRA LARA

Realizou-se, no dia 03 de abril de 2018, às 08:00 horas, Sala 526 da Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM PONTA DE CATETER VENOSO CENTRAL POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE*, apresentada por MARISTELA OLIVEIRA LARA, número de registro 2014651676, graduada no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em SAÚDE PÚBLICA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carla Jorge Machado - Orientadora (UFMG), Prof(a). Marcelo Carneiro (Universidade Santa Cruz do Sul), Prof(a). Juliana Ladeira Garbaccio (PUC Minas), Prof(a). Juliana de Oliveira Marcatto (UFMG), Prof(a). Adriana Cristina de Oliveira (UFMG).

A Comissão considerou a tese:


Aprovada


Reprovada


Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 03 de abril de 2018.


Prof(a). Carla Jorge Machado (Doutora)


Prof(a). Marcelo Carneiro (Doutor)


Prof(a). Juliana Ladeira Garbaccio (Doutora)


Prof(a). Juliana de Oliveira Marcatto (Doutora)


Prof(a). Adriana Cristina de Oliveira (Doutora)

AGRADECIMENTOS

A *Prof^ª Carla Jorge Machado*, que me acolheu e confiou, dando-me segurança e tornando a trajetória mais tranquila.

Aos professores *Evanguedes Kalapothakis* e *Ronaldo Thomasini* pelos ensinamentos, disponibilidades e auxílios nos laboratórios.

A *Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais* pelo fomento neste estudo.

Aos *pacientes* e à *Santa Casa de Caridade de Diamantina* que possibilitaram a realização do estudo e crescimento científico.

As amigas e colegas de doutorado, *Danielle e Mariana*, com as quais compartilhei alegrias, tristezas, viagens e sonhos. Agradeço por incentivarem-me a cursar o Doutorado em Saúde Pública e pelo companheirismo.

A amiga e colega de trabalho, *Thabata*, pela amizade, apoio e preciosas colaborações.

Aos *meus pais e irmãos*, que sempre me apoiaram, incentivaram e colaboraram.

Ao *Cristiano*, meu esposo, pelo incentivo, auxílio e compreensão.

A *Henrique Miguel*, meu filho, meu estímulo em querer ser uma pessoa melhor e servir de exemplo para sua vida.

A *Deus*, sempre fiel, pela força e direção na minha caminhada e especialmente, por colocar todas essas pessoas maravilhosas em minha vida.

Gratidão!

RESUMO DA TESE

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são eventos adversos preocupantes em saúde pública, que se configuram como importante causa de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva. Dispositivos invasivos como o cateter venoso central (CVC) favorecem um tipo de IRAS, a infecção da corrente sanguínea. Esse evento é comumente diagnosticado por hemocultura e ou cultura da ponta do cateter, entretanto nem sempre o tempo de resposta dos exames ou os achados contribuem com o adequado tratamento. Os avanços em biotecnologia apontam ferramentas capazes de contribuir com diagnósticos de infecção. O objetivo da presente tese foi testar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como ferramenta para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em ponta de CVC de pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter, internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos de um hospital filantrópico e de ensino no interior de Minas Gerais. Foram abordados os temas extração de DNA e rastreamento molecular em CVC. Tratou-se de um estudo molecular, transversal, descritivo e exploratório. Testes laboratoriais de comparação entre métodos de extração de DNA foram realizados com cepa da bactéria *Staphylococcus aureus* para posterior aplicação em cateteres coletados de pacientes. Durante um período de seis meses, uma amostra de conveniência com trinta e quatro cateteres removidos de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos, sob suspeita de infecção da corrente sanguínea, foram submetidos à extração de DNA do material biológico contido na parede externa e no interior dos lúmens dos mesmos. Procedeu-se a identificação de bactérias por PCR utilizando um padrão de reagentes e temperaturas. Os resultados encontrados na análise por biologia molecular foram comparados com os resultados das culturas desses pacientes, realizadas pelo hospital. Houve ainda, o levantamento em prontuário de dados dos pacientes: sexo, idade, uso de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência do CVC e local de inserção do cateter; e presença de sinais flogísticos no local de inserção do dispositivo. Testes estatísticos com auxílio do programa Stata, versão 15, foram utilizados. A prevalência das bactérias no CVC por teste de PCR foi: *Staphylococcus aureus* (50%), *Enterococcus faecalis* (41,2%), *Klebsiella pneumoniae* (32,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (20,6%), *Acinetobacter baumannii* (38,2%) e *Escherichia coli* (2,9%). Todas as hemoculturas

realizadas tiveram ausência de bactérias como resultado do exame. A cultura de ponta de cateter revelou bactérias em 21 (61,8%) dispositivos, enquanto a PCR apresentou positividade em 31 (91,2%). Os patógenos mais detectados são comumente encontrados no ambiente e no microbioma humano, transmitidos aos pacientes inclusive pelas mãos dos profissionais de saúde. Estes achados são relevantes ao se programar medidas de prevenção de infecção da corrente sanguínea relacionada ao CVC. O método de extração do material genômico, o painel de primers e protocolo de amplificação deste estudo identificaram os principais bactérias comumente prevalentes nas infecções da corrente sanguínea. Desta forma, a identificação molecular de bactérias poderá auxiliar na detecção de infecção da corrente sanguínea e a tomada de decisão relativa à escolha da melhor terapia.

Palavras-chave: Infecções Relacionadas a Cateter, infecção hospitalar, cateteres, cateterismo venoso central, reação em cadeia da polimerase, DNA bacteriano.

THESIS ABSTRACT

Healthcare-associated infections (HAIs) are worrying adverse events in public health. They are an important cause of morbidity and mortality in intensive care units. Invasive devices such as the central venous catheter (CVC) favors a type of HAIs, the bloodstream infection. This event is commonly diagnosed by blood culture and/or culture of the catheter tip, however, the response time of these tests or their results not always contribute to the appropriate treatment. Advances in biotechnology provide tools capable of contributing to diagnoses of infection. The aim of the present thesis was to detect potentially pathogenic bacteria at the tip of a central venous catheter through polymerase chain reaction (PCR). Subjects were treated with DNA extraction and molecular tracing in CVC. It is a cross-sectional molecular study. Laboratory tests comparing DNA extraction methods were performed with the *Staphylococcus aureus* bacterium for subsequent application to catheters collected from patients. Over a period of 6 months, in an Adult Intensive Care Unit of a philanthropic and training hospital, (n=34) catheters were removed from patients under suspicion of bloodstream infection. All the thirty-four catheters were subjected to DNA extraction from the biological material contained in their wall and inside their lumens. The bacteria were identified by PCR using a standard set of reagents and temperatures. The results found in the analysis by molecular biology were compared with the results of the cultures of these patients, performed by the hospital. Collection of patients' data was also carried out: sex, age, use of other invasive devices, CVC insertion location and period of catheter's use; and presence of phlogistic signs in the insertion site of the device. Statistical tests were used with the help of the Stata software, version 15. The prevalence of bacteria in CVCs was: *Staphylococcus aureus* (50%), *Enterococcus faecalis* (41,2%), *Klebsiella pneumoniae* (32,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (20,6%), *Acinetobacter baumannii* (38,2%) and *Escherichia coli* (2,9%). All blood cultures performed had no bacteria as a result of the examination. Catheter-tip culture revealed microorganisms in 21 (61.8%) devices, whereas PCR showed positivity in 31 (91.2%). The most commonly detected pathogens are usually found in the environment and in the microbioma of the skin and they are possibly transmitted to patients by the hands of health professionals. These findings are relevant when programming CVC-related bloodstream infection prevention measures. The genomic material extraction method, primers panel and amplification protocol of this study identified the major pathogens prevalent in bloodstream infections. In this

way, molecular identification of bacteria may assist in the detection of bloodstream infection and decision-making regarding the choice of the best therapy.

Key Words: Catheter-related infections, cross Infection, Catheters, catheterization central venous, polymerase chain reaction, bacterial DNA.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Descrição e quantificação das cepas utilizadas para padronização e controle positivo dos testes.	31
-----------------	--	----

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	15
1.1	Infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central	16
1.2	Diagnóstico da infecção da corrente sanguínea	19
1.3	Reação em cadeia da Polimerase	20
2	OBJETIVOS	23
3	METODOLOGIA	25
3.1	Apresentação da pesquisa	26
3.2	Delineamento do estudo	26
3.3	Período e local do estudo	27
3.4	População e amostra	27
3.5	Procedimentos do estudo	28
3.5.1	Extração de DNA	29
3.5.2	PCR e eletroforese	30
3.5.3	Microrganismos molde	30
3.6	Considerações éticas	32
3.7	Colaboradores e financiamento	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Artigo 1	34
	Comparison of five methods of DNA extraction from <i>Staphylococcus aureus</i> for molecular detection by PCR	
4.2	Artigo 2	46
	Rastreamento molecular para investigação de patógenos em cateter venoso central	
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO	72
	Anexo A: Instrumento de coleta de dados	73

Anexo B: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM	74
Anexo C: Ata da qualificação	79
Anexo D: Aceite da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical	80

APRESENTAÇÃO

Este volume apresenta a tese no formato de coletânea de artigos científicos originais e está em consonância com os requisitos para a obtenção do grau de doutor em Saúde Pública do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Medicina da UFMG. Ele está organizado em cinco partes. A primeira trata das considerações iniciais e apresenta o arcabouço teórico que fundamentou a investigação realizada. A segunda e a terceira apresentam, respectivamente, os objetivos e o detalhamento dos métodos da abordagem. Em seguida, a quarta parte apresenta os resultados compilados em dois artigos: 1) “Comparison of five methods of extraction *Staphylococcus aureus* DNA for molecular detection by PCR”, que aborda métodos convencionais de extração de DNA testados com uma bactéria; e 2) “Rastreamento molecular para investigação de infecções relacionadas ao cateter venoso central”, que investiga bactérias em pontas de cateteres venosos centrais removidos de pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter. Por fim, a quinta parte traz as considerações finais, apresentado os limites, as vantagens e as recomendações do estudo.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 – Infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são as mais incidentes e relevantes complicações ocorridas em pessoas hospitalizadas. Configura-se como importante causa de morbidade e mortalidade em unidades de terapia intensiva¹. Em parte, a causa das IRAS é explicada pelo alto número de procedimentos invasivos, uso de antimicrobianos e o próprio ambiente que favorece a seleção natural dos microrganismos². No Brasil, estima-se que de 5% a 15% das pessoas internadas contraem alguma IRAS, a qual acresce, em média, cinco a dez dias o período de internação e eleva os gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos^{3, 4}. Há associação das IRAS e o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos, aumento de custo, permanência hospitalar e morbimortalidade^{5, 6}.

Dentre os tipos de IRAS, destaca-se a infecção da corrente sanguínea relacionada ao uso do cateter venoso central (CVC)^{7, 8}, representando uma incidência considerável nas unidades de terapia intensiva^{9, 10}. Esse tipo de infecção representa 10 a 20% das IRAS^{9, 11} e apresentam maior mortalidade^{12, 13}, variando de 12% a 25% dos casos e ainda, com altos custos ao sistema de saúde^{4, 14, 15}. A mortalidade é particularmente maior quando utilizada inadequada terapia antimicrobiana nas primeiras 24 horas e nos casos de infecções causadas por bactérias gram negativas¹⁶. Os gastos diários com medicamentos e materiais com paciente em terapia intensiva com infecção de corrente sanguínea associada a CVC é em média de R\$666,47⁴.

As infecções de acesso vascular ocorrem em menor número quando comparadas às de outros sítios, como pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção urinária e de ferida operatória, entretanto, elas apresentam maior morbidade e mortalidade¹⁷.

O CVC constitui acesso intravascular utilizado por adultos para monitoramento hemodinâmico, realização de hemodiálise, nutrição parenteral, administração de hemoderivados e medicamentos¹¹. Os fatores que favorecem a infecção na corrente sanguínea são: alteração do estado imunológico, extremos de idade, preexistência de comorbidades, gravidade da doença, má nutrição, colonização da pele por microrganismos, tempo de permanência do cateter, tipo de cateter, dificuldade de inserção, local de internação e colonização microbiana do conector¹¹. Outro problema

é a aderência de microrganismos nos biomateriais formando biofilme^{7, 18, 19}. Uma variedade diversificada de patógenos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, é capaz de produzir biofilmes em dispositivos internos¹⁵.

Os biofilmes aderem às superfícies dos dispositivos e protegem suas populações bacterianas encapsulando os microrganismos em uma matriz extracelular complexa. Há uma proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro e medicamentos antibacterianos. Essa organização facilita o crescimento celular e comunicação entre diferentes bactérias, incluindo transferência de elementos genéticos que conferem resistência antimicrobiana¹⁵. Após a adesão e estruturação do biofilme, as células se agregam em múltiplas camadas. Posteriormente, já com o biofilme maduro, ocorre o descolamento de células em um estado planctônico para iniciar um novo ciclo de formação em outro lugar¹⁸.

A infecção da corrente sanguínea se dá pela colonização extraluminal do cateter e ou colonização da via intraluminal. Na primeira, as bactérias presentes na pele do paciente, no local de inserção do cateter ou nas conexões do dispositivo, alcançam a corrente sanguínea formam biofilmes na face externa do dispositivo. Durante as frequentes manipulações do conector, há o favorecimento da contaminação da via interna do CVC ou ainda, por infusão de soluções contaminadas e disseminação hematogênica^{20, 21}.

Um dos patógenos mais relevantes e responsáveis pelas infecções de corrente sanguínea é o *Staphylococcus aureus*^{7, 11, 22, 23, 24, 25}, detectado entre 20% a 25% dos casos^{11, 26, 27}. Essa bactéria coloniza a pele e mucosa de forma permanente ou intermitente, possui alto poder de patogenicidade e é responsável por várias enfermidades²². Ela passa pelos processos de seleção de resistência a antimicrobianos e tem capacidade de produzir enterotoxinas²⁸, além da grande habilidade em formar biofilme¹⁹.

Outros microrganismos mais comumente encontrados nas infecções da corrente sanguínea são: *Staphylococcus coagulase negativa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*^{1, 5, 11, 13, 17, 27, 29}. As infecções vasculares podem desencadear celulite periorifical, celulite peribolsa do cateter implantável, infecção do túnel subcutâneo,

infecção do segmento intravascular, tromboflebite séptica, septicemia e infecções metastáticas¹⁷. As infecções da corrente sanguínea por bactérias gram-negativas resistentes podem ter mortalidade entre 80% e 85%⁶. No Brasil, isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de *Acinetobacter spp* são responsáveis, respectivamente, pelo terceiro e o quarto lugar entre as principais causadoras de infecção da corrente sanguínea e com alto percentual de resistentes aos carbapenêmicos²⁰.

Pacientes em terapia intensiva tem frequentes manipulações ao CVC por dia com fins assistenciais da equipe de saúde, o que aumenta o risco de contaminação e subsequente infecção³⁰. A adequada higienização das mãos antes da inserção ou manipulação do CVC, uso de clorexidina alcoólica para antisepsia e barreira máxima estéril de proteção durante a inserção; seleção da veia subclávia, descontaminação dos conectores, uso de sistema fechado de infusão e revisão diária da necessidade de manutenção do cateter são as medidas preventivas de impacto contra a infecção na corrente sanguínea^{7, 29}. A implementação de estratégias de bundles de inserção e manutenção tem impacto positivo na diminuição das infecções relacionadas ao CVC em pacientes críticos e não críticos³¹.

Para evitar as complicações decorrentes da inserção e manutenção de cateter vascular é necessário que os profissionais de saúde possuam capacitação técnico-científica quanto às melhores práticas no cuidado com o acesso vascular e trabalhem de forma sincronizada e consistente com o objetivo de garantir uma assistência segura aos pacientes²⁰.

