

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia

Doutorado em Cirurgia

Clandio de Freitas Dutra

**INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS EM STENTS DE NITINOL
REVESTIDOS COM PTFE_e OU DACRON® NA AORTA DE SUÍNOS**

Porto Alegre

2008

Clandio de Freitas Dutra

**INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS EM STENTS DE NITINOL
REVESTIDOS COM PTFEe OU DACRON® NA AORTA DE SUÍNOS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Cirúrgicas pelo Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira

Porto Alegre

2008

CIP - Catalogação na Publicação

Dutra, Clandio de Freitas
Infecção de stents de nitinol revestidos com
Politetrafluoretileno expandido e Dacron com
Staphylococcus epidermidis: estudo experimental em
suínos / Clandio de Freitas Dutra. -- 2008.
47 f.
Orientador: Adamastor Humberto Pereira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2008.

1. Stents. 2. Staphylococcus epidermidis. 3.
Infecção . 4. Aorta. 5. Suínos. I. Pereira, Adamastor
Humberto, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Clandio de Freitas Dutra

**INFECÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS EM STENTS DE NITINOL
REVESTIDOS COM PTFEe OU DACRON® NA AORTA DE SUÍNOS**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do título de doutor em Ciências
Cirúrgicas pelo Programa de Pós-graduação em
Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Adamastor Humberto
Pereira

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado da Costa

Instituição do orientador: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dr. Orlando Belmonte Wender

Instituição do membro da banca: UFRGS

Prof. Dr. Walter José Koff

Instituição do membro da banca: UFRGS

Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruehl

Instituição do membro da banca: UFRGS

Aprovada em: Porto Alegre, 22 de dezembro de 2008.

À minha esposa Sandra, pelo amor e dedicação,
e minhas filhas Bruna e Luana, por
proporcionarem alegria em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adamastor Humberto Pereira pela orientação neste trabalho, pela confiança e a oportunidade de prosseguir na carreira científica.

Aos Professores do Serviço de Cirurgia Vasculuar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Prof. Dr. Gilberto Gonçalves de Souza Prof. Dr. Luiz Francisco Costa e pela receptividade e acolhimento.

Aos Professores do Curso de pós-graduação da UFRGS, em especial ao Dr. Cléber Dario Pinto Krueel e ao Dr. Walter José Koff pela avaliação criteriosa da Tese.

À Sandra Valduga Dutra, pelo apoio e dedicação dispensados para a realização desta pesquisa.

Ao Biotério da Universidade de Caxias do Sul, na pessoa do Dr. Celso Piccoli Coelho pela oportunidade de poder realizar o experimento em Caxias do Sul, e à Sra. Neli e Sr. Antônio pelo apoio técnico.

Aos funcionários do laboratório Fleming de Caxias do Sul, em especial à Farmacêutica e Bioquímica Juçara Canalli.

Ao Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, principalmente ao auxílio dispensado na parte estatística da Srta. Vânia Naomi Hirakata.

Ao Prof. Eduardo Pretto Serafini, pela ajuda na área de patologia.

Aos Professores Dr. Francisco Schreiner e Dra. Claudia Wolheinn pela ajuda com a metodologia e microbiologia.

Ao Prof. Dr. Lírio Scheifer e aos Engenheiro Sr. Fábio Knewitz do Laboratório de Transformação Mecânica da Universidade Federal Luciano da Silva Duarte, pela confecção dos *stents*, e ao Eng. Sr. Paulo Sanches, pela esterilização e embalagem dos *stents*, pela disponibilidade e rapidez de quando solicitados na entrega dos *stents*.

Aos médicos veterinários Dr. Ricardo Bordin, pelo auxílio na parte de anestesia veterinária, e à Dra. Tatiana Lizot, pelo fornecimento de referências bibliográficas.

À Prof^ª. Sandra Oliveira, pelo auxílio na revisão ortográfica dessa Tese.

Aos alunos do Curso de Medicina da Universidade de Caxias do Sul: Henrique Nonemacher, Rodrigo Pongiluppi, Roberto Taboada Fellini e Sérgio Ventura Gomes Junior pela ajuda incansável na cirurgia experimental.

Enfim a todas as pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que eu realizasse este trabalho.

O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem a sua própria razão de existir.

Albert Einstein

RESUMO

O tratamento endovascular com a utilização de *stents* e endopróteses revestidas tem aumentado de forma significativa e vários relatos de infecção de *stents* revestidos são encontrados na literatura, tornando-se uma importante complicação do tratamento endovascular. Algumas cepas de *Staphylococcus epidermidis* produtoras de biofilmes podem colonizar e infectar esses dispositivos implantados no sistema vascular. Foi realizado um estudo experimental randomizado para avaliar a infecção na aorta de suínos após implante de *stents* de nitinol revestidos com PTFEe ou Dacron®, contaminados com uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* produtora de biofilme. Através de acesso extra-peritoneal, 19 suínos foram submetidos a implante de *stents* de nitinol, 10 revestidos com PTFEe e 09 com Dacron®, previamente contaminados com *Staphylococcus epidermidis*. Após duas semanas as aortas com os *stents* foram retiradas, seccionadas onde foi verificada a perviedade. O complexo aorta-*stent* foi agitado em vórtex e ultra-som, para remoção do biofilme e análise microbiológica quantitativa com avaliação do número de unidades formadoras de colônias. Os tecidos das bordas proximais e distais foram analisados por histopatologia. Os dados foram analisados estatisticamente em programa SPSS for windows 15.0. Não houve diferença estatística significativa entre os tipos de *stents* revestidos, em relação aos números de unidades formadoras de colônias e reação inflamatória na parede arterial. Todos os complexos aorta-*stent* apresentaram cultura positiva para *Staphylococcus epidermidis*, exceto um complexo aorta-*stent* revestido com Dacron®, que apresentou cultura negativa. Dois suínos foram ao óbito, um com *stent* revestido com PTFEe devido a trombose do *stent*, e outro, revestido com Dacron®, no trans-operatório por perfuração aórtica. Todos os demais *stents* estavam pérvios no final do experimento. Não houve diferença entre os *stents* de nitinol revestidos com PTFEe ou Dacron®, na infecção de aorta de suínos por *Staphylococcus epidermidis*.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, infecção, *stents*, aorta, suínos.

ABSTRACT

Endovascular treatments using coated endoprotheses have become significantly more frequent. Several studies found infection on coated and non-coated stents, an important complication of endovascular treatment. Some *Staphylococcus epidermidis* strains may produce biofilm and infect vascular implants. To evaluate infection in swine aorta after implanting PTFEe- or Dacron®-coated nitinol stents previously infected with a biofilm-producing strain of *Staphylococcus epidermidis*. Using an extra peritoneal access, 19 pigs received PTFEe-coated nitinol stent implants, and 9, Dacron®-coated stents, all previously infected with a biofilm-producing strain of *Staphylococcus epidermidis*. Two weeks later, aortas with stents were removed and sectioned, and their patency was evaluated. The aorta-stent specimens were vortex mixed and exposed to ultrasound to remove the biofilm; a quantitative microbiological analysis was performed, and the number of colony forming units was determined. The proximal and distal border tissues underwent histopathological examination. The SPSS program for Windows 15.0 was used for statistical analysis. No significant statistical differences were found between the types of coated stents in number of colony forming units or inflammatory response of arterial walls. All aorta-stent samples were positive for *Staphylococcus epidermidis*, except one that was coated with Dacron®. Two sows died before the end of the experiment; one had a PTFEe-coated stent and died due to stent thrombosis; the other had a Dacron®-coated stent and died during operation because of arterial perforation. All the other stents were patent at the end of the experiment. No significant differences were found between PTFEe- and Dacron®-coated nitinol stents in infection of the swine aorta with *Staphylococcus epidermidis*.

Keywords: *Staphylococcus epidermidis*, infection, stents, aorta, pigs.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso, temperatura pré operatória, Tempo cirurgia, VHS e PCR.....	33
Tabela 2. Valores de hemograma, leucograma e plaquetas no pré e pós-operatório..	34
Tabela 3. Valores de hemograma, leucograma e plaquetas no pré-operatório.....	34
Tabela 4. Valores de peso, VHS e PCR no pré e pós-operatório.....	35
Tabela 5. Cultura quantitativa de Staphylococcus epidermidis (UFC/mL) nos complexos aorta-stent.....	35
Tabela 6. Análise histopatológica das bordas proximal e distal da aorta após implante de stents revestidos com Dacron® e PTFEe.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISAO DE LITERATURA	13
2.1 INFECÇÃO EM PRÓTESES VASCULARES E ENDOVASCULARES.....	13
2.2 ESTUDOS EXPERIMENTAIS COM ENDOPRÓTESES.....	14
2.3. <i>S. EPIDERMIDIS</i> E BIOFILMES: IMPORTÂNCIA CLÍNICA.....	15
2.4 CARACTERÍSTICAS DOS BIOFILMES.....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 – PROJETO PILOTO	17
3.2 – SELEÇÃO DO ISOLADO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE NEGATIVO PRODUTOR DE BIOFILME	17
3.3 - CONTAMINAÇÃO DAS PRÓTESES	19
3.4 - ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS PRÓTESES	19
3.5 – TIPOS DE <i>STENTS</i> UTILIZADOS	19
3.6 - MODELO SUÍNO	20
3.7 - IMPLANTE E RETIRADA DOS <i>STENTS</i>	20
3.8 - TÉCNICA ANESTÉSICA.....	20
3.9 TÉCNICA CIRÚRGICA.....	21
3.10 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	22
3.11 PREPARO DO TECIDO PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	23
3.12 PREPARO DOS TECIDOS PARA ANÁLISE CULTURAL	23
4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	24
5. HIPÓTESE	27
6 OBJETIVO	28
7 RESULTADOS	29
7.1 ARTIGO ORIGINAL EM LINGUA PORTUGUESA.	29
8 ARTIGO EM INGLÊS	40

1 INTRODUÇÃO

O tratamento endovascular com a utilização de *stents* e endopróteses tem aumentado de forma significativa. Dados da literatura citam apenas relatos de infecção em *stents* e endopróteses, referindo-se como uma importante complicação do tratamento endovascular, com elevados índices de amputação e morte. Na maioria dos casos de infecção desses dispositivos, o cirurgião deve ter uma conduta determinada, para a resolução do caso, seja através de antibióticos sistêmicos de amplo espectro e explante da endoprótese.