Nos Estados Unidos, ocorrem 80.000 casos anualmente de infecções da corrente sanguínea associada ao uso de CVC^{7, 14, 24}. Entre os hospitais participantes do National Healthcare Safety Network (NHSN), a taxa de infecção de corrente sanguínea relacionada com cateter variou de 1,3 a 1,5/1.000 cateteres-dia¹¹. Dados atuais apontam a taxa de infecção de 5,1/1.000 cateteres/dia no Brasil¹². O risco de infecção relacionada a um acesso central é 64 vezes maior que de um acesso periférico³².

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou a notificação de 18.370 infecções primárias da corrente sanguínea associadas ao CVC provenientes de Unidades de Terapia Intensiva. Tal infecção é uma das prioridades da área de ações da OMS para redução de eventos adversos proveniente de CVC^{20, 33}.

1.2 – Diagnóstico da infecção da corrente sanguínea

A infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter, denominada catheter-related bloodstream infection - CRBSI pela NHSN é definida a partir da confirmação de testes laboratoriais específicos que identificam o cateter como fonte da infecção. Nesse tipo de evento adverso, o microrganismo detectado no sangue também está presente na ponta do cateter^{7, 8}. O diagnóstico dar-se por uma cultura semi-quantitativa positiva da ponta do cateter (>15 UFC) e pelo menos uma cultura sanguínea positiva obtida de uma veia periférica. O mesmo microrganismo (espécie e susceptibilidade antimicrobiana) deve ser isolado nas culturas. Pode dar-se também por método conservador do cateter, ou seja, sem remoção deste, sendo o tempo diferencial de crescimento entre cultura de sangue do CVC versus cultura do sangue periférico (mais de 2 horas) ou diferença de quantitativo de crescimento entre essas culturas^{7, 14}. Quando a cultura de sangue obtida a partir do cateter é positiva, mas a amostra de sangue periférica é negativa, indica colonização do cateter em vez de CRBSI³².

Outra definição existente é a infecção da corrente sanguínea associada ao CVC, também conhecida como Central line Associated Bloodstream infection (CLABSI). Uma CLABSI é uma infecção da corrente sanguínea primária em um paciente que tinha uma CVC dentro do período de 48 horas antes do desenvolvimento da infecção e não relacionado a uma infecção em outro sítio⁷. Nesse caso, a confirmação do diagnóstico ocorre por uma ou mais hemoculturas positivas como presença de patógeno não relacionado a outro foco^{7, 20, 34}. Ambas definições correspondem ao mesmo evento adverso, diferenciam apenas tecnicamente quanto aos testes de confirmação.

A metodologia da cultura semiquantitativa de ponta de cateter associada à hemocultura qualitativa periférica é muito utilizada para avaliar CRBSI³². A cultura da ponta de cateter é um procedimento realizado pela técnica de Maki,³⁵ onde só se avalia a parte externa do cateter, sem avaliação da via intraluminal que frequentemente está colonizada. A sensibilidade varia de 45 a 84% e a especificidade é em torno de 85%³².

Um estudo destacou o diagnóstico por hemocultura pela análise da diferença de tempo de positividade de amostras em relação a coleta simultânea de sangue de cateter e sangue periférico em um intervalo máximo de 15 minutos (amostras pareadas) e do volume coletado, que deve ser igual em ambas amostras, bem como haver homologia de microrganismos isolados¹¹. Outro estudo comparou os dois critérios de diagnóstico de

infecção relacionada ao cateter (método com cultura da ponta de cateter e método de análise de diferença de crescimento de hemoculturas), não identificou diferenças significativas em relação à mortalidade dos pacientes¹⁴.

Vale destacar que a hemocultura é o padrão ouro para diagnóstico de infecção, porém possui baixa sensibilidade (83 a 91%)¹⁴, principalmente quando o volume de sangue coletado for inferior ao recomendado (20ml). Além disso, os resultados não ficam disponíveis em tempo menor do que 48 a 72 horas para resultados positivos e até 5 dias para resultados negativos³⁶. As vantagens deste método são a simplicidade, relação moderado custo³⁶ e o fato de constituir uma importante ferramenta epidemiológica de base para a antibioticoterapia, pois a partir dela é feito o antibiograma²⁵. Entretanto, seu valor como diagnóstico geral para o clínico é limitado devido à demora nos resultados, baixa sensibilidade e o uso de antibióticos no paciente antes do exame. Se por um lado, um resultado de cultura positivo confirma o diagnóstico de infecção, de outro, um resultado negativo não transmite o mesmo grau de segurança^{25,37}.

A importância clínica de infecções relacionadas ao acesso vascular tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas, no sentido de identificar e controlar a sua ocorrência^{37, 38}. Os métodos de cultivo de sangue têm modernizado, mas ainda são dependentes do crescimento dos microrganismos. Métodos moleculares têm sido utilizados para auxiliar o diagnóstico e terapêutica de infecções^{36, 37}, tendo demonstrado resultados rápidos com sensibilidade e especificidade satisfatória, sem depender da vitalidade do microrganismo³⁶.

1.3 - Reação em cadeia da polimerase

Tecnologias moleculares podem identificar até pequenas quantidades de DNA bacteriano e possuem grande sensibilidade e especificidade (em torno de 99%)²⁵ na detecção de muitos agentes relacionados à infecção, podendo ser úteis juntamente com diagnósticos microbiológicos tradicionais³⁸. Uma das tecnologias é a reação em cadeia da polimerase (PCR) que consiste na amplificação do DNA de interesse a partir de uma região genotípica usando específicas moléculas de primers³⁹.

Antes da identificação do DNA é necessário proceder sua extração de forma eficiente. O método de extração deve garantir lise celular, nível ideal de pureza e alta qualidade do DNA para evitar inibição da PCR³⁶.

Nessa etapa, vale ressaltar a particularidade da parede celular do *Staphylococcus aureus*, que possui uma camada grossa de peptidoglicano, responsável por sua rigidez, que dificulta a lise celular e a eficácia dos protocolos convencionais de extração do DNA⁴⁰. É importante notar que, embora um determinado método de extração possa funcionar bem para um microorganismo, pode não ser tão eficaz para outros⁴⁰.

As técnicas de PCR consistem em método rápido, sensível e muito específico aos agentes para os quais foram desenhados, desde que se tenha material genômico para a identificação e uma reação adequada⁴¹. Estudos tem identificado uma vantagem na utilização da técnica de biologia molecular ao apresentar uma sensibilidade maior que as técnicas de cultura de material biológico³⁸. O custo com a técnica de PCR é maior que a hemocultura ou cultura de ponta de cateter, entretanto a detecção rápida de patógenos oferece subsídio na prescrição de antimicrobianos influenciando a tomada de decisão clínica⁴². Assim, os custos com permanência hospitalar e medicação podem reduzir e consequentemente apresentar custo benefício favorável^{42, 43}.

Análises em biotecnologia, como a PCR, vem sendo avaliada para constituir uma ferramenta que pode ser facilmente incorporada em hospitais na avaliação de infecção relacionada à assistência com vistas a reduzir a antibioticoterapia empírica, complicações do paciente provenientes de um quadro infeccioso e permanência hospitalar⁴⁴.

A utilização da técnica de amplificação do DNA por meio da PCR tem enormes perspectivas na detecção de agentes infecciosos e apresentam alto poder discriminatório, entretanto são escassos os estudos que investigam a infecção em pacientes adultos hospitalizados em unidades de terapia intensiva¹⁰, principalmente quando o material a ser analisado está no lúmen de um dispositivo, ao invés do sangue, por exemplo. Apesar dos vários trabalhos que tratam da detecção de microrganismos por PCR^{13, 16, 36, 44, 45} são exíguos estudos que tratam da investigação em CVC.

A presente tese teve como hipótese que a PCR na detecção de microrganismos patogênicos melhora a compreensão da variedade microbiológica presente no CVC e ajuda a desenvolver novos métodos para a identificação da infecção da corrente

sanguínea. A deficiência de estudos, em âmbito regional, das infecções relacionadas ao cateter e a utilização da biologia molecular para apoio diagnóstico destas bactérias estimulou o desenvolvimento da pesquisa para conhecimento e divulgação dos resultados obtidos.

A idealização da pesquisa se deu ao acompanhar na prática de ensino de Enfermagem casos de suspeita de infecção relacionada ao uso do cateter e subsequentes resultados microbiológicos negativos. O serviço de Controle de Infecção Hospitalar da instituição de saúde tem baixa taxa de infecções, que pode ser por subnotificações justificadas por resultados negativos nos exames de cultura.

A estratégia adotada foi buscar novas ferramentas que pudessem apontar possibilidades de rastreio da infecção e que inclusive revelasse o perfil microbiológico presente nos cateteres.

Dada a possibilidade de uso da tecnologia molecular em pesquisa e a parceria com universidades, foi selecionado o método de PCR para teste nos cateteres dos pacientes com suspeita de infecção vascular ou infecção da corrente sanguínea.

A infecção relacionada à assistência à saúde é um importante agravo de saúde pública e esforços no sistema de saúde para prevenção, controle, diagnóstico eficiente e tratamento adequado são medidas a serem sempre adotadas²⁰.

Pelas razões expostas, torna-se relevante o estudo sobre a detecção de patógenos em ponta de CVC por PCR para conhecer e avaliar os achados por meio dessa ferramenta. E a partir dos achados, repensar as práticas de diagnóstico e mais além; possibilitar aos gestores hospitalares conhecerem as características das IRAS, em especial a infecção da corrente sanguínea relacionada ao CVC da instituição. Ademais, fortalece a educação em saúde quanto às medidas de prevenção à infecção.

Essa abordagem se apoia na perspectiva da saúde pública quando trata de um problema relevante, infecção relacionada à assistência à saúde e com elevado impacto em morbimortalidade. A ANVISA preconiza a notificação de indicadores: magnitude do problema nos estabelecimentos de saúde do país; perfil epidemiológico das infecções relacionadas à assistência; vigilância e resposta às ocorrências infecciosas em UTI, especialmente, aquelas de corrente sanguínea³³.

OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

Geral

Testar a técnica de PCR como ferramenta para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em ponta de CVC de pacientes com suspeita de infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter, internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos de um hospital filantrópico e de ensino no interior de Minas Gerais.

Específicos

- Comparar cinco métodos de extração de DNA de *Staphylococcus aureus* para detecção por PCR (ARTIGO 1).
- Detectar as bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, por PCR, de material extraído da ponta de cateteres centrais de pacientes com suspeita de infecção (ARTIGO 2).
- Comparar os resultados das análises das culturas de ponta de CVC e hemoculturas realizadas pelo hospital dos pacientes em relação à PCR da ponta de cateter (ARTIGO 2).
- Caracterizar a população estudada quanto ao sexo, idade, uso de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência do CVC e local de inserção do cateter, sinais flogísticos presentes em sítio de inserção (ARTIGO 2).

METODOLOGIA

3- METODOLOGIA

3.1- Apresentação da pesquisa

A pesquisa concretizou-se utilizando três etapas metodológicas. A primeira consistiu em definir uma técnica para extrair de forma eficiente o DNA do material biológico residual dos cateteres venosos centrais após remoção desses nos pacientes. Nessa etapa utilizou-se cepas clínicas de cada microrganismo para teste e para amostra de controle positivo das reações. O *Staphylococcus aureus* apresentou-se como o mais difícil de lise bacteriana e extração de material genético por motivos já elucidados. Para contornar este impasse, protocolos convencionais de laboratório de biotecnologia foram testados e comparados, gerando vários testes e análises junto à literatura (Artigo 1). Dando seguimento a pesquisa, os protocolos testados foram aplicados a outras bactérias (gram positivas e gram negativas) e fungos com o objetivo de verificar seu emprego em diferentes espécies de patógenos. Após padronização do método adequado de extração de DNA a ser utilizado, passou-se para a próxima etapa.

A segunda etapa trabalhou com padronização da PCR para todos os microrganismos investigados neste estudo. Esse cuidado foi importante, considerando que num rastreamento de infecção não se sabe a priori qual bactéria irá ser detectada. O ideal é que embora haja um primer para cada microrganismo investigado, possa ocorrer uma única reação com vários microtubos da mesma amostra para diferentes alvos. Assim, a quantidade de reagentes em cada teste foi a mesma, bem como as temperaturas em cada fase da amplificação do DNA. Essa padronização otimiza tempo num exame de apoio diagnóstico e facilita a operacionalização do teste. Devido à dificuldade de padronização encontrada entre bactérias e fungos, excluímos o rastreamento de *Candida albicans* desta pesquisa.

Na terceira etapa, procedeu-se a extração de DNA dos cateteres removidos dos pacientes, sua quantificação e a PCR convencional. A partir dos resultados ocorreu a análise dos mesmos (Artigo 2).

3.2 - Delineamento do estudo

Estudo molecular, transversal, descritivo e exploratório.

3.3 - Período e local do estudo

A coleta de dados ocorreu de julho a dezembro de 2015, na Unidade de Terapia Intensiva de adultos de um hospital filantrópico e de ensino de Minas Gerais com 20 leitos. O hospital é referência para uma macrorregião de saúde do estado com 23 municípios e população superior a 290.000 habitantes, referência em neurologia e trauma, maioria do atendimento via SUS⁴⁶. No período do estudo, a taxa de utilização de CVC foi de 34%, sendo 4318 pacientes-dia e 1468 cateteres-dia; e não houve infecção da corrente sanguínea com comprovação microbiológica (hemoculturas e culturas de ponta de cateter). Os diagnósticos de internação foram variados: doenças cardíacas, pneumonia, edema agudo de pulmão, trauma cranioencefálico, doenças endócrinas, hemorragias subaracnóideas, acidente vascular encefálico e outros.

3.4 - População e amostra

A população elegível para a pesquisa foram pacientes sob suspeita de infecção de foco vascular ou da corrente sanguínea relacionada ao uso do CVC e que estavam internados na Unidade de Terapia Intensiva por no mínimo 72 horas. Os CVC foram removidos após indicação médica de acordo com protocolo da instituição, pelo enfermeiro da unidade. Depois da retirada, foi cortado cinco centímetros da ponta do cateter e colocado em um recipiente de vidro estéril com tampa, disponibilizado para a equipe do CTI, sem nenhuma solução conservante. Outros cinco centímetros subsequentes foram disponibilizados em recipiente específico para análise por cultura de ponta de cateter realizada pelo laboratório conveniado do hospital. Durante o período estabelecido, seis meses, 34 cateteres foram recolhidos, constituindo amostra de conveniência.

Os critérios de inclusão foram estar em uso do CVC há pelo menos 72 horas, sob suspeita de infecção da corrente sanguínea e aceitar participar da pesquisa. Foram considerados como critérios de exclusão: pacientes que não estavam em uso de CVC, os pacientes em uso de cateter sem suspeita de infecção da corrente sanguínea e os pacientes ou responsáveis que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Não houve perdas durante o recrutamento da amostra.

O instrumento de coleta de dados foi construído pela pesquisadora de acordo com os parâmetros que foram julgados necessários para pesquisa. A ficha de dados foi composta pelas seguintes variáveis: sexo, idade, presença de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência do CVC e seu local de inserção, sinais flogísticos presentes no sítio do cateter, resultado de cultura e hemocultura. Os instrumentos foram codificados para evitar a identificação dos indivíduos.

Em relação ao teste de hemocultura a coleta da amostra, processamento e análise do material (sangue) também foi realizada pelo hospital, seguindo sua rotina de exames laboratoriais e equipe própria, sob solicitação médica. Ressalta-se que esse procedimento faz parte do protocolo assistencial em casos suspeitos de infecção da corrente sanguínea.

3.5 - Procedimentos do estudo

Os cateteres foram acondicionados em frascos de vidro estéreis e levados para o Centro Integrado de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), no laboratório Labimuno. Cada cateter foi manipulado dentro de uma capela de fluxo laminar para extração do material contido em suas paredes internas e externas. Por meio de pipeta, instilou-se em torno de 150µL solução de lise de bactéria, um tampão (TrisHCl) com quelante de Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺ e glicose. Esse volume foi instilado várias vezes sobre o cateter e com auxílio de pinça e bisturi estéreis, abriram-se seus lúmens para facilitar a remoção de debris, secreções incrustadas, pequenos coágulos. O vidro recipiente foi o captador do líquido utilizado nessa lavagem e ao final, esse conteúdo foi transferido para um microtubo e armazenado a -20° C até a fase de extração do DNA.

Os testes com protocolos de extração de DNA ocorreram no laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Já os testes posteriores ocorridos com as amostras dos pacientes ocorreram no laboratório de Bioprocessos do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), devido a proximidade com o local de coleta. Ambos processados pela pesquisadora.

3.5.1 - Extração de DNA

A padronização da extração de DNA preconizou reagentes de fácil disponibilidade, baixo custo, amplo espectro (diferentes bactérias e fungos) e agilidade do processo. Esses critérios tornam sua aplicabilidade em contextos práticos de investigação viáveis. Considerando a variedade de microrganismos, há diferentes métodos de extração de DNA para diferentes estruturas e composições de paredes celulares⁴⁷. O fato de extrair o DNA a partir da lavagem do cateter diminui a concentração de DNA de células humanas. A presença de células humanas normalmente, compromete a reação quando o método de extração é de amplo espectro³⁶.

Os kits comerciais para a extração de DNA, geralmente possuem uma lise enzimática, sílica ou um tampão de lavagem que evita a retenção de proteína ou outros contaminantes. No entanto, neste estudo, optou-se por utilizar métodos convencionais, pois apresentam também resultados satisfatórios na obtenção do DNA. Ademais, um estudo que avaliou dez tipos de kits de extração identificou que possuem limitações inclusive quanto ao rendimento de DNA extraído³⁶.

Após avaliar cinco protocolos para *Staphylococcus aureus* a partir dos resultados encontrados, ajustou-se um protocolo que atendesse a todas as espécies alvos e procedeu-se a extração das amostras dos pacientes.

O DNA genômico foi extraído a partir do material recolhido do lavado de sedimentos e secreções encontradas nos cateteres. As células lisadas ficaram em banho-maria a 56° C em overnight, depois seguiu-se a purificação por fenol/clorofórmio. Esse protocolo foi descrito anteriormente⁴⁸, mas para extração do material coletado dos cateteres foi realizado adaptações: não adicionado proteinase K e mantido em banho-maria⁴⁹. Ele empregado para diferentes tecidos animais, cultura de células e sangue humano, além da boa disponibilidade dos materiais e facilidade na preparação^{48, 49}. Após a precipitação, o DNA foi ressuspensão em 50 ul de TE (10 mM Tris - HCl pH 8,0 e EDTA 1 mM) .

3.5.2 - PCR e eletroforese

A partir do material genômico extraído foi possível realizar a multiplicação da fita de DNA na PCR convencional utilizando para isso, os iniciadores específicos (primers) para cada microrganismo, nucleotídeos isolados (DNTPs), água, tampão, $MgCl_2$ e enzima DNA polimerase em equipamento convencional. Os primers são fitas de DNA, com mais ou menos 20 bases (A, T, C, G) complementares, isto é, se ligam por complementaridade ao início da sequência de DNA que se quer multiplicar.

O microtubo com a amostra de DNA e mistura de reagentes é colocado em uma máquina de PCR, termociclador, que eleva e diminui a temperatura a cada etapa do processo de amplificação. Primeiro a dupla fita de DNA se separa por desnaturação em torno de $95^\circ C$ por 1 minuto, formando duas fitas diferentes, mas complementares entre si. Os passos seguintes: anelação, que corresponde à junção do primer na fita de DNA separada; e extensão, por meio da enzima DNA polimerase Taq, termoresistente, que estende a nova fita fixando as bases nucleotídeas (DNTPs).

Ocorrendo a amplificação das moléculas de DNA, faz-se seu reconhecimento pela técnica de eletroforese em gel de agarose. A agarose é um polissacarídeo (ágar e pectina) que dissolve em água fervente e então gelifica quando esfria. Para realizar uma eletroforese, o gel de agarose com brometo de etídeo foi preparado, e o produto da PCR foi aplicado em pequenos poços do gel. O gel fica em uma cuba, submerso em líquido tampão Tris-Acetato-EDTA 1X e submetido a uma corrente elétrica (100V). Como o DNA é negativamente carregado, ele é atraído pelo eletrodo positivo, migrando através do gel de agarose. Os fragmentos de DNA corados com brometo de etídeo, fluorescem vivamente em contato com a luz ultravioleta. Os fragmentos são separados de acordo com o tamanho (pares de bases nucleotídeas), os fragmentos mais leves e menores migram na frente. Dessa forma pode-se localizar as bandas que correspondem ao DNA.

3.5.3 - Microrganismos molde

Cepas clínicas de referência de cada microrganismo foram adquiridas através Newprov Ltda (Paraná, Brasil) e cultivadas em laboratório com o meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI), mantido em *shaker* incubadora (New Brunswick Scientific, C25KC, USA) a $37^\circ C$, *overnight*. Alíquotas de $1000\mu L$ do cultivo, foram centrifugadas

a 10.000 rpm por 3 minutos e os precipitados (pellet), congelados a -20°C para execução dos protocolos testados e para controle positivo dos testes das amostras. Foram ainda realizadas diluições seriadas da cepa estudada para crescimento e quantificação celular da amostra inicial em 1 milhão de células em 1000 microlitros de volume para extração (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Descrição e quantificação das cepas utilizadas para padronização e controle positivo dos testes.

Nome	Especificação	Quantificação (10 ⁶ células)
<i>Staphylococcus aureus</i>	NEW 0038 (1250) - NEWPROV - Similar ao ATCC 25923 - Controle industrial	6,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	NEWP 0012 (1221) - NEWPROV - Similar ao ATCC 29212 - Controle clínico	6,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEWP 0083 (1233) - NEWPROV - Similar ao ATCC 13883 - Controle clínico	3,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NEW 0027 (1242) - NEWPROV - Similar ao ATCC 9027 Controle industrial	19,9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCCD A001 – Cefar – Similar ao ATCC 19606 Controle clínico	8,9
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229	2,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	NEWP 0047 (1216) - NEWPROV - Similar ao ATCC 13047 - Controle clínico	4,3

3.6 - Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - CAAE - 43533115.3.0000.5108, Parecer 1.092.481 (ANEXO A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelo paciente ou responsável.

3.7 – Colaboradores e financiamento

O suporte de material permanente foi do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares e do Departamento de Farmácia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) – Laboratório Bioprocessos.

Este estudo contou com o apoio financeiro para material de consumo da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, Edital 01/2015 - Demanda Universal, APQ-01862-15.

RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1- Artigo 1 (Aceito para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – Anexo C)

Comparison of five methods of extraction *Staphylococcus aureus* DNA for molecular detection by PCR

Comparação de cinco métodos de extração de DNA de *Staphylococcus aureus* para detecção molecular por PCR

Abstract

Introduction: Molecular techniques for the detection of pathogens have been shown to be a readily diagnostic tool with a high level of sensitivity and short turnaround times. **Methods:** This study compared five *Staphylococcus aureus* DNA extraction methods for detection by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** The concentration and purity of extracted DNA showed that the methods did not yield significant quality DNA. However, most protocols yielded positivity of 100%, even with low concentrations of DNA. **Conclusions:** Although one of the protocols seems more efficient than others, PCR was sensitive enough to allow detection of *S. aureus* in all other protocols.

Keywords: polymerase chain reaction, bacteria DNA, DNA extraction, nosocomial infection.

The healthcare-associated infections present an overall rate prevalence of 34,5% in patients in intensive care units in USA ¹. This is sector at a higher rate of healthcare-related infections. Most infections are associated with the use of invasive devices (catheters, bladder catheterization, mechanical ventilation, surgeries, and implants)². Among the most common pathogens that cause these infections, within intensive care units, reported by the World Health Organization is the *Staphylococcus aureus*, represents more than 20% of isolates².

In most cases, this pathogen is detected using microbiological cultures of samples taken from body fluids or from therapeutic devices³. However, this method is not entirely satisfactory since it is associated with ambiguous results³. This study compared five *S. aureus* DNA extraction methods for detection by polymerase chain reaction (PCR).

Strains of *S. aureus* ATCC 25923 were provided by Newprov Ltda (Paraná, Brazil). The strains were cultivated in the laboratory using Brain Heart Infusion medium kept in a shaker incubator (New Brunswick Scientific, USA) overnight at 37°C. Aliquots of 1,000µL of the culture were centrifuged at 10,000rpm for 3 minutes and the pellets were frozen at -20°C.

The five conventional DNA extraction protocols ⁴⁻⁷ compared with this study were selected because they are low cost, and easy to use. For each method tested, DNA was extracted in triplicate from independent samples of strands of the strain.

Protocol 1 – this method used a bacterial lysis buffer (Tris-HCl) with Mg²⁺ and Ca²⁺ cations and glucose, and solution II containing a mixture of sodium hydroxide and sodium dodecyl sulfate (SDS), followed by purification with Phenol: Chloroform. This protocol has been previously described⁴. However, the following adaptation was made for this work: the proteinase K was not added and the sample was freeze-thawed on dry ice and in a 70°C water bath ten times, before of the purification with phenol and chloroform. Advantages of this method are the ready availability of and its ease of preparation⁴.

Protocol 2 – this method used the Kit GTS™ (Phoneutria) in accordance with the manufacturer’s instructions and subdivided into extraction “2a” and “2b”: in “a” 20µL Lifton buffer (0.2M sucrose, 0.05M EDTA, 0.1M Tris, 0.5% SDS) and 1.2µL of Proteinase K (10mg/ml) were added to the pellet and the mixture was then incubated at 60°C for at least 90 minutes (or overnight) to test the effect of the use of these reagents prior to using the kit; while in “b”, extraction was performed using the Kit GTS. This method does not use phenol: chloroform.

Protocol 3 – this method used cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and it was described by the literature⁵. It used proteinase K (20mg/ml), 10% CTAB, and RNase (10mg/ml) to enhance DNA yield, followed by purification with phenol, chloroform, and isoamyl alcohol, 25:24:1.

Protocol 4 – the pellet was diluted using phosphate buffered saline (PBS) pH7.2 (137mM NaCl; 2.7mM KCl; 4.3mM Na₂HPO₄; 1.4mM KH₂PO₄), followed by purification with phenol: chloroform (1:1)⁶.

Protocol 5 – the pellet was diluted using a NET buffer (50mM NaCl; 125mM EDTA; 50mM Tris-HCl) and the addition of an adenaturing solution made up of NaOH 2.6N and 24% SDS in accordance with the protocol described by a previous study⁷.

DNA concentration was measured using the Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies, USA). The absorbance at 260 nm and 280 nm was used to assess the quality and purity of the extracted DNA using a spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000C, USA). High values for both ratios (260/280 > 1.8, 260/230 > 2) are commonly accepted as a good indicator of pure DNA⁸. In contrast, a ratio of less than 1.8 is indicative of protein contamination, while a ratio greater than 2.0 indicates

contamination with RNA⁶. A low 260/230 ratio may indicate the presence of organic compounds such as phenolates, thiocyanates, carbohydrates, or salts in the extract⁸.

Qualitative polymerase chain reaction (PCR) was standardized using a total volume of 25 μ L containing 8.5 μ L of ultrapure water, 12.5 μ L of pre-mix (buffer IC, Taq DNA, and NTPs), 1 μ L of each primer, and 2 μ L of DNA mold. The forward and reverse sequences of the 16S rRNA gene (5'GACGGTCTTGCTGTCACCTTA3' and 5'AGTTCCAGTGTGGCCGATCA3', respectively) were used as primers to detect the amplified material (access GenBankPr016589760). The size of the amplified product is approximately 119bp. The reactions were conducted in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti ® Thermal Cycler, USA) using the following procedure: initial denaturation for 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles (30s at 94°C, 30s at 52°C, and 30s at 72°C), and final extension (10 minutes at 72°C).The amplified fragments were then analyzed by electrophoresis using 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL).

Tests were performed to determine the limit of detection of PCR using serial dilutions of genomic DNA extracted from 10³ CFU/ml aliquots of culture plated on BHI agar plates to reproduce the minimum detectable level of CFUs⁹. In order to determine the sensitivity of the primer to lower concentrations of DNA extracted from 10³ CFU/ml, serial dilutions were prepared and PCR testing was performed on the titrations using the same bacterial detection parameters.

The initial number of bacteria cells used for extraction in the 100 μ L culture solution was 4.7 x 10⁷ CFU for all Protocols.

The DNA extraction process of conventional protocols can be time-consuming, especially given the freeze-thawing cycles and multiple centrifugations lasting for an

average of 10 minutes. The average run-time spent for each protocol ranged 2.5 hours (protocol 2b) to 16.5 hours (protocol 2a).

The concentration and purity of the extracted DNA reveal that the extraction methods did not obtain significant amounts of DNA. **Table 1** shows the average concentration of three independent extractions with their respective standard deviations of absorbance. Only protocol 5 achieved values the ideal purity threshold.

Table 1. Concentration and purity of DNA extracted from *S. aureus* (10^7 CFU/ml).

Extraction protocols	Average concentration of DNA	SD	Purity* 260/280	Purity* 260/230
Protocol 1	3.02 ng/μL	2.54	1.34 - 2.09	0.95 - 2.97
Protocol 2a	4.54 ng/μL	2.14	1.28 - 1.79	0.10 - 0.34
Protocol 2b	2.43 ng/μL	0.18	0.80 - 1.71	0.16 - 0.26
Protocol 3	13.10 ng/μL	9.16	1.42 - 2.14	1.79 - 4.35
Protocol 4	1.36 ng/μL	2.19	0.08 - 1.35	0.01 - 1.09
Protocol 5	40.78 ng/μL	7.97	1.81 - 1.86	1.74 - 3.80

SD: standard deviation

* Minimum and maximum values obtained by the tests

One PCR was performed for each repeating group (A, B, and C for each of the protocols). All protocols yielded positivity rates of 100%, apart from Protocol 4 and Protocol 2b, where the rate was 33.3% and 66.6%, respectively (**Fig.1**)

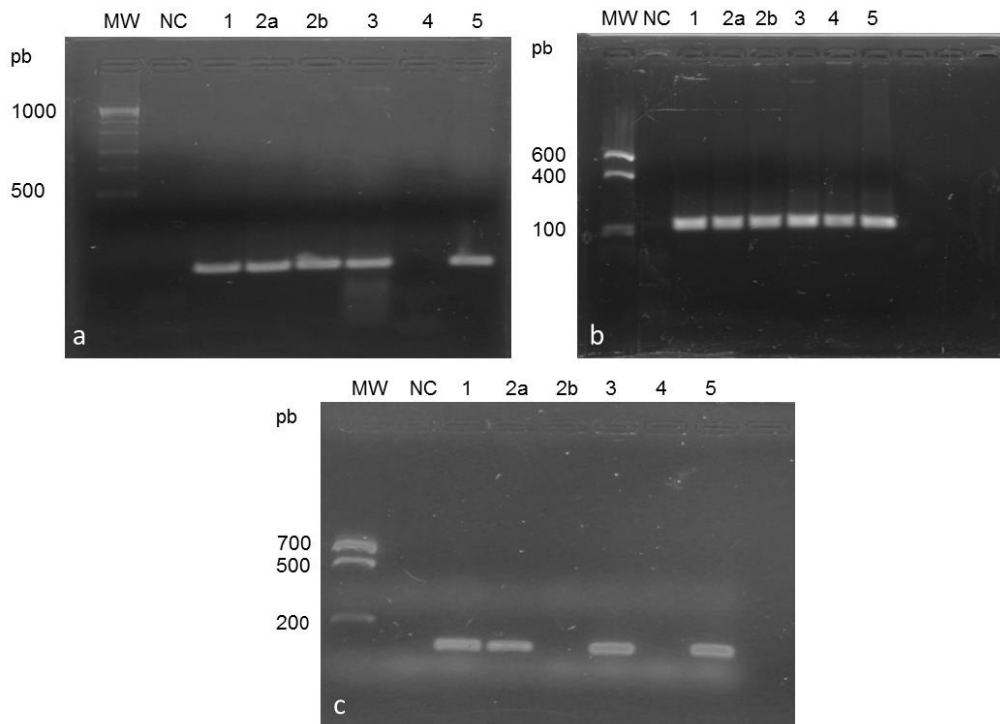


Fig. 1 Amplification for each of the protocols in samples at a concentration of 10^7 CFU/ml for each repeating group. **a:** MW, molecular weight marker 1000; NC, negative control; 1, protocol 1; 2a, protocol 2a; 2b, protocol 2b; 3, protocol 3; 4, protocol 4; 5, protocol 5. **b:** MW, molecular weight marker 641; NC, negative control; 1, protocol 1; 2a, protocol 2a; 2b, protocol 2b; 3, protocol 3; 4, protocol 4; 5, protocol 5. **c:** MW, molecular weight marker 752; NC, negative control; 1, protocol 1; 2a, protocol 2a; 2b, protocol 2b; 3, protocol 3; 4, protocol 4; 5, protocol 5.