A patogênese das infecções de endopróteses, geralmente, é multi-fatorial: se for precoce, ocorre devido a quebra da esterilidade durante o implante, ou pela colonização do trombo do aneurisma, ou translocação bacteriana durante o procedimento cirúrgico. Tardamente pode ser por disseminação hematogênica, ou infecção do trato urinário ou respiratório.

Em relação ao tipo de revestimento das endopróteses, temos o PTFEe (Politetrafluoretileno expandido) e o Dacron®. Qual tipo de revestimento suporta mais a infecção, é uma pergunta que não há resposta até o momento.

O *Staphylococcus epidermidis* é um dos patógenos mais freqüentes nas infecções de dispositivos implantados no sistema vascular. O diagnóstico de infecção em endoproteses é usualmente relacionado aos achados clínicos, estudo de imagem e exames microbiológicos.

O diagnóstico preciso da infecção, nem sempre é possível, pois algumas cepas de *Staphylococcus epidermidis* produzem biofilme. Cepas produtoras de biofilme têm a capacidade de aderir e colonizar materiais sintéticos, dificultando seu isolamento nas culturas convencionais.

Em relação ao tipo de métodos de cultura que são utilizadas há diferentes métodos de culturas quantitativas. Devido, inúmeras cepas de bactérias, produzirem biofilmes, nem sempre é possível o isolamento destas, e a sonificação dos tecidos explantados demonstrou um importante aumento no isolamento desses patógenos.

O objetivo deste estudo é avaliar dois tipos de endopróteses revestidas com Dacron® e PTFEe (Politetrafluoretileno expandido), infectadas com *Staphylococcus epidermidis*, verificando através de análise cultural quantitativa, em qual ocorre menor número de unidades formadoras de colônias, e menor resposta inflamatória da parede aórtica, além de verificação da perviedade e complicações decorrentes da cirurgia e da infecção.

2 REVISAO DE LITERATURA

A resistência das artérias à infecção depende da interação entre a parede arterial e o *stent* ou endoprótese implantada. Essa parede arterial é composta pelo seu endotélio, parede muscular, *vasa vasorum* e linfáticos perivasculares e o sangue circulante. O sangue circulante no lúmen arterial e na *vasa vasorum* abastece a defesa do organismo e com leucócitos, anticorpos, complemento e proteínas da coagulação. Quando estimulada por fatores quimiotáticos, os leucócitos ficam aptos para aderir às células endoteliais e migrar através do endotélio para camadas mais profundas da parede arterial com o objetivo de atacar as bactérias.¹

2.1 Infecção em próteses vasculares e endovasculares

Bactérias estão presentes no trombo aneurismático em 14 a 37% dos casos, baseados em estudos bacteriológico do trombo aneurismático, e é inevitável que o dispositivo intravascular entre em contato com esses germens. Embora somente 10% ou menos desses trombos contaminados, possam tornar-se infectados no tratamento convencional do aneurisma, na cirurgia endovascular esse número poderá ser superior devido a permanência do trombo.²

O primeiro caso de infecção em um *stent* foi relatado por Chalmers *et al.*³, em 1993. Diversos relatos de casos de infecção em *stents* e endopróteses são encontrados na literatura.⁴⁻⁹

A aderência bacteriana depende diretamente da extensão da endoprótese aplicada contra a parede arterial durante o procedimento cirúrgico e da endotelização da superfície da endoprótese. A baixa frequência de infecção se deve a fatores como o tempo curto de follow-up devido ao alto risco cirúrgico dos pacientes que apresentam uma baixa expectativa de vida.¹⁰

Existe um número de casos relativamente pequenos de infecção em *stents*, sugerindo que esse número seja baixo em relação ao número de *stents* implantados. De uma série de 15 casos, houve relato de 3 mortes. *Staphylococcus aureus* é o

patógeno mais freqüente envolvido nas infecções dos *stents* e a bacteremia remota é o maior fator de risco para o desenvolvimento dessa infecção e tem sido associada com cateteres intravasculares, angioplastias devido a re-estenose e infusões intravenosas. Em trabalhos experimentais^{11,12} demonstraram que *stents* expansíveis por balão tornam-se infectados até 3 semanas após o implante quando expostos a um inóculo de *Staphylococcus aureus*. Não sabemos se o risco de infecção diminui com o tempo, pois há relatos de infecção em mais de 6 meses após o implante de *stents* em seres humanos, onde em teoria *stent* já estaria endotelizado e incorporado a parede arterial.

Infecção de *stents* por *S. epidermidis* tem sido relatada, provavelmente, devido a introdução dessa bactéria no momento do implante do *stent*.¹³

O quadro clínico de uma infecção em *stent* é dor localizada, edema, eritema no membro afetado. Pode ocorrer embolização distal, redução de pulsos e muitas vezes isquemia arterial. Sintomas sistêmicos como: febre, calafrios e sudorese são comuns e até mesmo choque séptico pode ocorrer. Se há ruptura arterial devido a uma arterite infecciosa, poderá ocorrer dor severa e hipovolemia, complicando o quadro.

O termo *stentocarditis* foi utilizado pela primeira vez por Rensing, em 2000, em relato de caso, no quarto dia pós-operatório de implante de três *stents* coronarianos, o paciente apresentou quadro infeccioso. As hemoculturas foram positivas para *Staphylococcus aureus*. Na angiotomografia foram evidenciados oclusão e abscesso envolvendo o *stent*, houve resolução do quadro após seis semanas de antibioticoterapia sistêmica.¹⁴

O reparo convencional do aneurisma de aorta tem uma taxa de infecção que varia de 0,8% a 1,6%. A taxa de infecção do tratamento endovascular foi estimada por Ducasse *et al.*, 2004 em 0,43% baseado no relato da literatura de 42 casos no total de 9739 tratamentos endovasculares de aneurisma de aorta, embora os autores acreditam que essa percentagem esteja subestimada devido aos casos de pacientes de alto risco que foram ao óbito em curto prazo.¹⁵

2.2 Estudos Experimentais com Endopróteses

Thibodeaux et al.¹² compararam em dez suínos a angioplastia versus implante de *stent* na artéria ilíaca contralateral. O *Staphylococcus aureus* foi infundido na aorta logo após o implante do *stent* ou da angioplastia nas artérias ilíacas. Um grupo de cinco suínos foram sacrificados em 72 horas e 80% das culturas foram positivas, e outro grupo de cinco suínos que foram sacrificados em 3 semanas onde 60% das culturas foram positivas.

Parsons et al.¹⁶ compararam a infecção por *Staphylococcus aureus* em aorta de cães entre cirurgia convencional (prótese de PTFEe) e endovascular (*stent* revestido com PTFEe). Os *stents* revestidos são mais susceptíveis a infecção que a cirurgia convencional.

Kirksey et al.¹⁷ através de um modelo experimental em cães, ilustra a suscetibilidade do *stent-graft* a infecção, que acontece, geralmente, antes de ocorrer a formação de pseudo-íntima.

2.3. *S. epidermidis* e biofilmes: importância clínica.

Os *Staphylococcus* estão divididos em dois grupos de acordo com a sua habilidade de coagular o plasma fresco citratado: *Staphylococcus* coagulase positivo, principalmente *S. aureus*; e *Staphylococcus* coagulase negativo, composto por trinta e duas espécies identificadas até hoje, entre as quais se encontra *S. epidermidis*. Os *Staphylococcus* coagulase negativo, em especial o *Staphylococcus epidermidis*, são bactérias esféricas, imóveis, não esporuladas, gram-positivas e anaeróbias facultativas. Possuem de 0,5 a 1,5µm de diâmetro, dispostas isoladas, em pares, em tétrades, cadeias curtas ou em aglomerados. Os *Staphylococcus* coagulase negativo são amplamente distribuídos na superfície corporal, onde constituem a maioria da microflora das bactérias comensais. Entre as bactérias coagulase-negativo, o *S. epidermidis* é a espécie isolada com maior frequência, e responsável pela maioria das infecções. No passado eram considerados não patogênicos e seu isolamento era atribuído por contaminação dos espécimes. Contudo, esses microorganismos freqüentemente contaminam sangue e outros espécimes clínicos, assim tornando difícil distinguir entre contaminação e infecção.¹⁸

2.4 Características dos biofilmes

Os biofilmes foram descritos por Antonie van Leeuwenhoek, no século XVII, mas a teoria do processo de formação dos biofilmes só foi aceita a partir de 1978. Atualmente os biofilmes são universais, ocorrendo em materiais aquáticos e sistema de água industrial, assim como um grande número de dispositivos médicos e ambientes relevantes em saúde pública. Os pesquisadores estão utilizando instrumentos como: microscopia eletrônica e, mais recentemente, microscopia com scanner a laser. Os biofilmes não são desestruturados, mas são depósitos homogêneos de células e mucina. São comunidades complexas de células estreitamente associadas a uma superfície em meio a uma matriz de polímero contendo canais de água. Os microorganismos que crescem em meio ao biofilme são altamente resistentes aos agentes antimicrobianos por meio de diversos mecanismos.¹⁹

Os microrganismos que produzem biofilmes têm sido associados com várias doenças em seres humanos, como endocardite em valvas nativas, infecção em pacientes com fibrose cística e colonizar uma ampla variedade de dispositivos médicos. Apesar de evidências epidemiológicas de que os biofilmes sejam fontes de várias doenças infecciosas, o mecanismo exato pelo qual os microorganismos associados aos biofilmes desenvolvem a doença são pouco conhecidos. Depósito ou agregado de células, produção de endotoxina, aumentou a resistência ao sistema imune do hospedeiro e fornecimentos de um nicho para geração de organismos resistentes estão entre as diversas maneiras com que os biofilmes podem iniciar o processo de uma doença. Estratégias efetivas, para prevenir e controlar os biofilmes em dispositivos médicos devem ser tomadas levando em conta a natureza dos biofilmes. As estratégias para intervir e prevenir a colonização nos dispositivos, minimizando a fixação das células bacterianas em dispositivos médicos, penetrando na matriz e matando as células associadas ao biofilme, ou removendo o dispositivo do paciente. No futuro, os tratamentos serão baseados na inibição dos genes envolvidos na fixação e formação do biofilme.²⁰

Os biofilmes encontrados em cateteres são produzidos geralmente por bactérias gram-positivas, gram-negativas ou fungos. As bactérias comumente isoladas destes cateteres incluem os gram-positivos: *Enterococcus faecalis*,

Staphylococcus aureus, *S. epidermidis* e *Streptococcus viridans*; e os gram-negativos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes organismos podem ser originados da pele do próprio paciente, do manuseio dos profissionais da saúde, água da torneira ou outras fontes no ambiente. Biofilmes podem ser compostos de uma única ou de múltiplas espécies, dependendo do cateter e do tempo de uso no paciente.¹⁹

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Direção do Centro de Ciências Básicas e da Saúde, da Universidade de Caxias do Sul (UCS), para a avaliação dos componentes éticos envolvidos nesse estudo.