Only protocol 5 was used to extract DNA from isolates cultures at a concentration of 10^3 CFU/ml due to the greater concentration of DNA and a higher level of purity achieved by this method in comparison to the other protocols. DNA concentration measurement showed a lower standard deviation than that of samples at a concentration of 10^7 CFU/ml, while purity was below the ideal threshold. The concentration 2.1ng/ μ L to 3.39 ng/ μ L showed purity of 0.85 from 1.67 (absorbance 260/280 nm) and 0,18 from 0,44 (absorbance 260/230 nm).

Figure 2 shows the PCR results of four extractions of DNA from isolates cultures at a concentration of 10^3 CFU/ml using protocol 5. Furthermore, Fig 2 illustrates the limit of sensitivity of the primer in low concentrations of genetic material.

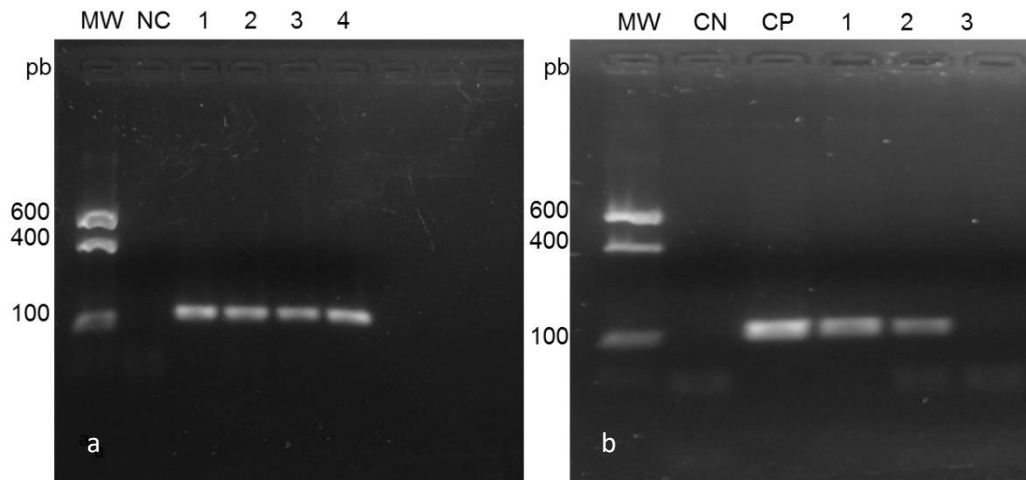


Fig. 2 Amplification of DNA extracted from samples at a concentration of 10^3 CFU/ml using protocol 5. a: MW, molecular weight marker 641; NC, negative control; 1 to 4, four extractions carried out on different days. The limit of sensitivity of the primer in low concentrations of genetic material by serial dilutions b: NC, negative control; PC, positive control 10^3 ; 1, 10^{-1} ; 2, 10^{-2} ; 3, 10^{-3} .

PCR has the potential to become a valuable tool for enhancing the management of patients suspected of having sepsis. Blood culture methods are considered the gold standard for diagnosis of sepsis. However, they have low sensitivity and their turnaround time for results is between 48 and 72 hours, while PCR has been shown to provide faster turnaround times from sample to results and has high specificity¹⁰.

The findings of this study show that protocol 5 achieved a maximum positivity rate and that absorbance was within the ideal purity (260 and 280 nm). Although the duration of DNA extraction is shorter using protocol 2b, protocol 5 (run-time was 4.5 hours) was the ideal method for extracting the minimum amount of DNA needed to perform PCR testing.

Protocol 3 used CTAB, which commonly used for the extraction of DNA from gram-positive bacteria^{5,11}. However, despite its low cost, this method is time consuming¹¹. Although this method resulted in a rate of PCR positivity of 100% and the

second highest concentration of DNA, purity was lower than expected. As shown by other studies^{5, 11}, of enzymes such as proteinase K and RNase does not ensure a high yield of DNA and ideal purity.

The low level of purity of the samples tested using protocol 4 is probably explained by PCR inhibition due to contaminants such as proteins and/or residues of extraction reagents⁸. Another study that used this protocol⁶ on human cell samples observed higher DNA yields and purity.

The cell wall of *S. aureus* consists of a thick peptidoglycan layer that is responsible for its rigidity, impairing the lysis of the bacterium and the effectiveness of conventional protocols¹¹. Extraction methods should be capable of extracting the highest possible concentration of intact and pure DNA¹². The success of PCR depends largely on ensuring the absence of inhibitory factors¹². Such factors may arise from the sample could be introduced during one or more of the essential stages of the DNA extraction process: obtaining DNA through cell lysis, during DNA polymerase activity, and nucleic acid degradation or capture¹². It is important to note that while a given extraction method may work well for one microorganism, it may not be so effective for others¹¹.

Protocol 5 used incubation with a NET buffer, denaturant solution, and heat shock. This procedure may have facilitated cell lysis and DNA purification thereby leading to higher DNA concentration and purity⁷.

Although the levels of purity of DNA extracted from samples at a concentration of 10^3 CFU/ml were low, the PCR yielded positive results. This is favorable since the contaminants that were present did not act as PCR inhibitors. A possible explanation for

the large difference between the rates observed by this test and those produced by the other protocols is the low number of cells.

The use of proteinase K, a lifton buffer and incubation by protocol 2^a led to an increase in DNA concentration and purity and PCR positivity, showing that these reagents play an important role in cell lysis.

PCR had greater clinical diagnostic accuracy as compared to standard blood culture method for the detection of bacteremia associated¹³. The present study sought to assess DNA extraction using a concentration of 10³UFC/ml, with currently accepted diagnostic thresholds for conventional blood culture methods, in order to validate the protocol based on its capacity to extract DNA in these concentrations and PCR sensitivity.

Studies using real-time PCR to analyze biofilm formed in CVCs removed from intensive care unit patients found that *S. aureus* was the most prevalent bacteria in the catheter tip^{14, 15}. Another important point is the contribution that PCR can make to the management of antibiotic therapy.

Its turnaround time enables the rapid start of therapy with correct medication, thereby positively influencing clinical outcomes and mortality, the incidence of sepsis, and the control of antimicrobial resistance³. Although molecular techniques may be more expensive, they are able to contribute to reducing mortality and length of hospital stay³.

In summary, the protocol developed for the present study is reproducible and the method uses reagents, inputs, and equipment that are readily available in routine diagnostic laboratories. However, important questions should be explored further, such as yield and DNA quality.

The main limitation of this study is that only isolated strains were used, and the protocols were not tested on samples taken from catheters removed from patients. Therefore, it is not possible to confirm whether the extraction method that showed the best performance would suffer from the interference of blood cells and other blood products.

Although one of the protocols seems more efficient than others, PCR was sensitive enough to allow detection of *S. aureus* in all other protocols. Furthermore, the primers used were shown to be sensitive to the detection of *S. aureus* even with low concentrations of DNA.

Conflicts of Interest - The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of this study; in the analyses or interpretation of data.

References

1. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(13):1198-208.
2. WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Organization WH, editor. Switzerland 2011. 40 p.
3. Riedel S, Carroll KC. Early identification and treatment of pathogens in sepsis: molecular diagnostics and antibiotic choice. *Clin Chest Med*. 2016;37:191-207.
4. Herrmann BG, Frischauf A-M. Isolation of genomic DNA. *Methods in enzymology*. 1987;152:180-3.
5. Minas K, McEwan NR, Newbold CJ, Scott KP. Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;325:162-9.
6. Ghatak S, Muthukumaran RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. *Journal of Biomolecular Techniques*. 2013;24:224-31.
7. Romero C, Lopez-Goñi I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of *Brucella* spp. by PCR. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 1999;65(8):3735-7.
8. Morin N, Vallaëys T, Hendrickx L, Natalie L, Wilmotte A. An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *Journal of Microbiological Methods*. 2010;80:148-54.
9. Brito CS, Ribas RM, Resende DS, Brito DV, Abdallah VO, Santos KR, et al. Genotypic study documents divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(4):387-93.
10. Furtado I, Xavier PCN, Tavares LVM, Alves F, Martins SF, Martins AdS, et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns with suspected nosocomial infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014;56(1):77-80.

11. Willner D, Daly J, Whiley D, Grimwood K, Wainwright CE, Hugenholtz P. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. *PLoS ONE*. 2012;7(4):1-12.
12. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;113(5):1014-26.
13. Al Wohoush I, Rivera J, Cairo J, Hachem R, Raad I. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(4):569-71.
14. Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, et al. Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):1-15.
15. Guembe M, Marín M, Martín-Rabadán P, Echenagusia A, Camúñez F, Rodríguez-Rosales G, et al. Use of universal 16S rRNA gene PCR as a diagnostic tool for venous access port- related bloodstream infections. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(3):799-804.

4.2- Artigo 2

Rastreamento molecular para investigação de patógenos em cateter venoso central

Molecular screening for pathogen investigation in central venous catheter

RESUMO

Introdução – A infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central (CVC) é um importante evento adverso na assistência à saúde. Métodos moleculares ainda não substituem os microbiológicos na detecção dos patógenos responsáveis pela infecção, mas podem auxiliar na caracterização epidemiológica e até na escolha terapêutica. **Objetivo** - detectar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, por reação em cadeia da polimerase (PCR), de material extraído da ponta de cateteres centrais de pacientes com suspeita de infecção, internados em Unidade de Terapia Intensiva. **Método** – Cateteres (n=34) de pacientes sob suspeita de infecção relacionada ao CVC foram analisados por PCR. Os achados foram comparados com cultura de ponta de cateter e hemoculturas realizadas pelo hospital. Dados dos pacientes: sexo, idade, uso de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência do cateter, local de inserção do CVC e presença de sinais flogísticos também foram analisados com o programa estatístico Stata, versão 15. **Resultados** - A prevalência das bactérias foi: *Staphylococcus aureus* (50%), *Enterococcus faecalis* (41.2%), *Klebsiella pneumoniae* (32.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (20.6%), *Acinetobacter baumannii* (38.2%), *Escherichia coli* (2.9%) e *Enterobacter cloacae* (0%). Nenhuma hemocultura apresentou crescimento bacteriano, a cultura de ponta de cateter revelou bactérias em 21 (61,8%) e a PCR teve positividade em 31 (91,2%) dos cateteres. O tempo médio de permanência do CVC foi 11 dias e a veia jugular foi o sítio de inserção mais prevalente. **Conclusão** – O método molecular identificou mais bactérias que os métodos microbiológicos e revelou colonização dos cateteres. As bactérias mais encontradas estão comumente no ambiente e na microbiota da pele o que sugere contaminação pelas mãos de profissionais da saúde e aponta necessidade de mais esforços em estratégias preventivas.

Palavras-chave: Infecções Relacionadas a Cateter, infecção hospitalar, cateteres, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Introduction – Central venous catheter-related bloodstream infection is an important adverse event in health care. Molecular methods are not yet substitutive of microbiological in the detection of the pathogens responsible for the infection, but they can help in the epidemiological characterization and even in the therapeutic choice.

Objective - to detect microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, by polymerase chain reaction (PCR), from material extracted from the tip of central catheters of patients suspected of infection, admitted to the Intensive Care Unit (ICU). **Method** - Catheters (n = 34) of patients suspected of CVC-related infection were analyzed by polymerase chain reaction (PCR). The findings were compared with culture of catheter tip and blood cultures performed by the hospital. Collection of patients' data was also carried out: sex, age, use of other invasive devices, CVC insertion location and period of catheter's use; and presence of phlogistic signs in the insertion site of the device were also analyzed using Stata statistical software, version 15. **Results** - The prevalence of bacteria was: *Staphylococcus aureus* (50%), *Enterococcus faecalis* (41.2%), *Klebsiella pneumoniae* (32.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (20.6%), *Acinetobacter baumannii* (38.2%), *Escherichia coli* (2.9%) e *Enterobacter cloacae* (0%). No blood culture showed bacterial growth, the culture of catheter tip revealed bacteria in 21 (61.8%) and the PCR had positivity in 31 (91.2%) of the catheters. The mean CVC time was 11 days and the jugular vein was most prevalent insertion site. **Conclusion** - The molecular method identified more bacteria than microbiological methods and revealed colonization of the catheters. The most commonly found bacteria are in the environment and in the microbiota of the skin, which suggests contamination by the hands of health professionals and points out the need for more efforts in preventive strategies.

Key Words: Catheter-Related Infections, cross infection, catheters, polymerase chain reaction

INTRODUÇÃO

Infecção relacionada à assistência a saúde representa o evento adverso mais frequente que ameaça a segurança dos pacientes, principalmente nos países em desenvolvimento⁽¹⁾. Estudos revelaram uma taxa geral de infecção de 34,5% entre pacientes em UTI nos EUA e 29,1% no Brasil^(2, 3). Dentre os tipos de infecções, destaca-se a infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central (CVC), uma vez que representa alto índice de morbidade, mortalidade e; aumento de permanência e custo na hospitalização⁽⁴⁻⁹⁾. Atualmente está entre a terceira ou quarta infecção mais prevalente associada à assistência à saúde^(1, 5). Os pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva são os mais acometidos⁽⁵⁾.

A contaminação do cateter se dá por via extraluminal ou intraluminal de várias formas: microrganismos da microbiota cutânea, contaminação do local de inserção do cateter, infusão de soluções intravenosas contaminadas, manipulações no conector do dispositivo, via hematogênica e pelas mãos da equipe que o manipula^(10, 11).

A detecção da infecção da corrente sanguínea pode ocorrer através de cultura microbiológica de líquidos corporais como sangue ou de dispositivos terapêuticos como cateteres utilizados pelos pacientes⁽⁹⁾. A hemocultura tem sido considerada o padrão ouro para o diagnóstico de infecção, entretanto, esse método não é inteiramente satisfatório porque está associado com resultados imprecisos e maior tempo de resposta^(12, 13), embora seja crucial na produção do antibiograma⁽¹³⁾. A cultura da ponta de cateter tem seu resultado associado à hemocultura para diagnóstico⁽⁹⁾. Os testes moleculares, apesar de ainda não serem substitutivos dos métodos microbiológicos, constituem importante auxílio na verificação das espécies e genes de resistência antimicrobiana^(12, 14). Apesar dos vários trabalhos que tratam da detecção de microrganismos por PCR⁽¹⁵⁻¹⁹⁾ há uma lacuna de estudos que tratam da investigação em CVC, principalmente quando o material a ser analisado está no lúmen de um dispositivo. A hipótese é que um exame molecular da comunidade bacteriana em CVC melhora a compreensão da variedade de bactérias que estão presentes nos dispositivos intravasculares e ajuda a desenvolver novos métodos para o diagnóstico de infecção da corrente sanguínea. Estudos indicam que há perspectivas de que a biotecnologia poderá facilitar o diagnóstico e melhorar o tratamento dos pacientes com infecções^(12, 13).

Este estudo teve por objetivo detectar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

baumannii, *Escherichia coli*, e *Enterobacter cloacae*, por PCR, de material extraído da ponta de cateteres centrais de pacientes com suspeita de infecção, internados em unidade de terapia intensiva de adultos.

MÉTODOS

Tratou-se de um estudo molecular, transversal, descritivo e exploratório, por amostra de conveniência obtida entre os meses de julho a dezembro de 2015. Foram recolhidos os CVC de 34 pacientes adultos internados na unidade de terapia intensiva de um hospital filantrópico e de ensino do interior de Minas Gerais com pelo menos 72 horas de internação e com suspeita de infecção relacionada ao cateter. Os critérios de inclusão foram estar em uso do CVC há pelo menos 72 horas, sob suspeita de infecção da corrente sanguínea e aceitar participar da pesquisa. Foram considerados como critérios de exclusão: pacientes que não estavam em uso de CVC, os pacientes em uso de cateter sem suspeita de infecção da corrente sanguínea e os pacientes ou responsáveis que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Não houve perdas durante o recrutamento da amostra.

A remoção do cateter ocorreu de forma asséptica, sendo utilizados os cinco centímetros distais para o estudo. Outros cinco centímetros subsequentes foram disponibilizados em recipiente específico para análise por cultura de ponta de cateter realizada pelo laboratório conveniado do hospital por análise microbiológica pela técnica de rolamento de Maki⁽²⁰⁾. Realizou-se hemocultura pelo hospital, seguindo rotina de exames laboratoriais e equipe própria, sob solicitação médica.

A partir da ponta do cateter foi extraído o DNA dos resíduos orgânicos aderidos ao dispositivo. Estes resíduos foram removidos com exaustivas lavagens com solução de lise bacteriana, um tampão (TrisHCl) com quelante de Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺ e glicose até que macroscopicamente não pudessem mais ser visualizados. Utilizou-se protocolo convencional a base de fenol e clorofórmio⁽²¹⁾. A concentração do DNA obtido foi estimada pelo Qubit reagent for DNA quantification broad range (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

A PCR convencional/qualitativa foi padronizada para o rastreamento de todas as bactérias investigadas no estudo, tanto nos reagentes utilizados quanto na temperatura de amplificação. Procedeu-se reações independentes para cada alvo investigado, sendo

cada unidade de análise com volume total de 10 µL contendo 0,65µL de água ultrapura; 2µL tampão Promega®, 0,8µL de 25mM MgCl₂ Promega®, 0,05 de Taq polimerase 1.25u Promega®, 1µL de mix DNTPs (2mM cada), 1,5µL de glicerol a 1,5%, 1µL cada primer (Forward e Reverse) e 2µL do DNA molde. A concentração de cada primer Forward e Reverse foi 1mM, exceto para o alvo *Staphylococcus aureus* que foi 0,3mM.

Os primers empregados para detecção do material amplificado e tamanhos dos produtos de PCR em pares de bases estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos usados para PCR do estudo.

Genes	Sequências dos nucleotídeos dos primers (5'-3')	Bactéria alvo	Número de acesso Genbank	Posição de anelamento	Tamanho do produto de PCR
16srRN A	F- GACGGTCTTGCTGCTCACTTA R- AGTTCCAGTGTGGCCGATCA	<i>Staphylococcus aureus</i>	MG878973.1	129 - 148 244 - 225	119
ef2181	F- ACACCAAATCAGGCCAGAAG R- GGCGCTAATTCATCATCGTT	<i>Enterococcus faecalis</i>	CP008816.1	1050000 1049981 1049502 1049521	- 499 - - -
ramA	F- AGCCTGGGGCGCTATATT R- GTGGTTCTCTTTGCGGTAGG	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP014696.2	5203209 5203226 5203388 5203369	- 180 - -
oprI	F- ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCT R- CTTGCGGCTGGCTTTTCCAG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JX040480.1	1-24 249-229	249
ompA	F- TCTTGGTGGTCACTTGAAGC R- ACTCTTGTGGTTGTGGAGCA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AY485227.1	774-793 859-840	89
Genome complete	F- CAGTACAGGTAGACTTCTG R- TGGGAGCGAAAATCCTG	<i>Escherichia coli</i>	AE014075-1	522451 522469 522669 522653	- 219 - -
pyrG	F- AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT R- CRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC	<i>Enterobacter cloacae</i>	*		535

*<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066358>

As reações foram conduzidas em um termociclador (Amplitherm, modelo TX96) usando o seguinte programa: para desnaturação inicial 95° C por 2 minutos; seguida por 40 ciclos incluindo dois passos consecutivos de 30 segundos cada, 94° C na desnaturação e 52° C no anelamento; e um ciclo de 60 segundos a 72° C na extensão.

Uma fase a 72° C por 5 minutos de extensão final. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia, BR).

Foram ainda coletados dados dos pacientes em prontuário por um instrumento elaborado pelos pesquisadores deste estudo. Este instrumento conteve as seguintes variáveis: sexo, idade, presença de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência do CVC e seu local de inserção, sinais flogísticos presentes no sítio do cateter, resultado de cultura e hemocultura. Os instrumentos foram codificados para evitar a identificação dos indivíduos.

A pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, CAAE 43533115.3.0000.5108, parecer 1.092.481, em acordo com a Resolução 466/2012. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelo participante ou responsável concordando com a participação na pesquisa.

As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico *Data Analysis and Statistical Software* (Stata)[®], versão 15. Na análise descritiva paramétrica, utilizaram-se dados Mínimos (Min), Máximos (Max), Média (M) ± Desvio Padrão (DP). A normalidade de distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis contínuas não paramétricas (*PCR positivo e quantidade de bactérias*) utilizou-se o teste de Mann–Whitney. Para a comparação entre as médias das variáveis de distribuição normal (tempo de permanência) foi o utilizado o teste t student para amostras independentes.

Para as variáveis categóricas (*quantidade de DNA e presença de arraste*) fez-se o teste exato de Fisher quando necessário (n<5), ou qui-quadrado de Pearson. O nível de significância considerado para inferência estatística foi de 5% ($p < 0,05$) e foram reportados intervalos de 95% de confiança.

RESULTADOS

A taxa de utilização de CVC foi de 34,0% dos pacientes na UTI no período de pesquisa, sendo 4318 pacientes-dia e 1468 cateteres-dia. Não houve notificação de infecção primária da corrente sanguínea pela instituição no período de estudo.

Os cateteres recolhidos foram provenientes de uma amostra com 22 pacientes do sexo masculino (64,7%) e 12 (35,3%) do sexo feminino. A maioria dos pacientes tinha entre 18 e 59 anos (70,6%).

Treze pacientes investigados (38,2%) fizeram hemocultura e todos tiveram ausência de bactérias como resultado do exame. Entre estes resultados negativos, 10 (76,9%) dos cateteres apresentaram bactérias quando feito PCR. Considerando os cateteres de pacientes que não fizeram a hemocultura, um total de 21 (61,8%) cateteres, ao teste de PCR, no entanto, 18 (85,7%) apresentaram presença de bactérias.

A cultura de ponta de cateter revelou bactérias em 21 (61,8%) dispositivos, enquanto a PCR apresentou positividade em 31 (91,2%). No método microbiológico somente um bactéria foi identificada e no método molecular até 4 bactérias foram identificadas em cada cateter. Entre as sete bactérias rastreadas apenas um, *Enterobacter cloacae* group, não foi identificado na PCR. A Tabela 2 apresenta a distribuição dos achados em cada cateter em relação à cultura de ponta de cateter e a PCR.

Tabela 2: Bactérias encontradas na cultura de ponta de cateter e na PCR (n=34).

Cultura de Ponta CVC	PCR													
	S. aureus		E. faecalis		K. pneumoniae		P. aeruginosa		A. baumannii		E. coli		E. cloacae	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
-	17	50	14	41,2	11	32,4	7	20,6	13	38,2	1	2,9	0	0
-	+		+		-		-		-		-		-	
<i>S. aureus</i>	-		-		-		-		+		-		-	
-	-		-		-		-		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i>	-		-		-		+		-		-		-	
<i>E. coli</i>	-		-		+		+		+		-		-	
<i>Proteus mirabilis</i>	-		-		+		+		+		-		-	
-	-		-		+		-		-		-		-	
-	+		-		-		-		-		-		-	
-	-		-		-		+		-		-		-	
<i>Proteus vulgaris</i>	-		-		+		-		-		-		-	
-	-		-		-		-		-		-		-	
<i>Staphylococcus spp coagulase negativa</i>	+		-		-		-		+		-		-	
-	-		+		-		-		-		-		-	
-	+		+		-		-		+		-		-	
-	+		+		-		-		-		-		-	
-	+		+		-		+		-		-		-	
<i>Staphylococcus Negativa</i>	+		+		+		-		-		-		-	
-	+		+		-		-		+		-		-	
-	+		-		+		-		-		-		-	
-	-		-		-		-		+		-		-	
-	+		+		-		-		+		+		-	
<i>Streptococcus spp</i>	+		+		-		-		-		-		-	
<i>P. aeruginosa</i>	-		+		-		-		-		-		-	
-	+		+		-		+		-		-		-	
-	+		-		+		-		+		-		-	
-	-		-		-		-		+		-		-	
<i>Staphylococcus Negativa</i>	-		-		-		-		-		-		-	
-	-		-		+		-		-		-		-	
<i>Proteus mirabilis</i>	+		-		+		-		-		-		-	
-	-		+		-		-		+		-		-	
-	+		-		+		-		+		-		-	
-	-		-		+		+		-		-		-	
-	+		+		-		-		+		-		-	

- significa ausência de crescimento ou identificação bacteriana
+ significa identificação da espécie bacteriana

A tabela 3 apresenta a associação entre os dispositivos invasivos que estavam presentes nos participantes da pesquisa, além do CVC, versus a positividade da PCR e quantidade de bactérias encontradas na ponta do cateter por PCR.

Tabela 3: Associação entre os dispositivos invasivos que estavam presentes nos participantes da pesquisa, além do CVC, versus a positividade da PCR e quantidade de bactérias encontradas na ponta do cateter por PCR.

Dispositivos	Amostra (n=34)		Valor de p PCR positivo	Valor de p Quantidade de bactérias
	n	%	P valor	P valor
CVC diálise	5	14,71	0,008*	0,004*
PIA	20	58,82	0,129	0,002*
PIC	6	17,75	0,401	0,006*
DVE	1	2,94	0,234	0,123
Dreno abdominal	3	8,82	0,573	0,008*
Tubo orotraqueal	15	44,12	0,289	0,001*
Traqueostomia	13	38,24	0,121	0,003*
CVC para Nutrição parenteral	7	20,59	0,356	0,006*
Sonda nasoentérica	20	58,82	0,100	0,004*

*p<0,05

PIA – Pressão intrarterial; PIC- Pressão intracraniana; DVE – Derivação ventricular externa.

Todos os pacientes apresentavam sinais flogísticos no sítio de inserção do cateter que se encontrava na maioria na veia jugular interna e com permanência média de 11 dias (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição das características inflamatórias e infecciosas, local de inserção do CVC e o tempo de permanência.

Sinais inflamatórios e infecciosos	Amostra (n=34)		Local de inserção			Tempo de permanência (dias)		
	N	%	Jugular	Subclávia		M ±DP	Min-Max	
			N	%N	%			
<i>Sinais flogísticos</i>	16	47,06	8	38,09	8	61,54	11,05± 6,45	3 - 33
<i>Sinais flogísticos e secreção purulenta</i>	18	52,94	13	61,91	5	38,46	11,25±8,29	4 - 39

A associação entre o tempo médio de permanência do cateter (11,05±7,19) versus a positividade na PCR e a quantidade de bactérias identificadas em cada CVC, apresentou valores significativos, sendo $p = 0,0025$ e $p = 0,001$ respectivamente.

A quantificação do DNA de cada amostra de cateter apontou valores variados entre $< 1\text{ng}/\mu\text{L}$ a $76,70\text{ng}/\mu\text{L}$. Todas as amostras com rendimento de DNA acima de $25\text{ng}/\mu\text{L}$ apresentaram um arraste no gel de agarose. A quantidade de DNA foi testada para analisar sua influência na presença de arraste, revelando elevada significância estatística ($p < 0,001$). Não houve relação entre o número de bactérias detectadas na PCR e o rendimento do DNA.

A Figura 1 apresenta a amplificação dos alvos investigados.

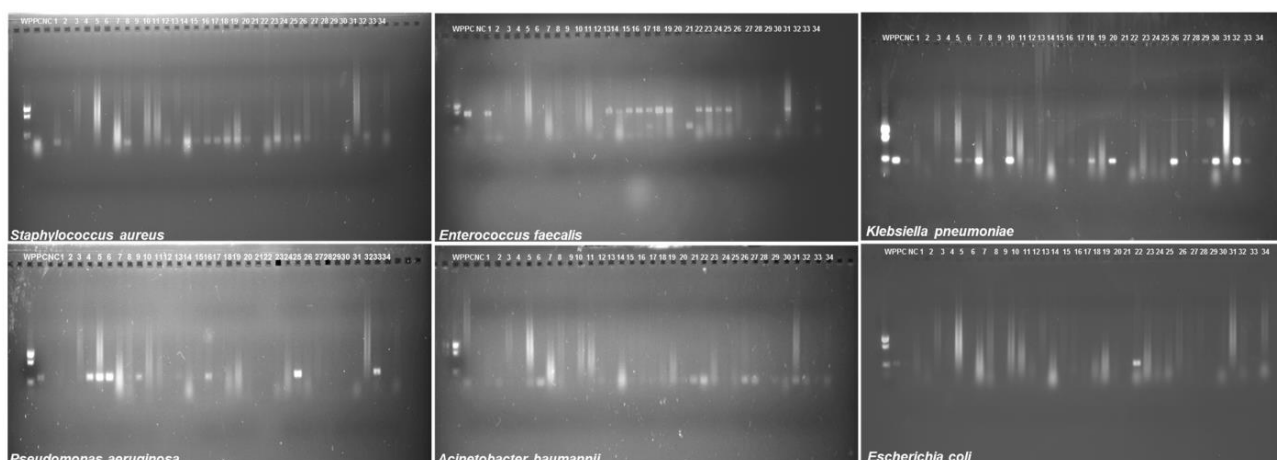


Figura 1 - Eletroforese de gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação por PCR do DNA extraído em amostras de 34 cateteres venosos centrais de pacientes com suspeita

de infecção. As colunas são as seguintes: WP, marcador de peso molecular 752 (700, 500 e 200 pares de bases); PC, controle positivo; NC, controle negativo; 1 a 34, amostras.

DISCUSSÃO

No presente estudo, o sexo masculino encontrado predominante pode ter relação com perfil da demanda do hospital do estudo. Por outro lado, uma revisão de literatura apontou que homens, crianças e idosos são grupos com maior incidência de sepse⁽¹³⁾.

Métodos de diagnóstico molecular emergentes são capazes de fornecer identificação rápida para organismos-chave e marcadores de resistência antimicrobiana de hemoculturas positivas⁽¹²⁾. Uma vantagem da padronização da PCR realizada neste estudo é que as sete bactérias investigadas foram processadas com a combinação de reagentes e o mesmo programa de temperaturas para cada fase da amplificação do DNA para todos os alvos. Na prática laboratorial isso otimiza tempo, possibilitando rastreamento das bactérias num processo único no termociclador.

A técnica biomolecular complementa a cultura microbiológica, uma vez que esta possui limitações como especificidade mais baixa, maior tempo de resultado e início de terapia antimicrobiana empírica⁽¹³⁾. Novas técnicas em biotecnologia têm sido avaliadas e são, por enquanto, consideradas estratégias adicionais importantes para garantir terapêutica correta com início rápido⁽¹³⁾.