O estudo experimental foi realizado, no Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Patologia e Biotério, da UCS. As análises microbiológicas e laboratoriais, no Laboratório Fleming de Caxias do Sul.

3.1 – Projeto Piloto

Um projeto piloto foi realizado para avaliar se o experimento era factível. Nesse estudo foi determinada a cepa de *S. epidermidis* a ser utilizada, número de unidades formadoras de colônias e o tempo de permanência dos *stents* no caldo de cultura através de um estudo “*in vitro*”. A amostra do estudo piloto consistiu de 10 suínos.

3.2 – Seleção do isolado de *staphylococcus* coagulase negativo produtor de biofilme

Para determinar quais cepas seriam produtoras de biofilme foi realizado um estudo *in vitro*. O isolado de *Staphylococcus* coagulase negativo produtor de biofilme foi selecionado de uma amostra de 16 culturas em ágar-sangue de ponta de cateter periférico provenientes de pacientes hospitalizados, positivas para essa bactéria com >50 UFC (unidades de formação de colônias). No Laboratório de Microbiologia Médica Humana da Universidade de Caxias do Sul (Micr/UCS) foi repetida a identificação, utilizando-se provas convencionais, sendo todos caracterizados por colônias puntiformes, esbranquiçadas, não-hemolíticas, constituídas de cocos Gram-positivos aglomerados, anaeróbios facultativos e catalase, coagulase e DNase negativos.

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo metodologia usual descrita por Heilmann et al.²¹ e pela observação macroscópica de biofilme em superfície de lâmina de vidro e segmentos de próteses de Dacron® e PTFEe segundo Cucarella et al.²²

No primeiro método, os isolados bacterianos foram cultivados por 18h em 3mL de caldo TSB (*tryptic soy agar*, Merck®) à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ suplementado com 0,25% de glicose e posteriormente, após uma diluição de 1:200, 200 μL transferidos para os poços de microplacas de poliestireno e incubados por 24h à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período e lavagem cuidadosa por três vezes com solução salina fosfatada tamponada (PBS) esterilizada, a placa foi invertida até secagem, corada com fucsina diluída por 1min, e novamente lavada com tampão PBS. A formação de biofilme foi avaliada visualmente e cada isolado foi feito em triplicata (Figura 1).

Na segunda metodologia, os isolados foram cultivados em tubos de ensaio com 10mL de caldo TSB suplementado com 0,25% de glicose, mantidos em posição inclinada, junto com uma lâmina de vidro (7,5 x 1,2cm), e incubados por 48h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, as lâminas foram lavadas com tampão PBS, secas, coradas com fucsina diluída por 1min e após uma nova lavagem, realizada a avaliação macroscópica de biofilme (Figura 2).

De acordo com os resultados, 05 (31,3%) isolados de *Staphylococcus* coagulase negativo foram produtores de biofilme, sendo escolhido para o seguimento do trabalho, aquele que apresentou grande formação de biofilme nas duas metodologias empregadas. O isolado foi armazenado a -20°C no banco de microrganismos do laboratório (Micr/UCS) após caracterização do seu perfil de suscetibilidade pelo método de disco-difusão e padronização do CLSI (2007), como

resistente a penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina e gentamicina e sensível a cefoxitina, cloranfenicol, azitromicina e vancomicina.

3.3 - Contaminação das próteses

O isolado de *Staphylococcus* coagulase negativo produtor de biofilme foi cultivado em 3mL de TSB suplementado com 1,0% de glicose e incubado por 18h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Após realizou-se uma diluição em 50mL de TSB suplementado, até atingir a concentração de $10^4 - 10^5$ UFC/mL através de uma câmara de contagem, sendo as duas próteses submersas e incubadas por 1h à $35 \pm 1^\circ\text{C}$. As próteses foram retiradas, lavadas com solução fisiológica estéril e transportadas em tubos de ensaio em nova solução.

3.4 - Análise microbiológica das próteses

As próteses foram encaminhadas ao laboratório, submersas em 2mL de solução fisiológica estéril, homogeneizadas em agitador tipo “vortex” por 1 minuto e ultra-som por 5 minutos, em seguida mais 1 minuto no vórtex. Procedeu-se a cultura quantitativa pelo método das diluições de 1:10, 1:100 e 1:000, semeados 100 μ L em ágar sangue (BioMérieux®) pelo método de estiramento do inóculo e incubada por 48h à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em atmosfera de microaerofilia e posterior identificação e contagem das colônias.

3.5 – Tipos de *stents* utilizados

Os *stents* revestidos com Dacron® ou PTFEe, mediam 8mm de diâmetro e 25mm de extensão e foram confeccionados pelo Laboratório de Transformação

Mecânica da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com base nos *stents* da Fábrica ELLA-CS® -Dr. Karel Volenec.

3.6 - Modelo suíno

Foram utilizados 19 suínos da raça mista Large White X Landrace, do sexo feminino, com idade aproximada de oito semanas, pesando entre 11,9 e 24,6kg. O número de animais foi determinado através de avaliação estatística e baseado nos experimentos realizados por Parsons et al.¹⁶ Os suínos não receberam antibiótico profilático.

3.7 - Implante e retirada dos *stents*

Os suínos, com aproximadamente oito semanas de idade, foram pré-anestesiados, pesados e identificados. Após foram anestesiados e realizados o procedimento cirúrgico, coleta do sangue, implante dos *stents* na aorta infrarenal, síntese da arteriotomia, síntese por planos.

3.8 - Técnica Anestésica

Os animais foram submetidos a um jejum alimentar de: 12 horas - dieta sólida; 4 horas - dieta líquida. A técnica utilizada foi anestesia geral inalatória, utilizando-se um sistema semifechado com reinalação (Modelo HUSKY - CALGIMED®). A anestesia do foi realizada conforme o protocolo de anestesia geral para suínos do Biotério da Universidade de Caxias do Sul. A técnica anestésica compreendeu a medicação pré-anestésica; anestesia trans-operatória e recuperação pós anestésica.

Inicialmente os suínos foram medicados com midazolam 0,4 mg/kg e atropina 0,03 mg/kg, administrados via intra-muscular, afim de se obter uma sedação pré-anestésica. Após o posicionamento adequado do animal na mesa cirúrgica. Assegurou-se um acesso venoso com Abocath (22) através de punção da Veia Marginal da Orelha do suíno.

A anestesia foi induzida por uma associação de Fentanil, na dose de 20 mcg/kg, midazolam na dose de 0,5 mg/kg, administrados por via intravenosa, seguidos ainda da administração de tiopental sódico (5 mg/kg) e pancurônio (0,1 mg/kg).

Imediatamente após a indução anestésica, os suínos foram submetidos à intubação orotraqueal e conectados ao respirador, no qual permaneceram sob ventilação artificial. A manutenção da anestesia foi realizada com oxigênio e halotano e pela administração contínua de fentanil (50 mg/Kg/min.) e pancurônio (0,1 mg/kg) a cada 20 minutos.

A monitorização trans-operatória foi realizada através da ausculta cardíaca com estetoscópio pré-cordial e pela avaliação clínica, levando-se em conta: cor da pele e reflexo palpebral. Após o término do procedimento, realizamos analgesia com morfina administrada subcutânea.

Como pré anestésico foi utilizado a tiletamina mais zolazepam (ZOLETIL®), 0,2ml/kg de peso, aplicado por via intramuscular cinco minutos antes de iniciar o procedimento.

A via de acesso venoso utilizada para infusão de líquidos e drogas foi a veia marginal da orelha, obtida através da venóclise com um cateter de teflon 20G (ABBOCATH®).

A indução anestésica será realizada com tiopental sódico a 2,5% (THIONENBUTAL®) 10-12mg/kg, por via intravenosa até o desaparecimento do reflexo laringotraqueal e/ou discreto desaparecimento do reflexo óculo palpebral, seguindo-se de intubação por via orotraqueal com lâmina longa.

Os animais serão ventilados com oxigênio através de Ambú, e a posição do tubo certificada pela ausculta pulmonar. A droga utilizada para a manutenção da anestesia será o halotano (HALOTHANE®) 0,5% a 1%, e a reposição hídrica foi obtida com solução fisiológica a 0,9%, 20ml/kg/hora.

3.9 Técnica Cirúrgica

O abdome dos suínos foi devidamente preparado através de degermação e escovação com sabão antisséptico. Após, será realizada assepsia com álcool iodado a 2%, e os campos cirúrgicos foram colocados adequadamente e presos com pinças de Backhaus. Realizaremos uma incisão infra-umbilical, para-retal externa à esquerda, com divulsão do músculo reto abdominal, sem abertura do peritônio (extraperitoneal).