A especificidade da PCR tem apontado valores elevados quando comparadas às hemoculturas^(13, 22), mas há diferenças nos métodos e elas são justificadas em parte pelas diferenças nas populações investigadas, desenho de estudo, quantidade de material coletado, diferenças nos sistemas de cultura de sangue⁽¹⁸⁾ e uso de antimicrobianos anteriores a coleta das amostras^(18, 22). A técnica de PCR tem mostrado ser superior a cultura convencional em pacientes submetidos à antibioticoterapia⁽²³⁾. Outro ponto a destacar, é a concorrência entre níveis baixos de DNA bacteriano e altos níveis de DNA genômico humano, resultando em sensibilidade diminuída da PCR^(18, 23).

Um estudo onde foram comparados testes de hemocultura e PCR na investigação da infecção da corrente sanguínea, teve resultados positivos por métodos moleculares que não foram detectados em métodos microbiológicos⁽¹⁶⁾. Outro estudo testou a

sensibilidade e especificidade da PCR em relação a hemocultura padrão para identificação de bacteremias provenientes de cateteres venosos⁽²⁴⁾. Tal estudo comprovou uma melhor acurácia da técnica de PCR para contribuição de diagnósticos clínicos. Esta avaliação é variável, dependendo de fatores como uso de antimicrobianos e quadro imunológico do paciente. Uma contribuição da PCR é no manejo da antibioticoterapia, considerando o intervalo de tempo para início da terapia medicamentosa correta que influencia nos resultados clínicos e mortalidade, nas taxas de sepse e no controle da resistência microbiana⁽¹²⁾.

Neste estudo, algumas culturas de ponta de cateter apresentaram *Staphylococcus aureus* e tal bactéria não foi identificada nesses CVC na PCR. A ausência de identificação pode ser devida à contaminação da amostra durante coleta do material para hemocultura. As bactérias mais comumente isolados em pacientes com infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter são *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus aureus*, que podem ser reflexo da colonização da pele do paciente e das mãos dos profissionais de saúde⁽¹⁰⁾. Embora o grupo das gram-negativas apresenta maior prevalência nas infecções da corrente sanguínea, o *Staphylococcus aureus* como neste estudo, foi a principal bactéria identificada em grande coorte multicêntrica nacional, apontou ainda que a maioria das infecções são monomicrobianas⁽¹⁹⁾. O *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas relacionadas à infecção da corrente sanguínea⁽²⁵⁾ e acurácia na sua detecção e consequente eliminação é um desafio para saúde pública em nível mundial, principalmente nos países em desenvolvimento⁽²⁶⁾. Ela já é reconhecida como a bactéria mais comum responsável por biofilme associado a infecção, sendo essa a habilidade que facilita sua colonização nos dispositivos, inclusive com correlação de genes formadores de proteínas de aderência a dispositivos⁽²⁷⁾.

Os achados da PCR deste estudo apontam colonização dos cateteres, o que configura um pré-requisito para a infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter⁽²⁸⁻³⁰⁾. A presença de bactérias nas pontas de cateteres cultivados é em si, um alerta, servindo para aumentar a consciência clínica do risco de infecção associada ou relacionada ao CVC⁽⁸⁾. Um argumento sobre os critérios de diagnóstico de infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter pontua limitações: nem sempre a hemocultura é realizada, o tratamento antimicrobiano prévio interfere no crescimento de bactérias da cultura, volume de sangue coletado, liberação intermitente de bactérias para o sangue e transporte inapropriado ou demora em chegar ao laboratório⁽⁸⁾. No caso específico deste

estudo ainda há o fato do equipamento de processamento das hemoculturas não ser de agitação automatizada.

Em um estudo retrospectivo realizado em UTI comparando os três tipos de avaliação para infecção relacionada ao cateter, foi constatado que a remoção do cateter reduziu a infecção da corrente sanguínea com tendência para menor mortalidade⁽⁶⁾. A remoção do cateter elimina possível biofilme⁽³¹⁾.

As bactérias das famílias *Staphylococcus* e enterobactérias lideram a prevalência nas investigações de ponta de cateter e hemoculturas^(4, 5, 26). Neste estudo a *Enterococcus faecalis* foi encontrado em 41,2% dos cateteres, o que chama atenção da possível contaminação durante a prestação de cuidados. A higienização das mãos, uso de gluconato de clorexidina como antisséptico, uso de barreira máxima de precaução durante a inserção cateter, avaliações diárias da necessidade do CVC com remoção precoce e desinfecção do conector são importantes bundles de controle da infecção relacionada ao cateter^(11, 32). Uma revisão sistemática que avaliaram a redução de infecção antes e pós intervenções, cuidados na inserção e manutenção do cateter; e vigilância para remoção do dispositivo, demonstrou que tais ações resultaram positivamente na queda das taxas de infecção⁽³³⁾. Outras revisões apontaram como a aplicação dos bundles reduziu as taxas de infecções associadas ou relacionadas ao CVC nos estudos analisados^(34, 35). Uma coorte de 6 anos, em hospital sueco, demonstrou redução das taxas de infecção relacionada ao cateter com implementação de programa de prevenção recomendado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC)⁽⁸⁾. O uso de solução antisséptica clorexidina 2% no local de inserção, seguindo um protocolo de repetições da aplicação, revelou redução na taxa de infecções relacionadas ao CVC⁽⁴⁾.

A presença de outros dispositivos não apresentou significância ($p > 0,05$) na identificação de bactérias no CVC por PCR, exceto com o cateter de diálise. Verificou-se ainda que os dispositivos invasivos além do CVC, como a sonda vesical de demora, cateter de diálise, PIA, PIC, dreno abdominal, tubo orotraqueal, traqueostomia, cateter de nutrição parenteral e sonda nasoentérica foram significativos ($p < 0,05$) quando comparados à quantidade de bactérias presentes no dispositivo de acesso venoso central. Tais resultados apontam para uma possível tendência à adquirir infecção aqueles pacientes críticos que apresentam uma maior quantidade de dispositivos invasivos uma vez que maior será o número de manipulações e entradas para microrganismos, ou seja

aponta a gravidade do estado de saúde e conseqüentemente os riscos do paciente⁽⁵⁾. Geralmente uma infecção da corrente sanguínea é primária, mas ocasionalmente pode ser secundária devido a coleção de dispositivos invasivos inseridos, dificuldade da abordagem diagnóstica e complicações⁽⁵⁾.

Todos os pacientes deste estudo tiveram sintomas e sinais inflamatórios no sítio de inserção. Esses sintomas e sinais são uma suspeita da presença de biofilme no CVC⁽³¹⁾. Os sinais como hiperemia, secreção purulenta e endureção são sinais sugestivos de infecção e a vigilância é de extrema importância, recomendando-se, inclusive, curativo transparente do acesso para monitoramento desses sinais⁽³⁴⁾.

Estudo aponta média de tempo de permanência do cateter menor que o encontrado no presente trabalho⁽⁸⁾. Já um estudo prospectivo de 3 anos, detectou aumento progressivo de infecção da corrente sanguínea associada ao CVC com o tempo de uso do dispositivo⁽³⁶⁾. Ademais, uma revisão recomendou a remoção do cateter até o oitavo dia⁽³⁵⁾. Quanto maior o tempo de permanência do cateter maior a variedade de categorias de microrganismos e prevalência de infecção da corrente sanguínea⁽³⁶⁾.

Revisão de literatura apontou que o acesso em veia subclávia apresenta menor risco de infecção que a veia jugular interna, mas alguns estudos não corrigiram fatores de confusão ou não apresentaram diferenças estatisticamente significativas⁽³⁷⁾. A escolha pela veia subclávia é a mais indicada no controle de infecção. Entretanto, outro ponto importante é o risco mecânico da acesso em subclávia que deve ser considerado (pneumotórax, punção da artéria subclávia, laceração da veia subclávia, estenose, hemotórax, trombose, embolia)⁽⁹⁾ e maior facilidade de inserção, guiada por ultrassom, talvez por isso sua maior prevalência evidenciada nos estudos⁽⁸⁾. A influência do local sobre o risco de infecção pelo cateter, está relacionada em parte pelo risco de tromboflebite e densidade da microbiota local⁽⁹⁾, além da proximidade com a cavidade bucal, o contato próximo com as secreções das vias aéreas e dificuldade em manter a cobertura do cateter.

O conhecimento das bactérias potencialmente responsáveis por infecções sanguíneas permite que o tratamento que possa ser adaptado e auxilia na escolha dos antibióticos mais adequados⁽³⁰⁾. O estudo apresenta algumas limitações. Foi realizado

em um única unidade e não teve um grupo controle para aplicação das mesmas análises. Além disso, não conseguiu relacionar os achados da PCR com as hemoculturas.

Apesar dos resultados das PCR e o quantitativo de bactérias encontradas, não foi possível notificar infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter no período do estudo. Isto mostra que a identificação de bactérias isoladas nos cateteres não significa a presença de infecção. A tecnologia favoreceu a elucidação da colonização do cateter, a necessidade de repensar e avaliar as hemoculturas realizadas na instituição, a importância de realização de hemocultura pareada com a ponta de cateter e impulsiona novos inquéritos para comparar amostra de sangue por teste de PCR e hemoculturas.

Finalmente, é importante ter em mente que a estratégia proposta neste estudo complementa as hemoculturas no diagnóstico de infecção da corrente sanguínea. A combinação de estratégias diagnósticas e métodos eficientes e rápidos possibilitam melhor terapêutica. A PCR adiciona clinicamente valiosas informações para cultura de sangue e seu curto tempo de resposta oferece um grande potencial na prática clínica. Apesar da técnica molecular ser mais cara, ela pode contribuir para reduzir a mortalidade e o tempo de hospitalização⁽¹³⁾. Testes de PCR com amostras de sangue do cateter central e sangue periférico são possíveis de serem realizadas utilizando a mesma padronização deste estudo e podem representar uma alternativa para preenchimento dos critérios de diagnóstico de infecção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais de 60% dos cateteres foram identificados como colonizados com pelo menos uma das bactérias investigadas. Por outro lado mais de 90% apresentou positividade para PCR. Além disso, o método molecular identificou diferentes tipos de bactérias num mesmo cateter não identificado no método microbiológico.

Tal fato contribui tanto na prática clínica, ao considerar as bactérias presentes no cateter, a quantidade de dispositivos invasivos e tempo de permanência do CVC acima do tempo descrito em outros estudos, quanto para o conhecimento científico uma vez que ainda é uma lacuna os testes diagnósticos precisos para identificação de bactérias na detecção da infecção da corrente sanguínea. Importante destacar, entretanto, que, os

resultados do presente estudo não possibilitaram a detecção da infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter devido a não correlação com hemoculturas realizadas.

Outro ponto a considerar é que, os patógenos mais detectados são comumente encontrados no ambiente e transmitidos aos pacientes geralmente pelas mãos dos profissionais de saúde. Estes achados são relevantes ao se pensar nas medidas de prevenção de infecção da corrente sanguínea relacionada ao CVC. Medidas efetivas de higienização das mãos, desinfecção de conector e medidas de barreira estéril na inserção do CVC podem contribuir para diminuição dessa taxa.

Finalmente, a técnica de biologia molecular demonstrou viabilidade e efetividade na identificação de patógenos. O painel de *primers* e protocolo de amplificação deste estudo identificaram os principais dos patógenos prevalentes nas infecções da corrente sanguínea. Desta forma, a identificação de microrganismos poderá guiar, a avaliação de eventos adversos que afetam a saúde e a tomada de decisão relativa à escolha da melhor terapia.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse. A fundação apoiadora não teve papel no desenho do estudo, na análise ou interpretação dos dados

REFERÊNCIAS

1. WHO. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Organization WH, editor. Switzerland 2011. 40 p.
2. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(13):1198-208.
3. Fortaleza CMCB, Padoveze MC, Kiffer CV, Barth AL, Carneiro ICdRS, Giamberardino HG, et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in acute care hospitals in Brazil. *Journal of Hospital Infection*. 2017;96(2):139-44.
4. Samuelson C, Kaur H, Kritsotakis E, Goode S, Nield A, Partridge D. A daily topical decontamination regimen reduces catheter-related bloodstream infections in haematology patients. *Journal of Infection*. 2017.
5. Deptuła A, Trejnowska E, Dubiel G, Wanke-Rytt M, Deptuła M, Hryniewicz W. Healthcare associated bloodstream infections in Polish hospitals: prevalence, epidemiology and microbiology—summary data from the ECDC Point Prevalence Survey of Healthcare Associated Infections 2012–2015. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017:1-6.
6. Deliberato RO, Marra AR, Corrêa TD, Martino MDV, Correa L, dos Santos OFP, et al. Catheter Related Bloodstream Infection (CR-BSI) in ICU Patients: Making the Decision to Remove or Not to Remove the Central Venous Catheter (CR-BSI: The Impact of Different Diagnostic Methods). *PLoS ONE*. 2012;7(3):1-6.
7. Brañas P, Morales E, Ríos F, Sanz F, Gutiérrez E, Quintanilla N, et al. Usefulness of endoluminal catheter colonization surveillance cultures to reduce catheter-related bloodstream infections in hemodialysis. *AJIC: American Journal of Infection Control*. 2014;42(11):1182-7.
8. Hammarskjöld F, Berg S, Hanberger H, Taxbro K, Malmvall B-E. Sustained low incidence of central venous catheter-related infections over six years in a Swedish hospital with an active central venous catheter team. *AJIC: American Journal of Infection Control*. 2014;42(2):122-8.
9. CDC. Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections. Centers for Disease Control and Prevention. USA: Department of Health & Human Service; 2011. p. 83.
10. Corrêa KdLG, Almeida GMdD, Júnior Almeida JNd, Rossi F. Diferença de tempo de positividade: método útil no diagnóstico de infecção de corrente sanguínea relacionada com cateter? *J Bras Patol Med Lab*. 2012;48(3):195-202.
11. Rupp ME, Majorant D. Prevention of Vascular Catheter-Related Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(4):853-68.
12. Riedel S, Carroll KC. Early identification and treatment of pathogens in sepsis: molecular diagnostics and antibiotic choice. *Clin Chest Med*. 2016;37:191-207.
13. Liesenfeld O, Lehman L, Hunfeld K-P, Kost G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2014;4(1):1-25.
14. Cambau E, Durand-Zaleski I, Bretagne S, Brun-Buisson C, Cordonnier C, Duval X, et al. Performance and economic evaluation of the molecular detection of pathogens for patients with severe infections: the EVAMICA open-label, cluster-randomised, interventional crossover trial. *Intensive Care Med*. 2017;43(11):1613-25.
15. Adrie C, Garrouste-Orgeas M, Ibn Essaïed W, Schwebel C, Darmon M, Mourvillier B, et al. Attributable mortality of ICU-acquired bloodstream infections:

Impact of the source, causative micro-organism, resistance profile and antimicrobial therapy. *Journal of Infection*. 2017;74(2):131-41.

16. Furtado I, Xavier PCN, Tavares LVM, Alves F, Martins SF, Martins AdS, et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns with suspected nosocomial infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014;56(1):77-80.

17. Dalla-Costa LM, Morello LG, Conte D, Pereira LA, Palmeiro JK, Ambrosio A, et al. Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. *Journal of microbiological methods*. 2017;140:61-6.

18. Dinc F, Akalin H, Ozakin C, Sinirtas M, Kebabci N, Iscimen R, et al. Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis. *Minerva anestesiologica*. 2016;82(3):301-9.

19. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(5):1866-71.

20. Maki DG, Weise CE, Serafin HW. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New England Journal Medical*. 1977;296:1305-9.

21. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. . 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 3104 p.

22. Plettig R, Nowak A, Balau V, Hahnenkamp K, Usichenko T. Prospective comparison of a PCR assay and a microbiological culture technique for identification of pathogens from blood and non-blood samples in septic patients. *Journal of intensive care*. 2015;3(1):51.