Realizado o descolamento com dissecação roma do espaço retroperitoneal, até a visualização da artéria ilíaca externa esquerda e da porção terminal da aorta infra-renal será realizada punção da veia cava inferior com seringa de 20ml para coleta de 15ml de sangue para análise.

Após dissecação cuidadosa da aorta, abaixo da origem da artéria mesentérica caudal, e da trifurcação (duas artérias ilíacas e uma artéria sacral mediana), as mesmas serão reparadas com vessel-loops (cadarços de silicone) com laçada dupla.²³

Após heparinização sistêmica (HEPARIN®, 100UI/Kg) e espera de três minutos, será realizado o controle da hemostasia através de tração dos vessel-loops. Uma arteriotomia transversa será realizada, a meio centímetro da trifurcação aórtica.

O sistema de implante dos *stents* constituem-se de uma bainha angiográfica 10F. O sistema de implante será introduzido delicadamente na aorta terminal, através de uma arteriotomia, e conduzido até o local de implante. Será realizada a palpção do sistema de implante e a liberação do *stent*.

A síntese da arteriotomia foi realizada com fio de polipropileno 5-0. Após o controle da hemostasia e a revisão do espaço retroperitoneal, a aponeurose será suturada com fio de Poligalactina número 1, e a síntese da pele com fio de Mononylon 2-0. Os pontos serão retirados em 10 dias.

O posicionamento correta de cada *stent* foi verificado através de palpção da aorta infra-renal, no momento da implantação dos mesmos.

Na coleta dos tecidos (a artéria aorta com os *stents*), os animais foram entubados e anestesiados. Foi realizado o devido preparo do campo operatório, e a laparotomia utilizada será a mediana supra e infra-umbilical. A artéria aorta foi abordada nas áreas proximal e distal isentas de tecido fibroso. Após, os animais foram submetidos à anticoagulação, e os espécimes foram retirados em monobloco com os tecidos adjacentes. Os tecidos retirados foram irrigados com solução de cloreto de sódio a 0,9%, e, nesse momento, foi verificado macroscopicamente a perviedade dos vasos. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente e uma porção de tecido foi enviada para cultura e outra para análise histopatológica. Os animais foram submetidos à eutanásia com cloreto de potássio intracardíaco.

3.10 Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão para os quais os animais ou as peças histológicas coletadas no estudo foram estabelecidos previamente à execução do experimento consistem de: Trombose da endoprótese ou da porção proximal e/ou distal da artéria aorta suína; reintervenção sobre a ferida operatória devido à hemorragia; óbito do animal antes do prazo estabelecido para a coleta de material para análise cultural dos tecidos; falhas técnicas no preparo, ou no processamento dos tecidos; não identificação do *S. epidermidis* na análise microbiológica; presença de outras bactérias.

3.11 Preparo do Tecido para Análise Histológica

Os espécimes foram abertos, analisados macroscopicamente e fixados com solução de Aldeído Fórmico a 10%. Secções de uma porção de tecido de 0,3cm de extensão da artéria aorta no limite da extremidade distal, foram retiradas para a análise histológica. Os segmentos foram processados e incluídos em blocos de parafina, e posteriormente, submetidos a cortes histológicos medindo 4µm de espessura para o preparo das lâminas. Essas contendo os cortes de tecidos foram preparadas e coradas pelas técnicas de H-E (Hematoxilina-Eosina).

3.12 Preparo dos Tecidos para Análise Cultural

Após secção das bordas proximal e distal para exame anatomopatológico, o segmento da aorta com as endopróteses foi enviado para análise de cultura quantitativa.

As próteses foram encaminhadas ao laboratório, submersas em 2mL de solução fisiológica estéril, homogeneizadas em agitador tipo “vortex” por 1 minuto e ultra-som por 5 minutos, em seguida mais 1 minuto no vórtex Conforme figura X. Procedeu-se a cultura quantitativa pelo método das diluições de 1:10, 1:100 e 1:000, semeados 100µL em ágar sangue (BioMérieux®) pelo método de estiramento do inóculo e incubada por 48h à $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em atmosfera de microaerofilia e posterior identificação e contagem das colônias.²⁴

4 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

¹Geary KJ, Tomkiewicz ZM, Harrison HN, et al. Differential effects of a gram-negative and gram-positive infection on autogenous and prosthetic grafts. *J Vasc Surg.* 1990;11:339-47.

²Farkas JC, Fichelle JM, Laurian C. Long-term follow-up of positive cultures in 500 abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg.* 1993;128: 284-8.

³Chalmers N, Eadington DW, Gandanhamo D, Gillespie IN, Ruckley CV. Case report: infected false aneurysm at the site of an iliac stent. *Br J Radiol.* 1993;66:946-8.

⁴Dosluoglu HH, Curl GR, Doerr, RJ et al. Stent-related iliac artery and iliac vein infections: two unreported presentations and review of the literature. *J Endovasc Ther.* 2001;8:202–9.

⁵Battaglia L, Bartolucci R, Minucci S, et al. Stent graft repair for rupture of the subclavian artery secondary to infection of a subclavian-to-carotid bypass graft. *Ann Vasc Surg.* 2001;15:474-6.

⁶Ferguson DJ, Boyle JR, Millar J, et al. Retrograde Endovascular management of a mycotic internal carotid artery false aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002; 24:88-90.

⁷Nichol IE, Rose JD, Brown AS, et al. In situ silver impregnated dacron replacement for an infected aortic stent graft: case report and review of the literature *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;5:42-3.

⁸Bast Y, Creemers E. Infection of an abdominal aortic stent graft with suprarenal attachment. *Ann Vasc Surg.* 2006;20:376-8.

⁹Kan DC, Lee LH, Yang JY. Outcome after endovascular stent graft treatment for mycotic aortic aneurysm: A systematic review. *J Vasc Surg.* 2007;46:906-12.

- ¹⁰Chaikof EL, Lin PH, Brinkman WT, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: risk-stratified outcomes. *Ann Surg.* 2002;23:833-41
- ¹¹Hearn AT, James KV, Lohr JM, et al. Endovascular *stent* infection with delayed bacterial challenge. *Am J Surg.* 1997;174:157-9.
- ¹²Thibodeaux LC, James CV, Lohr JM, et al. Infection of Endovascular *Stents* in a Swine Model. *Am J Surg.* 1996;172:151-4.
- ¹³Deiparine MK, Ballard JL, Taylor FC, et al. Endovascular stent infection. *J Vasc Surg.* 1996;23:529-33.
- ¹⁴Rensing BJ, Van Geuns RJ, Janssen M, et al. Stentocarditis. *Circulation,* 2000;101:188-90.
- ¹⁵Ducasse E, Calisti A, Speziale F, et al. Aortoiliac stent graft infection: current problems and management. *Ann Vasc Surg.* 2004;18:521-26.
- ¹⁶Parsons RE; Sanchez LA, Marin ML, et al. Comparison of endovascular and conventional vascular prostheses in an experimental infection model *J Vasc. Surg.* 1996;24:920-26.
- ¹⁷Kirksey L, Brener BJ, Hertz S, et al. Prophylactic antibiotics prior to bacteremia decrease endovascular graft infection in dogs. *Vasc Endovasc Surg.* 2002;36(3):171-8.
- ¹⁸Archer GL. *S. epidermidis* and other coagulase-negative *staphylococci*. In Mandell, GL, Benett JR, Dolin RE. *Mandell, Douglas and Benett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th ed. Philadelphia, Churchill Livingstone: p. 2092-2100.
- ¹⁹Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):277-81

²⁰Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.

²¹Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996;20:1083-92.

²²Cucarella C, Solano C, Valle J, et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001;183(9): 2888-96.

²³Dutra CF, Pereira AH. Digital morphometric analysis of the aortic wall in pigs following implantation of dacron-covered stents versus non-covered stents. *Acta Cir Bras.* 2004;19:210-19.

²⁴Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ et al. Sonification of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.

5. HIPÓTESE

O *stent* revestido por PTFE é mais resistente a infecção e apresenta menor reação inflamatória do que o *stent* revestido com Dacron®, em aorta de suínos.

6 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar dois tipos de endopróteses revestidas com Dacron® e PTFEe (Politetrafluoretileno expandido), infectadas com *Staphylococcus epidermidis*, verificando através de análise cultural quantitativa, em qual ocorre menor número de unidades formadoras de colônias, e menor resposta inflamatória da parede aórtica, além de verificação da perviedade e complicações decorrentes da cirurgia e da infecção.

7 RESULTADOS

7.1 ARTIGO ORIGINAL EM LINGUA PORTUGUESA.

Infecção de stents revestidos com Politetrafluoretileno expandido e Dacron com *Staphylococcus epidermidis*: estudo experimental em suínos

RESUMO

Contexto: O diagnóstico do agente etiológico é essencial para o tratamento das infecções de endoprótese, pois representam uma importante complicação do tratamento endovascular. A sonificação dos tecidos pode ser uma técnica usada para auxiliar na detecção de bactérias produtoras de biofilme.

Objetivos: Avaliar a infecção da aorta dos suínos após o implante de stents de nitinol revestidos com politetrafluoretileno (ePTFE) ou Dacron, infectados com *Staphylococcus epidermidis* produtor de biofilme. O espessamento intimal e a resposta inflamatória na parede aórtica também foram avaliados.

Métodos: 11 stents de nitinol revestidos com ePTFE e 10 stents de Dacron infectados com cepas de *S. epidermidis* foram implantados na aorta infra-renal de 21 suínos com 8 semanas de idade. Após duas semanas, a aorta contendo os stents foi removida. Um misturador de vórtice e ultrassom foram utilizados para homogeneizar as amostras e remover o biofilme. Posteriormente, foi contado o número de unidades formadoras de colônias.

Resultados: Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônias ou inflamação na parede arterial entre os dois grupos. Todas as culturas de stent aórtico foram positivas para *S. epidermidis*, exceto uma no grupo Dacron.

Conclusões: Não houve diferenças significativas na resposta inflamatória ou na taxa de infecção entre os stents revestidos de ePTFE e Dacron, infectados ativamente pelo *S. epidermidis* produtor de biofilme. O espessamento intimal e a resposta inflamatória à infecção das endopróteses foram semelhantes. Esses resultados sugerem que os dois materiais de revestimento de stent mais amplamente utilizados têm uma taxa de infecção semelhante.

Palavras-chave: Stent, infecção, *Staphylococcus epidermidis*, aorta, suínos.

INTRODUÇÃO

O *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) é um dos patógenos mais comuns em infecções de dispositivos implantados no sistema vascular.¹⁻³ O diagnóstico de infecção da endoprótese geralmente está relacionado a achados clínicos, estudos de imagem e exames microbiológicos. Ainda não foi determinado se há diferenças nas taxas de infecção entre o ePTFE e o Dacron, materiais usados para revestir as endopróteses e stent-grafts e como isso pode influenciar na prática clínica.⁴

Além disso, há um aumento considerável no número de relatos de infecção em stents e endopróteses, devido ao aumento no número de implantes em todo o mundo, com incidência de 0,3 a 3% e mortalidade operatória chegando a 30%, quando as cirurgias são realizadas para explantação da endoprótese em posição aórtica.⁵⁻⁹

A patogênese da infecção das endopróteses é multifatorial: quando precoce, é causada, em geral, por quebra da esterilidade durante o implante ou pela presença de bactérias no trombo aneurismático; tardiamente, é causada principalmente pela disseminação hematogênica de uma bacteremia (geralmente devido infecção do trato urinário ou respiratório), por translocação bacteriana ou contaminação iatrogênica durante o procedimento cirúrgico.^{4,7}

A identificação do microrganismo causador da infecção é extremamente importante, pois proporciona ao paciente o melhor tratamento. Usando as diferentes técnicas de amostragem disponíveis, os microrganismos podem ser isolados em cerca de 75% e 98% dos casos.⁴ O diagnóstico preciso do agente etiológico causador da infecção nem sempre é possível, pois algumas cepas de *S. epidermidis* produzem biofilme e têm capacidade de aderir e colonizar materiais sintéticos, o que dificulta o isolamento da bactéria em culturas convencionais.^{1,10,11} A sonificação do material explantado caracteriza-se como um importante método de diagnóstico do agente etiológico.¹²⁻¹⁴

Este estudo avaliou o número de unidades formadoras de colônias (UFC), o espessamento da parede íntima e total e o grau de resposta inflamatória nos dois tipos mais comuns de stents revestidos (ePTFE ou Dacron) previamente contaminados com *S. epidermidis* e implantados na aorta de suínos.

MATERIAL AND MÉTODOS

Foi realizado um estudo piloto em 10 suínos para analisar a infecção na aorta após o implante de stents revestidos com Dacron ou ePTFE previamente infectados com *S. epidermidis*. Uma cepa de bactérias produtoras de biofilme de *S. epidermidis* foi selecionada entre 16 outras que infectaram cateteres venosos centrais em humanos.

Além disso, stents revestidos com Dacron ou ePTFE medindo 8 mm de diâmetro e 25 mm de comprimento que foram confeccionados no Laboratório de Transformação Mecânica da Escola de Engenharia da UFRGS. Após 14 dias, a aorta dos suínos foi explantada com os stents revestidos e previamente infectados. Os stents foram enviados para exames anatomopatológicos e culturais convencionais.

Após 14 dias, a aorta dos suínos foi explantada com os stents revestidos e previamente infectados. Os stents foram enviados para exames anatomopatológicos e culturais convencionais.

No estudo principal, amostras de estafilococos coagulase-negativa foram isoladas das pontas de 16 cateteres venosos infectados de pacientes hospitalizados. A produção de biofilme foi avaliada pelos métodos convencionais descritos por Heilmann et al.¹⁵ e observação macroscópica do biofilme na superfície de uma lâmina de vidro, placa de ELISA (plástico) e segmentos de enxertos de Dacron e PTFEe, conforme descrito por Cucarella et al.¹⁶

O material contendo as bactérias foi colocado em 3 mL de caldo tríptico de soja (TSB, Merck®) suplementado com glicose 1,0% e incubado por 18 horas a 35 ± 1 °C. Posteriormente, foi diluído em 50 mL de TSB suplementado em uma concentração de 10⁴ a 10⁵ UFC / mL medida em uma câmara de contagem. Os dois tipos de stents permaneceram imersos e foram incubados por 1 hora a 35 ± 1 °C. Os stents foram removidos, lavados com soro fisiológico estéril e mantidos em tubos de ensaio com solução fisiológica 0,9% até o implante.

Amostras de sangue foram coletadas antes e após a cirurgia para análise da velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR), hemograma, hemoglobina, hematócrito e contagem de plaquetas. Os animais foram pesados diariamente e a temperatura retal medida duas vezes ao dia.

Um total de 21 suínos, do sexo feminino, pesando 18,5 a 19,6 kg foram submetidas ao implante de stents revestidos com ePTFE (11 animais) ou Dacron (10

animais). Após a indução da anestesia, intubação traqueal e anestesia geral, uma abordagem extra-peritoneal foi usada para acessar a aorta em condições estritamente estéreis. A aorta terminal, artérias ilíacas e artérias sacrais medianas foram expostas e reparadas com vessel-loops.¹⁷ Os stents foram colocados em uma bainha 12F e introduzidos na aorta terminal por meio de uma arteriotomia. Após a liberação do stent na aorta infrarrenal, a arteriotomia foi fechada com sutura de polipropileno 6-0 em execução e verificada a presença de sangramento. Não foram administrados antibióticos no período perioperatório.

No 14º dia, todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana sob anestesia geral e condições estéreis. A aorta e o stent foram removidos e a perviedade foi verificada macroscopicamente. O retroperitônio foi inspecionado para determinar quaisquer alterações secundárias à infecção. As bordas proximal e distal da aorta que continham o stent foram identificadas e devidamente marcadas, colocadas em formol a 10% e enviadas ao laboratório para exame histopatológico. Após a retirada da aorta contendo o stent, os animais foram sacrificados.

As amostras foram então enviadas ao laboratório, colocadas em 2 mL de solução salina estéril, homogeneizadas por vórtex por 30 segundos, sonicadas (Ultra Cleaner a 41 kHz - Unique®) por 5 minutos e então homogeneizadas novamente por mais 30 segundos, conforme descrito por Trampuz et al.¹²

Diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 foram utilizadas para culturas qualitativas, e 100 mL da solução foram semeados em ágar sangue (BioMérieux®) e incubados por 48 horas a 35 ± 1 °C em atmosfera microaerofílica para posterior identificação e contagem de colônias. As culturas foram classificadas como positivas quando mais de uma UFC foi encontrado.

Além disso, durante o exame histopatológico, o espessamento da parede íntima e total foi medido e a parede aórtica foi examinada para a presença de bactérias e células inflamatórias.

O teste t de Student foi usado para análise estatística de todas as amostras pareadas e análise quantitativa dos números das UFC, e o teste exato de Fisher, para análise dos resultados histopatológicos.

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Grupo de Pós-Graduação e Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil, e pelo Centro de Ciências Básicas e Saúde da Universidade de Caxias do Sul, Brasil.

O estudo experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Patologia da Universidade de Caxias do Sul (UCS) e no Laboratório de Animais da UCS. Os exames microbiológicos e laboratoriais foram realizados no laboratório Fleming, Caxias do Sul, Brasil.

RESULTADOS

No estudo piloto, não foram obtidas culturas positivas para nenhum dos 10 animais, pois apenas métodos de cultura convencionais foram usados, mas a sonificação dos tecidos explantados e materiais da aorta dos porcos não foi usada.

No estudo principal, foram analisados 19 animais: 10 com stents revestidos com ePTFE e 9 com *stents* revestidos com Dacron. As análises macroscópicas mostraram que todos os stents estavam pÉrvios ao final do experimento. Linfonodos aumentados retroperitoneal foram vistos em apenas um animal do grupo ePTFE. Dois porcos morreram: um com um *stent* revestido com ePTFE devido à trombose aguda do stent e o outro, com um stent revestido com Dacron®, devido à perfuração aórtica.

Além disso, o peso médio, a temperatura, o tempo de operação e os desvios padrão são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Não houve diferenças estatísticas entre os dois grupos.

Tabela 1. Peso, temperatura pré operatória, Tempo cirurgia, VHS e PCR

Variável	ePTFE (n = 10)		Dacron® (n = 9)		P
	Média	DP	Média	DP	
Peso (kg)	18,50	2,12	19,65	3,17	0,37
Temperatura operatória (°C) pré	37,83	1,08	37,66	1,74	0,81
Tempo cirurgia	44,00	8,43	46,11	13,64	0,68
VHS	13,00	15,80	12,17	8,32	0,91
PCR	9,33	6,08	9,75	6,36	0,89

(DP) Desvio Padrão

Valores médios não significativos ($p > 0,05$; Student test).