23. Guembe M, Marín M, Martín-Rabadán P, Echenagusia A, Camúñez F, Rodríguez-Rosales G, et al. Use of universal 16S rRNA gene PCR as a diagnostic tool for venous access port- related bloodstream infections. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(3):799-804.

24. Al Wohoush I, Rivera J, Cairo J, Hachem R, Raad I. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(4):569-71.

25. Clerc O, Prod'hom G, Senn L, Jaton K, Zanetti G, Calandra T, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(4):355-60.

26. Allegranzi B, Nejad SB, Combescure C, Graafmans W, Attar H, Donaldson L, et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2011;377(9761):228-41.

27. Oufriid S, Ghazlane Z, Jamali L, El Otmani F, Talmi M, Elmdaghri N, et al. Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter- related infections. *Journal of infection in developing countries*. 2015;9(4):368-72.

28. Singh MK, Mallan D, Tripathi SS, Yadav RR, Avasthi S. A Study of Central Venous Catheter Colonizations and Catheter-related Bloodstream Infections among Patients admitted in the Intensive Care Unit of a Tertiary Care Teaching Hospital. 2016.

29. Planes AM, Calleja R, Bernet A, Campins-Martí M, Almirante B, Pumarola T, et al. Evaluation of the usefulness of a quantitative blood culture in the diagnosis of

- catheter-related bloodstream infection: Comparative analysis of two periods (2002 and 2012). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2016;34(8):484-9.
30. Watson CM, Al-Hasan MN. Bloodstream infections and central line-associated bloodstream infections. *The Surgical clinics of North America*. 2014;94(6):1233-44.
 31. Gominet M, Compain F, Beloin C, Lebeaux D. Central venous catheters and biofilms: where do we stand in 2017? *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2017;125(4):365-75.
 32. Lin W-P, Chang Y-C, Wu U-I, Hung M-C, Chuang P-Y, Wang J-T, et al. Multimodal interventions for bundle implementation to decrease central line-associated bloodstream infections in adult intensive care units in a teaching hospital in Taiwan, 2009–2013. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2017.
 33. Patel PK, Gupta A, Vaughn VM, Mann JD, Ameling JM, Meddings J. Review of strategies to reduce central line-associated bloodstream infection (CLABSI) and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI) in adult ICUs. *Journal of Hospital Medicine*. 2017:E1-E11.
 34. Silva AGd, Oliveira ACd. Prevenção da infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central: Uma revisão integrativa. *Vigil sanit debate*. 2016;4(2):117-25.
 35. Velasquez Reyes DC, Bloomer M, Morphet J. Prevention of central venous line associated bloodstream infections in adult intensive care units: A systematic review. *Intensive & critical care nursing*. 2017;43:12-22.
 36. Matsui Y, Shimatani M, Kuzuhara K, Miyazaki Y, Horiuchi T, Tajima Y, et al. Three-year prospective, observational study of central line-associated bloodstream infections in a 600-bed Japanese acute care hospital. *American Journal of Infection Control*. 2015;43(5):494-8.
 37. Bouza E, Guembe M, Munoz P. Selection of the vascular catheter: can it minimise the risk of infection? *International Journal Of Antimicrobial Agents*. 2010;36:S22-S5.
-

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo detectou patógenos em ponta de CVC por PCR. Dois enfoques orientaram a investigação: 1) métodos de extração de DNA convencionais e 2) rastreamento molecular para investigação de patógenos em CVC. Os métodos de extração de material genômico foram eficientes na bactéria *Staphylococcus aureus*, e a partir dessa referência padronizou a obtenção de DNA das demais bactérias investigadas. A avaliação dos métodos de obtenção do DNA possibilitaram conhecimento das características e potenciais de cada protocolo, bem como de fatores inibidores de PCR.

Em relação, ao rastreamento molecular para investigação de patógenos, o método de extração de DNA selecionado a partir da comparação anteriormente testada com *Staphylococcus aureus*, o painel de primers utilizado e a padronização da PCR foram eficientes para detectar os sete alvos pretendidos. Esse conjunto de etapas bem definidas possibilita a replicação do estudo em outras amostras. No caso da padronização da reação, a vantagem é a otimização de tempo e facilidade de manipulação na montagem de um teste, bem como a possibilidade de rastreio para sete microrganismos em um único processo de PCR.

Os achados no rastreamento evidenciaram uma detecção superior por PCR comparado a cultura de ponta de cateter. Além de apontar até quatro bactérias em um único CVC, enquanto nas culturas de ponta do CVC positivas houve crescimento de apenas um microrganismo. Já as hemoculturas apresentaram ausência de crescimento bacteriano. Tais resultados não confirmaram infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter, entretanto determinaram colonização de mais de 90% da amostra. Destaca-se a predominância de microrganismos presentes no ambiente e na microbiota da pele, sugerindo possível contaminação pelas mãos dos profissionais de saúde.

Na perspectiva da saúde pública, os achados servem de incentivo às iniciativas de permanentes medidas de prevenção da infecção da corrente sanguínea. Neste âmbito, sugere-se discutir com o serviço de saúde a vigilância dos bundles recomendados pelo CDC e pela ANVISA para controle da colonização dos cateteres. A literatura evidenciou que tais medidas tem impacto redutor das taxas de infecção.

Outra contribuição diz respeito à identificação molecular de microrganismos que poderá auxiliar a avaliação de eventos adversos que afetam a saúde e a tomada de

decisão relativa à escolha da melhor terapia. Vale ressaltar que tal abordagem investigativa é inédita na região estudada e que estimula outros estudos semelhantes, utilizando a biotecnologia na epidemiologia da vigilância em saúde e no auxílio ao desvelamento das IRAS.

Pesquisas futuras são indicadas para ampliar a detecção de microrganismos, inclusive com resistência antimicrobiana; e também aprofundar as análises ora apresentadas. O teste da ponta do cateter concomitante com teste de DNA extraído do sangue periférico e a reação em equipamento real-time possibilitariam maiores inferências sobre os resultados

A despeito da consistência do estudo, as limitações devem ser esclarecidas. O município onde foi realizado o estudo possui uma única unidade de terapia intensiva de adultos, inviabilizando a comparação com outra unidade. Em relação à ausência de grupo controle, se deu pela dificuldade de enquadrar pacientes com perfis e situações semelhantes e sem suspeita de infecção vascular.

Por fim, o estudo desperta profissionais e pesquisadores para a elaboração de estratégias e ações intersetoriais (pesquisa, gestão, atenção) na prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde.

REFERÊNCIAS

- 1 DAL-BÓ, K.;SILVA, R. M. D.;SAKAE, T. M. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. *Rev Bras Ter Intensiva.*, v. 24, n. 4, p. 381-385, 2012.
- 2 PEREIRA, F. G. F.;CHAGAS, A. N. S. D.;FREITAS, M. M. C.;BARROS, L. M.;CAETANO, J. Á. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. *Vigil. sanit. debate*, v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016.
- 3 DE ANGELIS, G.;MURTHY, A.;BEYERSMANN, J.;HARBARTH, S. Estimating the impact of healthcare-associated infections on length of stay and costs. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 12, p. 1729-1735, 2010.
- 4 NANGINO, G. D. O.;OLIVEIRA, C. D. D.;CORREIA, P. C.;MACHADO, N. D. M.;DIAS, A. T. B. Impacto financeiro das infecções nosocomiais em unidades de terapia intensiva em hospital filantrópico de Minas Gerais. *Rev Bras Ter Intensiva*, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2012.
- 5 ALLEGRANZI, B.;NEJAD, S. B.;COMBESCURE, C.;GRAAFMANS, W.;ATTAR, H.;DONALDSON, L. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, v. 377, n. 9761, p. 228-241, // 2011.
- 6 STRICH, J. R.;PALMORE, T. N. Preventing Transmission of Multidrug-Resistant Pathogens in the Intensive Care Unit. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 31, n. 3, p. 535-550, 2017/09/01/ 2017.
- 7 CDC. *Guidelines for the Prevention of intravascular Catheter-Related Infections.* Centers for Disease Control and Prevention. USA: Department of Health& Human Service: 83 p. 2011.
- 8 SAMUELSON, C.;KAUR, H.;KRITSOTAKIS, E.;GOODE, S.;NIELD, A.;PARTRIDGE, D. A daily topical decontamination regimen reduces catheter-related bloodstream infections in haematology patients. *Journal of Infection*, 2017.
- 9 BRITO, C. S.;RIBAS, R. M.;RESENDE, D. S.;BRITO, D. V.;ABDALLAH, V. O.;SANTOS, K. R. et al. Genotypic study documents divergence in the pathogenesis of bloodstream infection related central venous catheters in neonates. *Braz J Infect Dis*, v. 18, n. 4, p. 387-93, Jul-Aug 2014.
- 10 LEPAINTEUR, M.;DESROCHES, M.;BOURREL, A. S.;ABERRANE, S.;FIHMAN, V.;L'HERITEAU, F. et al. Role of the central venous catheter in bloodstream infections caused by coagulase-negative staphylococci in very preterm neonates. *Pediatr Infect Dis J*, v. 32, n. 6, p. 622-8, Jun 2013.
- 11 CORRÊA, K. D. L. G.;ALMEIDA, G. M. D. D.;JÚNIOR ALMEIDA, J. N. D.;ROSSI, F. Diferença de tempo de positividade: método útil no diagnóstico de infecção de corrente sanguínea relacionada com cateter? *J Bras Patol Med Lab*, v. 48, n. 3, p. 195-202, 2012.
- 12 SILVA, A. G. D.;OLIVEIRA, A. C. D. Prevenção da infecção da corrente sanguínea relacionada ao cateter venoso central: Uma revisão integrativa. *Vigil. sanit. debate*, v. 4, n. 2, p. 117-125, 2016.

- 13 MARRA, A. R.;CAMARGO, L. F. A.;PIGNATARI, A. C. C.;SUKIENNIK, T.;BEHAR, P. R. P.;MEDEIROS, E. A. S. et al. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 5, p. 1866-1871, 2011.
- 14 DELIBERATO, R. O.;MARRA, A. R.;CORRÊA, T. D.;MARTINO, M. D. V.;CORREA, L.;DOS SANTOS, O. F. P. et al. Catheter Related Bloodstream Infection (CR-BSI) in ICU Patients: Making the Decision to Remove or Not to Remove the Central Venous Catheter (CR-BSI: The Impact of Different Diagnostic Methods). *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. 1-6, 2012.
- 15 SCHRANK, G.;BRANCH-ELLIMAN, W. Breaking the Chain of Infection in Older Adults. *Infectious Disease Clinics*, v. 31, n. 4, p. 649-671, 2017.
- 16 ADRIE, C.;GARROUSTE-ORGEAS, M.;IBN ESSAIED, W.;SCHWEBEL, C.;DARMON, M.;MOURVILLIER, B. et al. Attributable mortality of ICU-acquired bloodstream infections: Impact of the source, causative micro-organism, resistance profile and antimicrobial therapy. *Journal of Infection*, v. 74, n. 2, p. 131-141, 2017.
- 17 MARQUES NETTO, S.;ECHERB, I. C.;KUPLIHC, N. M.;KUCHENBECKERD, R.;KESSLERE, F. Infecção de cateter vascular central em pacientes adultos de um centro de terapia intensiva. *Rev Gaúcha Enferm.*, v. 30, n. 3, p. 429-36, 2009.
- 18 ARCIOLA, C. R.;CAMPOCCIA, D.;SPEZIALE, P.;MONTANARO, L.;COSTERTON, J. W. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, v. 33, n. 26, p. 5967-5982, 9// 2012.
- 19 ATSHAN, S. S.;SHAMSUDIN, M. N.;KARUNANIDHI, A.;VAN BELKUM, A.;LUNG, L. T. T.;SEKAWI, Z. et al. Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 18, p. 106-112, 2013.
- 20 ANVISA. *Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. ANVISA. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017.
- 21 BRACHINE, J. D. P.;PETERLINI, M. A. S. B.;PEDREIRA, M. D. L. G. Método bundle na redução de infecção de corrente sanguínea relacionada a cateteres centrais: Revisão integrativa. *Rev Gaúcha Enferm.*, v. 33, n. 4, p. 200-210, 2012.
- 22 LAM, I. Á.;BITTAR, J. P. Staphylococcus aureus, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, v. 84, n. 2, p. 383-391, 2012.
- 23 OUFRID, S.;GHAZLANE, Z.;JAMALI, L.;EL OTMANI, F.;TALMI, M.;ELMDAGHRI, N. et al. Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter- related infections. *Journal of infection in developing countries*, v. 9, n. 4, p. 368-372, 2015.
- 24 HAMMARSKJÖLD, F.;BERG, S.;HANBERGER, H.;TAXBRO, K.;MALMVALL, B.-E. Sustained low incidence of central venous catheter- related infections over six years in a Swedish hospital with an active central venous catheter team. *AJIC: American Journal of Infection Control*, v. 42, n. 2, p. 122-128, 2014.

- 25 LIESENFELD, O.;LEHMAN, L.;HUNFELD, K.-P.;KOST, G. Molecular diagnosis of sepsis: New aspects and recent developments. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 4, n. 1, p. 1-25, 2014.
- 26 KAASCH, A. J.;RIEG, S.;HELLMICH, M.;KERN, W. V.;SEIFERT, H. Differential time to positivity is not predictive for central line-related Staphylococcus aureus bloodstream infection in routine clinical care. *Journal of Infection*, v. 68, n. 1, p. 58-61, 2013.
- 27 GUIMARÃES, A. C.;DONALISIO, M. R.;SANTIAGO, T. H. R.;FREIRE, J. B. Óbitos associados à infecção hospitalar, ocorridos em um hospital geral de Sumaré-SP, Brasil. *Rev Bras Enferm*, v. 64, n. 5, p. 864-9, 2011.
- 28 RODRIGUES , M. X.;FELKL, G. S.;SAMULAK, R. L.;TENÓRIO, A. G.;BITTENCOURT, J. V. M. Obtaining DNA from Staphylococcus aureus: A study on DNA extraction methods for food matrices without bacterial isolation. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 2, p. 91-95, 2015.
- 29 DALLÉ, J.;KUPLIHC, N. M.;SANTOS, R. P. D.;SILVEIRA, D. T. Infecção relacionada a cateter venoso central após a implementação de um conjunto de medidas preventivas (bundle) em centro de terapia intensiva. *Rev HCPA*, v. 32, n. 1, p. 10-17, 2012.
- 30 MENDONÇA, S. H. F.;LACERDA, R. A. Impacto dos conectores sem agulhas na infecção da corrente sanguínea: revisão sistemática. *Acta Paul Enferm*, v. 23, n. 4, p. 568-73, 2010.
- 31 LIN, W.-P.;CHANG, Y.-C.;WU, U.-I.;HUNG, M.-C.;CHUANG, P.-Y.;WANG, J.-T. et al. Multimodal interventions for bundle implementation to decrease central line-associated bloodstream infections in adult intensive care units in a teaching hospital in Taiwan, 2009–2013. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2017/08/26/2017.
- 32 GAHLOT, R.;NIGAM, C.;KUMAR, V.;YADAV, G.;ANUPURBA, S. Catheter-related bloodstream infections. *Int J Crit Illn Inj Sci*, v. 4, n. 2, p. 162-7, Apr 2014.
- 33 ANVISA. *Boletim informativo sobre a Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde*. ANVISA, A. N. D. V. S.-. Brasília, Brasil. 1: 1-12 p. 2011.
- 34 _____. *Critérios Diagnósticos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. ANVISA. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2017.
- 35 MAKI, D. G.;WEISE, C. E.;SERAFIN, H. W. A semi-quantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New England Journal Medical*, v. 296, p. 1305-1309, 1977.
- 36 DALLA-COSTA, L. M.;MORELLO, L. G.;CONTE, D.;PEREIRA, L. A.;PALMEIRO, J. K.;AMBROSIO, A. et al. Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR. *J Microbiol Methods*, v. 140, p. 61-66, Sep 2017.
- 37 RIEDEL, S.;CARROLL, K. C. Early identification and treatment of pathogens in sepsis: molecular diagnostics and antibiotic choice. *Clin Chest Med*, v. 37, p. 191-207, 2016.