VHS: Velocidade de Hemossedimentação

PCR: Proteína C reativa

Tabela 2. Valores de hemograma, leucograma e plaquetas no pré e pós-operatório

Variáveis	PRÉ				POS				p1	p2
	PTFEe (n=9)		Dacron® (n=8)		PTFEe (n=9)		Dacron® (n=8)			
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
Hemácias (milhões)	5,59	0,60	5,83	0,37	5,90	0,72	5,84	1,17	0,58	0,60
Hemoglobina	9,78	1,04	10,16	0,71	9,88	1,55	10,13	1,78	0,94	0,89
Hematócritos (%)	33,76	5,03	34,45	3,49	33,44	4,98	33,48	5,79	0,72	0,86
Leucócitos	13513	5087	14933	6858	13300	5119	10850	2882	0,25	0,30
Eosinófilos (%)	1,63	1,40	2,17	1,47	1,50	0,92	1,00	0,63	0,15	0,24
Bastões (%)	2,13	1,55	3,00	2,00	2,38	2,87	1,83	0,98	0,62	0,44
Segmentados (%)	45,25	13,49	44,67	15,71	40,50	18,10	45,67	18,73	0,76	0,64
Linfócitos (%)	47,75	14,73	46,83	14,93	52,13	19,47	48,33	19,22	0,66	0,83
Monócitos (%)	3,25	3,01	3,33	2,58	3,50	1,19	3,00	1,26	0,97	0,77
Plaquetas	477200	74380	427500	42530	528600	95370	485500	267470	0,41	0,96

Valores médios não significativos ($p > 0.05$) teste T de Student p1: fator tempo p2: interação tempo X stent p1: fator tempo p2: interação tempo X stent

Os valores de hemograma, hematócrito, hemoglobina, plaquetas e contagem de leucócitos foram semelhantes aos resultados pré-operatórios (Tabela 3). Peso, VHS e PCR foram maiores após a cirurgia, mas as diferenças entre os grupos não foram significativas (Tabela 4).

Tabela 3. Valores de hemograma, leucograma e plaquetas no pré-operatório

Variáveis	PTFEe (n=10)		Dacron® (n=9)		p
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
Hemácias (milhões)	5,59	0,60	5,83	0,37	0,41
Hemoglobina (g%)	9,78	1,04	10,16	0,71	0,46
Hematócritos (%)	33,76	5,03	34,45	3,59	0,78
Leucócitos	13512	5087	13933	6858	0,66
Eosinófilos (%)	1,63	1,40	2,17	1,47	0,50
Bastões (%)	2,13	1,55	3,00	2,00	0,37
Segmentados (%)	45,25	13,49	44,67	15,71	0,94
Linfócitos (%)	47,75	14,73	46,83	14,93	0,91
Monócitos (%)	3,25	3,01	3,33	2,58	0,96
Plaquetas	477200	74380	427500	42530	0,28

Valores médios não significativos ($p > 0.05$) teste T de Student

Tabela 4. Valores de peso, VHS e PCR no pré e pós-operatório

Variáveis	PRÉ				POS				p1	p2
	PTFEe (n=9)		Dacron® (n=8)		PTFEe (n=9)		Dacron® (n=8)			
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
Peso (Kg)	18,81	2,04	20,11	3,05	24,51	2,97	23,28	6,21	≤ 0,001	0,23
Velocidade de Hemossedimentação	13,00	15,80	12,17	8,32	15,88	21,45	5,67	3,83	0,69	0,31
Proteína C reativa	9,33	6,08	9,75	6,36	17,33	17,60	20,50	29,54	0,12	0,81

Valores médios não significativos ($p > 0.05$) teste T de Student p1: fator tempo p2: interação tempo X stent

A temperatura média dos porcos foi 37,8 °C para o grupo ePTFE e 37,6 °C para o grupo Dacron. Oito das nove (89%) amostras de stents aórticos revestidos com Dacron® e todos os stents revestidos com ePTFE foram positivos para *S. epidermidis*. Não houve diferenças estatisticamente significativas no número de UFC entre os dois grupos (Tabela 5) ($p = 0,434$).

Tabela 5. Cultura quantitativa de *Staphylococcus epidermidis* (UFC/mL) nos complexos aorta-stent

Revestimento	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (UFC/mL)			
	Mínimo	Máximo	Média	p
PTFEe (n=9)	2,5 X 10 ⁵	1,5 X 10 ⁶	7,9 X 10 ⁵	0,434
Dacron® (n=8)	0,0	2,2 X 10 ⁶	1,5 X 10 ⁵	

Valores médios não significativos ($p > 0.05$) teste T de Student

Tabela 6. Análise histopatológica das bordas proximal e distal da aorta após implante de stents revestidos com Dacron® e PTFE

Variáveis	Borda proximal			Borda distal		
	PTFEe (n=9)	Dacron® (n=8)	P	PTFEe (n=9)	Dacron® (n=8)	P
Espessamento intimal (%)	33,0	0,0	0,206	44,4	37,5	>0,999
Espessamento da parede (%)	11,1	0,0	>0,999	0,0	25,0	0,206
Processo inflamatório (%)	33,0	0,0	0,206	44,4	25,0	0,62
Colônia de germes	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Valores médios não significativos ($p > 0.05$) teste exato de Fischer

Na análise histopatológica, a aorta nas bordas proximal e distal foi comparada com a aorta normal longe da área de implantação. As amostras de stent revestido com ePTFE aórtico

tiveram um aumento maior da espessura da íntima e da espessura total da parede e mais células inflamatórias do que o grupo de stents revestidos com Dacron®. Os resultados da análise histopatológica são apresentados na Tabela 6. Nenhuma bactéria foi encontrada em qualquer amostra durante as análises histopatológicas.

DISCUSSÃO

A infecção em dispositivos endovasculares é uma complicação incomum, mas extremamente séria e difícil de tratar. Quando suspeitada, a infecção na endoprótese deve ser prontamente investigada e tratada agressivamente.^{9,18-20} Assim, é de extrema importância o reconhecimento do agente etiológico causador das infecções, pois estão diretamente relacionadas ao aumento da morbimortalidade dos pacientes.^{4,10,13}

Atualmente, os dispositivos endovasculares são cobertos principalmente por dois polímeros diferentes, Dacron® ou ePTFE. A escolha desses polímeros e do esqueleto metálico da endoprótese está principalmente relacionada à sua estabilidade química e mecânica, ao invés de suas propriedades de inibir a colonização de microrganismos.⁴ Ainda não há consenso entre qual desses materiais resiste melhor à infecção.²¹ Em nosso estudo, obtivemos taxas de infecção semelhantes em ambos os stents revestidos.

As hemoculturas foram obtidas de todos os animais antes da operação, após a operação e antes da retirada das amostras cirúrgicas, e todas foram negativas. Os stents foram implantados por meio de uma arteriotomia para minimizar a exposição e contaminação do dispositivo.¹⁷ Além disso, a temperatura dos animais variava diariamente (Tabela 1), mas nenhum deles apresentava febre, temperatura média de 37,8 °C para o grupo ePTFE e 37,6 °C para o grupo Dacron, o que indicava que a virulência bacteriana não era elevada, lembrando que, temperaturas de até 42 °C são normais em suínos.

Em geral, as infecções de stent envolvem destruição arterial progressiva, trombose de stent, embolização séptica, formação de pseudoaneurisma.²³ Trombose aguda de stent revestido com ePTFE ocorreu em um dos suínos. Em outro, com *stent* revestido com Dacron®, houve perfuração da aorta. Ambos os animais morreram durante a operação. Acreditamos que os óbitos não estejam relacionados à infecção da endoprótese.

O exame microscópico revelou sinais de inflamação em algumas amostras da parede aórtica, com macrófagos, células plasmáticas e linfócitos, mas não houve predomínio de neutrófilos (células de inflamação aguda), como encontrado nos estudos de Thibodeaux et al.²⁴ e Hearn et al.²⁵, que infectou stents com *S. aureus*.

Diferentes técnicas de cultura têm sido utilizadas para o diagnóstico de infecção em próteses vasculares.^{10,21,26} As culturas podem ser negativas devido ao uso de antibióticos ou à presença de microrganismos produtores de biofilme e fortemente aderentes a materiais sintéticos. Também podem ser falsos positivos devido à contaminação durante a remoção da endoprótese.^{25,26}

Além disso, a infecção vascular da prótese pode ser sub-reconhecida quando identificada por técnicas de cultura padrão. A sonificação do material do enxerto com subsequente cultura e PCR de amplo espectro foi proposta por Ulcar et al.¹³ e Waldvogel¹⁴ para melhorar a detecção bacteriana. Assim, a sonificação do enxerto e a PCR de amplo espectro do fluido sonificado podem contribuir para o tratamento antimicrobiano otimizado, já que o autor alcançou uma taxa de recuperação bacteriana de 31,8% com cultura padrão, 66,7% na PCR e 72,2% nos tecidos sonificados¹³.

Outros autores, como Trampuz et al.¹², utilizando sonificação para desalojar o biofilme, encontraram taxa positiva de até 78,5% em culturas de líquido sinovial em joelhos e quadris. Bergamini et al.¹⁰ mostraram que, em enxertos de Dacron® contaminados com *S. epidermidis* produtor de biofilme, as taxas de recuperação bacteriana foram de 30% usando ágar sozinho, 72% usando meio de cultura caldo e 83% usando caldo meio de cultura caldo e ultrassom. Em nosso estudo piloto, no qual a sonificação do tecido não foi usada, não fomos capazes de isolar as cepas de *S. epidermidis* previamente implantadas. Em comparação com nosso estudo principal, obtivemos 100% de isolamento bacteriano nos *stents* revestidos com ePTFE e 89% naqueles revestidos com Dacron®, o que indica que o ultrassom é um método eficaz no diagnóstico do agente etiológico causador da infecção.

CONCLUSÕES

Para proporcionar o melhor tratamento ao paciente, a identificação do microrganismo causador da infecção é de extrema importância. Nossos resultados indicam que o ultrassom deve ser usado rotineiramente por microbiologistas para detectar com mais eficácia a presença de bactérias produtoras de biofilme, pois nos casos de infecção por *S. epidermidis* a taxa de recuperação das bactérias que infectaram os *stents* foi alta quando o ultrassom foi utilizado. Os *stents* de nitinol revestidos com ePTFE ou Dacron® implantados na aorta de suínos tiveram resultados semelhantes em número de unidades formadoras de colônias e inflamação da parede quando infectados com *S. epidermidis*. Acreditamos que o material de revestimento não

influencia significativamente a taxa de infecção e a maioria das infecções do *stent* se deve principalmente à introdução de bactérias no momento do implante.

REFERÊNCIAS

- ¹Coggia M, Goëau-Brissonnière O, Leflon V, Nicolas MH, Pechère J-C. Experimental treatment of vascular graft infection due to *Staphylococcus epidermidis* by in situ replacement with a rifampin-bonded polyester graft. *Ann Vasc Surg.* 2001;15:421-29.
- ²O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol.* 2001;50:582-87.
- ³Lejay A, Koncar I, Diener H, Vega De Ceniga M, Chakfé N. Postoperative infection of prosthetic grafts or stents involving the supra aortic trunks: a comprehensive review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2018;56:885-900.
- ⁴Chakfé N, Diener H, Lejay A, et al. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical practice guidelines on the management of vascular graft and endograft infections . *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020; 59: 339-84
- ⁵Gavali H, Mani K, Furebring M, Mogensen J, Wanhainen A. Branched endovascular aortic plug in patients with infrarenal aortic graft infection and hostile anatomy. *J Endovasc Ther.* 2020; 00:1-6.
- ⁶Chaufour X, Gaudric J, Goueffic, et al. A multicenter experience with infected abdominal aortic endograft explantation. *J Vasc Surg.* 2017; 65:372-80.
- ⁷Hogg ME, Peterson BG, Pearce WH, Morasch MD, Kibbe MR. Bare metal stent infections: Case report and review of the literature. *J Vasc Surg* 2007;46:813-20.
- ⁸Popplewell MA, Garnham AW, Hobbs SD. A new technique to explant an infected aortic endograft. *J Vasc Surg* 2015;62:512-4
- ⁹Sharif MA, Lee B, Lau LL, et al. Prosthetic stent graft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2007;46:443-8.
- ¹⁰Bergamini TM, Bandyk DF, Govostis D, Vetsch R, Towne JB. Identification of *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection: a comparison of culture techniques. *J Vasc Surg.* 1989;9:665-70.
- ¹¹Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:277-81.
- ¹²Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ et al. Sonification of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357:654-63.

- ¹³Ulcar BK, Lakic N, Jeverica S, et al. Contribution of sonicate-fluid cultures and broad-range PCR to microbiological diagnosis in vascular graft infections. *Infect Dis.* 2017; 0:1-7.
- ¹⁴Waldvogel FA. Ultrasound – now also for microbiologists? *N Engl J Med.* 2007;7:705-6.
- ¹⁵Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol.* 1996;20:1083-91.
- ¹⁶Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* 2001;183:2888-96.
- ¹⁷Dutra CF, Pereira AH. Digital morphometric analysis of the aortic wall in pigs following implantation of dacron-covered stents versus non-covered stents. *Acta Cir Bras.* 2004;19:210-19.
- ¹⁸Argyriou C, Georgiadis GS, Lazarides MK, Georgakarakos E, Antoniou GA. Endograft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: A systematic review and meta-analysis. *J Endovasc Ther.* 2017;00:1-10
- ¹⁹Batt M, Feugier P, Camou F et al. A meta-analysis of outcomes after in situ reconstructions for aortic graft infection. *Angiology.* 2018; 69(5):370-9.
- ²⁰Lichtenfels E, Frankini AD, Cardozo MA, D’Azevedo PA. Infecção em endoprótese. *J Vasc Bras.* 2011;10(1):50-54.
- ²¹Heafner TA, Lewis C, Baluh G, Clemens M, Propper B, Arthurs ZM. Initial inoculation concentration does not affect final bacterial colonization of in vitro vascular conduits. *Surg Infection* 2018; 19(3)1-6.
- ²²Tavares SLS, Donzele JL, de Oliveira RFM, Ferreira AS. Influence of environment temperature on the performance and the physiological traits of barrows from 30 to 60 kg. *R Bras Zootec.* 2000;29:199-205.
- ²³Paget DS, Bukhari RH, Zayyat EJ, Lohr JM, Roberts WH, Welling RE. Infectibility of endovascular stents following antibiotic prophylaxis or after arterial wall incorporation. *Am J Surg.* 1999;178:219-24.
- ²⁴Thibodeaux LC, James CV, Lohr JM, Welling RE, Roberts WH. Infection of endovascular stents in a swine model. *Am J Surg.* 1996;172:151-4.
- ²⁵Hearn AT, James KV, Lohr JM, Thibodeaux LC, Roberts WH, Welling RE. Endovascular stent infection with delayed bacterial challenge. *Am J Surg.* 1997;174:157-9.
- ²⁶Johnson JJ, Jacocks MA, Gauthier SC, et al. Establishing a swine model to compare vascular prostheses in a contaminated field. *J Surg Research* 2013;181: 355-58.

8 ARTIGO EM INGLÊS

ARTIGO PUBLICADO NO JORNAL VASCULAR BRASILEIRO - J. Vasc. Bras.
20 • 2021 • <https://doi.org/10.1590/1677-5449.200157>

Infection of expanded polytetrafluoroethylene and Dacron-coated stents with *Staphylococcus epidermidis*: an experimental study in pigs

Infecção de stents revestidos com politetrafluoretileno expandido e Dacron com Staphylococcus epidermidis: estudo experimental em porcos

Clandio de Freitas Dutra¹, Adamastor Humberto Pereira², Claudia Wollheim¹, Rodrigo Pongiluppi¹, Roberto Fellini¹, Sérgio Ventura Gomes Junior¹, Henrique Nonemacher³

Abstract

Background: Diagnosis of the etiologic agent of endoprosthesis infections is essential to enable treatment, since these infections constitute important complications of endovascular procedures. Sonication of explanted tissue and materials is a technique that can be used to facilitate detection of biofilm-producing bacteria. **Objectives:** To evaluate infection of pigs' aortas after implantation of nitinol stents coated with polytetrafluoroethylene (ePTFE) or Dacron, previously infected with biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis*. Intimal thickening and the inflammatory response in the aortic wall were also evaluated. **Methods:** 11 ePTFE-coated nitinol stents and 10 Dacron stents infected with *S. epidermidis* strains were implanted in the infrarenal aorta of 21 8-week-old pigs. After 2 weeks, the aorta containing the stents was removed. A vortex mixer and ultrasound were used to homogenize the samples and remove the biofilm. Subsequently, the number of colony-forming units was counted. **Results:** There were no significant differences between the two groups in terms of the number of colony-forming units or of inflammation in the arterial wall. With the exception of one specimen from the Dacron group, all aortic stent cultures were positive for *S. epidermidis*. **Conclusions:** There were no significant differences in the inflammatory response or infection rate between ePTFE and Dacron-coated stents actively infected with biofilm-producing *S. epidermidis*. Intimal thickening and the inflammatory response to infection of endoprostheses were similar. These results suggest that the two most widely used stent lining materials have a similar infection rate.

Keywords: stent; infection; *Staphylococcus epidermidis*; aorta; pigs.

Resumo

Contexto: O diagnóstico do agente etiológico é essencial para o tratamento das infecções de endoprótese, pois representam uma importante complicação do tratamento endovascular. A sonificação dos tecidos pode ser uma técnica usada para auxiliar na detecção de bactérias produtoras de biofilme. **Objetivos:** Avaliar a infecção da aorta dos porcos após o implante de stents de nitinol revestidos com politetrafluoretileno (ePTFE) ou Dacron, infectados com *Staphylococcus epidermidis*, produtor de biofilme. O espessamento intimal e a resposta inflamatória na parede aórtica também foram avaliados. **Métodos:** Onze stents de nitinol revestidos com ePTFE e 10 stents de Dacron infectados com cepas de *S. epidermidis* foram implantados na aorta infrarrenal de 21 porcos com 8 semanas de idade. Após duas semanas, a aorta contendo os stents foi removida. Um misturador de vórtice e ultrassom foram utilizados para homogeneizar as amostras e remover o biofilme. Posteriormente, o número de unidades formadoras de colônias foi contado. **Resultados:** Não houve diferenças significativas no número de unidades formadoras de colônias ou inflamação na parede arterial entre os dois grupos. Todas as culturas de stent aórtico foram positivas para *S. epidermidis*, exceto uma no grupo Dacron. **Conclusões:** Não houve diferenças significativas na resposta inflamatória ou na taxa de infecção entre os stents revestidos de ePTFE e Dacron, infectados ativamente pelo *S. epidermidis* produtor de biofilme. O espessamento intimal e a resposta inflamatória à infecção das endopróteses foram semelhantes. Esses resultados sugerem que os dois materiais de revestimento de stent mais amplamente utilizados têm uma taxa de infecção semelhante.

Palavras-chave: stent; infecção; *Staphylococcus epidermidis*; aorta; porcos.

How to cite: Dutra CF, Pereira AH, Wollheim C, et al. Infection of expanded polytetrafluoroethylene and Dacron-coated stents with *Staphylococcus epidermidis*: an experimental study in pigs. J Vasc Bras. 2021;20:e20200157. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.200157>

¹ Universidade de Caxias do Sul – UCS, Caxias do Sul, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Hospital Santa Mônica Erechim, Erechim, RS, Brasil.

Financial support: None.

Conflicts of interest: No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

Submitted: October 27, 2020. Accepted: December 15, 2020.

The study was carried out at Universidade de Caxias do Sul (UCS) and the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.



Copyright© 2021 The authors. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

■ INTRODUCTION

Staphylococcus epidermidis (*S. epidermidis*) is one of the most common pathogens in infections of devices implanted in the vascular system.¹⁻³ Diagnosis of endoprosthesis infection is usually made on the basis of clinical findings, imaging studies, and microbiological tests. It is yet to be determined whether there are differences in infection rates between ePTFE and Dacron, two materials used to coat stent grafts and endoprostheses, or their influence in clinical practice.⁴

Furthermore, there has been a considerable increase in the number of reports of infections in stents and endoprostheses, which is due to their increasing use worldwide, with incidence rates of 0.3 to 3%, and when surgery is performed to explant endoprostheses in aortic locations, operative mortality can reach 30%.⁵⁻⁹

The pathogenesis of stent graft infection is multifactorial. Early infections are generally caused by failures of sterility during implantation or by presence of bacteria in the aneurysmal thrombus. Later infections are mainly caused by the hematogenous spread of bacteremia (usually originating in the urinary or respiratory tracts), by bacterial translocation, or by iatrogenic contamination during the surgical procedure.^{4,7}

It is extremely important to identify the microorganism causing the infection, since the patient can then be provided with the best treatment. Using the different sampling techniques available, microorganisms can be isolated in about 75% and 98% of cases (4). Accurate diagnosis of the etiologic agent causing the infection is not always possible, because some strains of *S. epidermidis* produce biofilm and have the ability to adhere to and colonize synthetic materials, which makes it difficult to isolate the bacteria in conventional cultures.^{1,10,11} Sonication of the explanted material is characterized as an important method for diagnosis of the etiologic agent.¹²⁻¹⁴

This study evaluated the number of colony forming units (CFU), intimal and total wall thickening, and the degree of inflammatory response in the two most common types of coated stents (ePTFE or Dacron) previously contaminated with *S. epidermidis* and implanted in pigs' aortas.