- 38 FURTADO, I. *Detecção por Reação em Cadeia da Polimerase de Enterococcus faecium e Enterococcus faecalis em Sangue de Recém-Nascidos*. 2011. 73 (master). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS.
- 39 SCHRADER, C.;SCHIELKE, A.;ELLERBROEK, L.;JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 5, p. 1014-1026, 2012.
- 40 WILLNER, D.;DALY, J.;WHILEY, D.;GRIMWOOD, K.;WAINWRIGHT, C. E.;HUGENHOLTZ, P. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. 1-12, 2012.
- 41 MIGLIOLI, A. M. D. *DNA genômico de Streptococos e Escherichia coli em sangue e aspirado traqueal e gástrico de recém-nascidos intubados imediatamente após o nascimento*. 2009. 81 (Doutorado). Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso Sul (UFMS), Campo Grande.
- 42 CAMBAU, E.;DURAND-ZALESKI, I.;BRETAGNE, S.;BRUN-BUISSON, C.;CORDONNIER, C.;DUVAL, X. et al. Performance and economic evaluation of the molecular detection of pathogens for patients with severe infections: the EVAMICA open-label, cluster-randomised, interventional crossover trial. *Intensive Care Med*, v. 43, n. 11, p. 1613-1625, Nov 2017.
- 43 BANERJEE, R.;TENG, C. B.;CUNNINGHAM, S. A.;IHDE, S. M.;STECKELBERG, J. M.;MORIARTY, J. P. et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction–Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. 7, p. 1071-1080, 2015.
- 44 FURTADO, I.;XAVIER, P. C. N.;TAVARES, L. V. M.;ALVES, F.;MARTINS, S. F.;MARTINS, A. D. S. et al. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in blood of newborns with suspected nosocomial infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 56, n. 1, p. 77-80, 2014.
- 45 DINC, F.;AKALIN, H.;OZAKIN, C.;SINIRTAS, M.;KEBABCI, N.;ISCIMEN, R. et al. Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis. *Minerva Anesthesiol*, v. 82, n. 3, p. 301-9, Mar 2016.
- 46 MINAS GERAIS, S. D. E. D. S. *Deliberação CIB-SUS/MG Nº 1.635, de 19 de novembro de 2013*. CIB-SUS/MG. Belo Horizonte 2013.
- 47 CLAASSEN, S.;TOIT, E. D.;KABA, M.;MOODLEY, C.;ZAR, H. J.;NICOL, M. P. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, v. 94, p. 103-110, 2013.
- 48 HERRMANN, B. G.;FRISCHAUF, A.-M. Isolation of genomic DNA. *Methods in enzymology*, v. 152, p. 180-183, 1987.
- 49 SAMBROOK, J.;FRITCSH, E.;MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. . 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3104

ANEXO

ANEXO A – Instrumento de Coleta de dados



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
DIAMANTINA – MINAS GERAIS

www.ufvjm.edu.br



COLETA DE DADOS DE PESQUISA

Pesquisa: DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM PONTA DE CATETER VENOSO CENTRAL POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Responsável: Profa. Maristela Oliveira Lara

Nome do paciente	
Sexo	
Prontuário:	Registro: Data de internação:
DN:	Idade:
Diagnóstico de internação	
Uso procedimentos invasivos	
Ventilação mecânica TOT ()	TQT ()
Nutrição enteral	()
Nutrição parenteral	()
Transfusão sanguínea	()
SVD	()
Dreno torácico	()
DVE	()
PIC	()
PIA	()
Diálise	()
Data da inserção do CVC	
Data de retirada do CVC	
Retirada devido suspeita de infecção relacionada ao CVC	() sim () não
Local de inserção: Subclávia D () E () Jugular interna D () E () Femoral D () E ()	
Comorbidades:	
Complicações:	
Precaução de contato:	
Resultado cultura de ponta de cateter	
Resultado de hemocultura	
Presença de sinais flogísticos no sítio do CVC	
Uso de ATB	
OBS:	

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI (FAFEID-UF)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS PATOGENICOS EM PONTA DE CATETER VENOSO CENTRAL POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERAS

Pesquisador: Maristela Oliveira Lara

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 43533115.3.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.092.481

Data da Relatoria: 16/06/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo epidemiológico corte transversal, que objetiva detectar sequências genômicas de 08 espécies de microrganismos comuns em infecção de corrente sanguínea por cateter venoso central (CVC) baseado em evidências que este método tem rapidez e sensibilidade adequadas. Os cateteres removidos de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de Adultos de um hospital filantrópico com suspeita de infecção da corrente sanguínea serão submetidos a extração de DNA do material biológico contido no interior do lúmen dos mesmos e procederá a identificação dos microrganismos por reação em cadeia da polimerase. O hospital em que será realizado o estudo utiliza-se da hemocultura para diagnóstico laboratorial de infecção da corrente sanguínea associada ao cateter. Os resultados encontrados na análise por biologia molecular serão comparados com os resultados das hemoculturas realizadas na rotina hospitalar dos casos suspeitos de infecção. Procederá ainda o levantamento em prontuário de dados dos pacientes, tais: sexo, idade, peso, diagnóstico de internação, uso de outros dispositivos invasivos, tempo de permanência e local de inserção do CVC. Na análise dos dados será utilizado teste não paramétrico Qui-quadrado e estatística descritiva.

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000

Bairro: Alto da Jacuba

CEP: 39.100-000

UF: MG

Município: DIAMANTINA

Telefone: (38)3532-1240

Fax: (38)3532-1200

E-mail: cep@ufvjm.edu.br

Continuação do Parecer: 1.092.481

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar microrganismos patogênicos em ponta de cateter venoso central pela reação em cadeia da polimerase.

Objetivo Secundário:

Detectar as seqüências genômicas dos microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Enterobacter sp*, por reação em cadeia da polimerase, extraído da ponta de cateteres centrais de pacientes com suspeita de infecção, internados na UTI de um hospital filantrópico no interior de Minas Gerais. - Identificar a especificidade e sensibilidade da reação em cadeia da polimerase microrganismos comuns em infecção da corrente sanguínea devido ao uso do cateter central de pacientes com suspeita de infecção, internados na UTI de um hospital filantrópico. - Identificar os casos de hemoculturas positivas para os gêneros pesquisados - Comparar entre os resultados das análises das hemoculturas realizadas pelo hospital dos pacientes em relação ao PCR da ponta de cateter - Caracterizar a população estudada quanto ao sexo, idade, peso, diagnóstico de internação, outros dispositivos invasivos, tempo de permanência e local de inserção do CVC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados. Os pesquisadores não irão manipular ou retirar cateter do paciente. Somente profissionais de saúde do setor de internação é que irão retirar os cateteres. No que diz respeito ao prontuário, os pesquisadores afirmam que o risco envolvido pode estar associado ao constrangimento do paciente em saber que outros profissionais que não trabalham na Unidade de Terapia Intensiva estarão cientes da sua doença de base, do uso de medicamentos e do motivo da retirada do cateter por exemplo. Esse risco será minimizado pela garantia de total anonimato em relação às informações e em nenhuma hipótese os sujeitos da pesquisa serão identificados.

Os resultados desta pesquisa promoverão identificação dos microrganismos comuns nas infecções da corrente sanguínea deste serviço de terapia intensiva, permitindo aos profissionais de saúde compreensão a cerca do tema. Apontará o perfil de casos de infecção associadas a cateter e possibilitará a comparação da técnica de PCR com a utilizada atualmente na instituição, a hemocultura. Além disso, possibilita o aumento das tecnologias para realização de protocolos validados relativos à segurança dos cateteres venosos centrais e novas técnicas diagnósticas. A identificação de microrganismos poderá guiar ainda a avaliação de eventos adversos que afetam a

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba CEP: 39.100-000
UF: MG Município: DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 Fax: (38)3532-1200 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

Continuação do Parecer: 1.092.481

saúde e a tomada de decisão relativa à escolha da melhor terapia. Para os usuários favorece menor tempo de diagnóstico de infecção, menor tempo de internação, evita complicações no estado de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão recolhidos os cateteres venosos centrais dos pacientes internados no Centro de Terapia Intensiva de um hospital filantrópico do interior de Minas Gerais após sua remoção com indicação médica de acordo com protocolo da instituição, por suspeita de infecção hospitalar durante 6 meses, após aprovação do Comitê de ética e anuência da instituição envolvida. Dessa forma, quem fará a remoção dos cateteres do paciente serão os médicos ou profissional enfermeiro preparado da Unidade de Terapia Intensiva de acordo com a rotina. Após retirada, será cortado 5 centímetros da ponta do cateter e colocado em um recipiente de vidro, estéril com tampa disponibilizado pela pesquisadora para a equipe da UTI até que a mesma possa recolhê-lo. Somente esses 5 centímetros serão destinados a análise que se pretende neste projeto. Não haverá necessidade de acondicionamento especial ou imersão em substâncias. A enfermeira do setor entrará em contato a pesquisadora avisando do recolhimento do cateter. O restante do cateter estará disponível para ao serviço para o destino que desejarem, desprezo em lixo próprio ou outro tipo de análise como cultura de ponta de cateter. Os dados dos pacientes serão coletados em seu prontuário, sendo esses: sexo, idade, diagnóstico de internação, outros dispositivos invasivos, tempo de permanência e local de inserção do CVC. Em relação ao teste de hemocultura a qual pretendesse fazer comparação ao resultado do PCR, a coleta da amostra, processamento e análise do material (sangue) será feita pelo hospital, seguindo sua rotina de exames laboratoriais e equipe própria, sob solicitação médica. Ressalta-se que esse procedimento faz parte do protocolo assistencial em casos suspeitos de infecção da corrente sanguínea e que este projeto não propõe fazer hemocultura, somente comparar os resultados das hemoculturas realizadas com os de PCR pesquisados. Outro detalhe é que a coleta de sangue para hemocultura é feita em acesso venoso periférico diferente do acesso venoso central onde se encontra o cateter que iremos analisar, também seguindo protocolo da instituição em estudo. O total de sujeitos da pesquisa será obtido por meio de amostra por conveniência no período de 6 meses. Cabe ressaltar que a pesquisa terá início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. O DNA genômico será extraído da lavagem da ponta do cateter onde se encontram os sedimentos celulares em 250 uL de solução I (50 mM de glucose , 25 mM de Tris - HCl, pH 8,0 , e

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba CEP: 39.100-000
UF: MG Município: DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 Fax: (38)3532-1200 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

Continuação do Parecer: 1.092.481

EDTA 10 mM). As células serão lisadas por adição de 25 ul de solução II [NaOH 200 mM e 1 % (w / v) de SDS] , e misturou-se durante 5 min. Em seguida , 500 ul de solução de Eu e 2,5 ul de RNase A (10 mg / ml). O DNA é então purificado com fenol - cloretos utilizando um protocolo padrão de laboratório do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); e após a precipitação, o DNA foi re suspenso em 30 ul de TE (10 mM Tris - HCl pH 8,0 e EDTA 1 mM) . Os isolados bacterianos serão identificados por sequenciação de rDNA (FACCHIN et al, 2013). A reacção PCR será realizada utilizando os iniciadores específicos para cada microrganismo. As amostras de sangue para hemocultura serão colhidas de rotina pelo Serviço de Laboratório do hospital em estudo, mediante solicitação médica, nos casos de suspeita de infecção dos da corrente sanguínea, onde serão processados e analisados pelo sistema local, sendo os resultados comparados com os obtidos por este estudo. Esse exame faz parte da rotina hospitalar e não do estudo proposto, portanto não é de responsabilidade dos

pesquisadores. A análise de prontuários será feita através dos dados coletados: sexo, idade, diagnóstico de internação, outros dispositivos invasivos, tempo de permanência e local de inserção do CVC.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos no estudo os pacientes do Centro de Terapia Intensiva Adulto de um Hospital filantrópico do interior de Minas Gerais, com pelo menos 72 horas de internação, no período de 6 meses no ano de 2015.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos os casos em que quais os pacientes não estavam em uso de CVC, os pacientes em uso de CVC sem suspeita de infecção hospitalar e os pacientes ou responsáveis que não assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido.

Metodologia de análise dos dados:

A comparação entre os resultados das análises das hemoculturas dos pacientes serão avaliados em relação ao PCR da ponta de cateter, por meio do teste não paramétrico Qui-quadrado com tabela de contingência 2x2 com células de valor maior que 5. Os demais resultados as variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de gráficos. A análise estatística será realizada utilizando-se o "Software" Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 20.0, considerando diferenças significativas quando o valor de "p" for menor que 0,05. Plano de divulgação dos resultados Os resultados desta pesquisa, sejam eles favoráveis ou não, serão divulgados por meios científicos adequados (artigos, congressos)

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba CEP: 39.100-000
UF: MG Município: DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 Fax: (38)3532-1200 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

Continuação do Parecer: 1.092.481

resguardados os critérios éticos da pesquisa em saúde. Não há acordo pré-existente quanto à propriedade das informações geradas, que serão tornadas públicas nos meios científicos adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado o Projeto de Pesquisa, Folha de Rosto, Cronograma, TCLE, carta de concordância dos setores com assinatura dos responsáveis e Carta da Instituição copartícipe. O TCLE está adequado (informações necessárias para os sujeitos da pesquisa, linguagem acessível e contato do CEP/UFVJM atualizado, conforme a Resolução 466/12).

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também por sua assinatura na última página do referido termo.
- Relatório final deve ser apresentado ao CEP ao término do estudo em 01/07/2016. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

DIAMANTINA, 03 de Junho de 2015

Assinado por:
Disney Oliver Sivieri Junior
(Coordenador)

Endereço: Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba CEP: 39.100-000
UF: MG Município: DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 Fax: (38)3532-1200 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

ANEXO C – Ata da qualificação



ATA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DA ALUNA

MARISTELA OLIVEIRA LARA

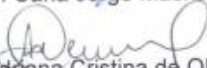
Realizou-se, no dia 22 de julho de 2016, às 14:00 horas, sala 029, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a apresentação do exame de qualificação da aluna **MARISTELA OLIVEIRA LARA**, número de registro 2014651676, intitulado **DETECÇÃO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE**, perante a Comissão Examinadora composta pelos professores: Prof(a). Carla Jorge Machado - Orientador (UFMG), Prof(a). Adriana Cristina de Oliveira (UFMG), Prof(a). Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo (UFVJM), Prof(a). Thabata Coaglio Lucas (UFJVM). Terminada a apresentação, foi considerada:

aprovada

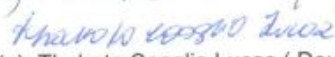
reprovada

e, para constar, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.


Prof(a). Carla Jorge Machado (Doutora)


Prof(a). Adriana Cristina de Oliveira (Doutora)


Prof(a). Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo (Doutor)


Prof(a). Thabata Coaglio Lucas (Doutora)

ANEXO D – Aceite da revista

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - Decision on Manuscript ID RSBMT-2017-0352.R1

Dalmo Correia <onbehalf@manuscriptcentral.com>

qui 01/03/2018 20:20

Para:maryslara@hotmail.com <maryslara@hotmail.com>;

Cc:maryslara@hotmail.com <maryslara@hotmail.com>; thabataclucas@gmail.com <thabataclucas@gmail.com>; kalapothakis@gmail.com <kalapothakis@gmail.com>; ronaldothomasini@gmail.com <ronaldothomasini@gmail.com>; carlajm@ufmg.com <carlajm@ufmg.com>;

01-Mar-2018

Dear Prof. LARA:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Comparison of five methods of extraction Staphylococcus aureus DNA for molecular detection by PCR" in its current form for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Dalmo Correia
Editor-in-Chief, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine
dalmo@rsbmt.ufmg.edu.br