■ MATERIAL AND METHODS

A pilot study was carried out with 10 pigs in order to analyze infections in the aorta after implantation of stents coated with Dacron or ePTFE previously infected with *S. epidermidis*. A biofilm-producing strain of *S. epidermidis* bacteria was selected from among 16 others that infected central venous catheters in humans.

In addition, were implanted stents coated with Dacron or ePTFE measuring 8 mm in diameter and 25 mm in length (Laboratory of Mechanical Manufacturing, School of Engineering at the Federal University of Rio Grande do Sul) in the pigs' aortas. After 14 days, the pigs' aortas were explanted with the coated and previously infected stents. The stents were sent for conventional anatomopathological examinations and culturing.

In the main study, samples of coagulase-negative *Staphylococcus* were isolated from the tips of 16 infected venous catheters from hospitalized patients. Biofilm production was evaluated using the conventional methods described by Heilmann et al.¹⁵ and by macroscopic observation of the biofilm on the surface of a glass sheet, ELISA plate (plastic), and segments of Dacron and ePTFE grafts, as described by Cucarella et al.¹⁶

The material containing the bacteria was placed in 3 mL of triptych soy broth (TSB, Merck®) supplemented with 1.0% glucose and incubated for 18 hours at 35 ± 1 °C. Thereafter, it was diluted in 50 mL of supplemented TSB at a concentration of 10⁴ to 10⁵ CFU/mL measured in a counting chamber. Both types of stents were immersed and incubated for 1 h at 35 ± 1 °C. The stents were removed, washed with sterile saline and maintained in test tubes with 0.9% saline until implantation.

Blood samples were collected before and after surgery to analyze erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), blood cell counts, hemoglobin, hematocrit, and platelet counts. The animals were weighed daily and rectal temperatures were measured twice a day.

A total of 21 female pigs weighing 18.5 to 19.6 kg were submitted to implantation of stents coated with ePTFE (11 animals) or Dacron (10 animals). After induction of anesthesia, tracheal intubation, and general anesthesia, an extra-peritoneal approach was used to access the aorta under strict sterile conditions. The terminal aorta, iliac arteries, and median sacral arteries were exposed and repaired with vessel loops.¹⁷ The stents were loaded into a 12F sheath and introduced into the terminal aorta through an arteriotomy. After stent release in the infrarenal aorta, the arteriotomy was closed with a 6-0 polypropylene suture and the presence of bleeding was verified. No antibiotics were administered in the perioperative period.

On the 14th day, all animals were subjected to median laparotomy under general anesthesia and sterile conditions. The aorta and stent were removed and patency was checked macroscopically. The retroperitoneum was inspected to determine any changes secondary to the infection. The proximal and distal borders of the aorta that contained the stent were identified and

properly marked, placed in 10% formalin and sent to the laboratory for histopathological examination. After removal of the aorta containing the stent, the animals were euthanized.

The samples were then sent to the laboratory, placed in 2 mL of sterile saline, homogenized by vortexing for 30 seconds, sonicated (Ultra Cleaner at 41 kHz - Unique®) for 5 minutes, and then homogenized again for another 30 seconds, as described by Trampuz et al.¹²

Dilutions of 1:10, 1:100, and 1:1000 were used for qualitative cultures, and 100 mL of the solution was seeded on blood agar (BioMérieux®) and incubated for 48 hours at 35 ± 1 °C in microaerophilic atmosphere for later identification and colony counting. Cultures were classified as positive when more than one CFU was found.

Additionally, during histopathological examination, intimal and total wall thickening were measured and the aortic wall was examined for presence of bacteria and inflammatory cells.

Student's *t* test was used for statistical analysis of all paired samples and quantitative analysis of CFU counts, and Fisher's exact test was used for analysis of histopathological results.

This study was evaluated and approved by the Graduate and Research Group at the Hospital de Clínicas of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, and by the Center

for Basic Sciences and Health at the University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Brazil.

The experimental study was carried out at the Microbiology and Pathology Laboratory at the Universidade de Caxias do Sul (UCS) and the UCS Animal Laboratory. Microbiological and laboratory tests were performed at the Fleming Laboratory, Caxias do Sul, Brazil.

RESULTS

In the pilot study, positive cultures were not obtained for any of the 10 animals, as only conventional culture methods were used and sonication of the explanted tissues and materials from the pigs' aorta was not performed.

In the main study, 19 animals were analyzed: 10 with ePTFE-coated stents and 9 with Dacron-coated stents. Macroscopic analyses showed that all stents were patent at the end of the experiment. Enlarged retroperitoneal lymph nodes were seen in only one animal, in the ePTFE group. Two pigs died: one with an ePTFE-coated stent due to acute stent thrombosis, and the other, with a Dacron®-coated stent, due to aortic perforation.

Mean weight, temperature, operating time, and standard deviations are shown in Tables 1 and 2. There were no statistical differences between the two groups.

Table 1. Weight, preoperative temperature, operating time, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein.

Variable	ePTFE (n = 10)		Dacron* (n = 9)		P
	Mean	SD	Mean	SD	
Weight (kg)	18.50	2.12	19.65	3.17	0.37
Preoperative temperature (°C)	37.83	1.08	37.66	1.74	0.81
Operating time	44.00	8.43	46.11	13.64	0.68
ESR	13.00	15.80	12.17	8.32	0.91
CRP	9.33	6.08	9.75	6.36	0.89

SD: Standard Deviation; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein. Mean values were not significant ($p > 0.05$; Student's *t* test).

Table 2. Preoperative and postoperative red blood cell, white blood cell, and platelet counts.

Variables	PRE		Dacron* (n = 8)	POST		Dacron* (n = 8)	p1	p2		
	ePTFE (n = 9)			ePTFE (n = 9)						
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD				
RBC (million)	5.59	0.60	5.83	0.37	5.90	0.72	5.84	1.17	0.58	0.60
Hemoglobin	9.78	1.04	10.16	0.71	9.88	1.55	10.13	1.78	0.94	0.89
Hematocrit (%)	33.76	5.03	34.45	3.49	33.44	4.98	33.48	5.79	0.72	0.86
Leukocytes	13513	5087	14933	6858	13300	5119	10850	2882	0.25	0.30
Eosinophils (%)	1.63	1.40	2.17	1.47	1.50	0.92	1.00	0.63	0.15	0.24
Band forms (%)	2.13	1.55	3.00	2.00	2.38	2.87	1.83	0.98	0.62	0.44
Granulocytes (%)	45.25	13.49	44.67	15.71	40.50	18.10	45.67	18.73	0.76	0.64
Lymphocytes (%)	47.75	14.73	46.83	14.93	52.13	19.47	48.33	19.22	0.66	0.83
Monocytes (%)	3.25	3.01	3.33	2.58	3.50	1.19	3.00	1.26	0.97	0.77
Platelets	477200	74380	427500	42530	528600	95370	485500	267470	0.41	0.96

SD: Standard Deviation; RBC: red blood cells. Mean values were not significant ($p > 0.05$; Student's *t* test). p1 = time; p2 = interaction time X stent.

Values for blood count, hematocrit, hemoglobin, platelets, and white blood cell count were similar to preoperative results (Table 3). Weight, ESR, and CRP were higher after surgery, but differences between groups were not significant (Table 4).

Mean body temperature of the pigs was 37.8 °C in the ePTFE group and 37.6 °C in the Dacron group. Eight of the nine (89%) samples of Dacron®-coated aortic stents and all ePTFE-coated stents were positive for *S. epidermidis*. There were no statistically significant

differences in number of CFU between the two groups (Table 5) ($p = 0.434$).

In the histopathological analysis, the proximal and distal edges of the aorta were compared with normal aorta distant from the area of stent deployment. Aortic samples from animals with ePTFE-coated stents had greater increases in intimal thickness and total wall thickness and more inflammatory cells than the group with Dacron®-coated stents. The results of the histopathological analysis are shown in Table 6.

Table 3. Preoperative red blood cell, white blood cell, and platelet counts.

Variable	ePTFE (n = 10)		Dacron® (n = 9)		P
	Mean	SD	Mean	Standard	
RBC (million)	5.59	0.60	5.83	0.37	0.41
Hemoglobin (g %)	9.78	1.04	10.16	0.71	0.46
Hematocrit (%)	33.76	5.03	34.45	3.59	0.78
Leukocytes	13512	5087	13933	6858	0.66
Eosinophils (%)	1.63	1.40	2.17	1.47	0.50
Band forms (%)	2.13	1.55	3.00	2.00	0.37
Granulocytes (%)	45.25	13.49	44.67	15.71	0.94
Lymphocytes (%)	47.75	14.73	46.83	14.93	0.91
Monocytes (%)	3.25	3.01	3.33	2.58	0.96
Platelets	477200	74380	427500	42530	0.28

SD: Standard Deviation; RBC: red blood cells. Mean values were not significant ($p > 0.05$; Student's t test).

Table 4. Preoperative and postoperative weight, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein.

Variables	PRE				POST				p1	p2
	ePTFE (n = 9)		Dacron® (n = 8)		ePTFE (n = 9)		Dacron® (n = 8)			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD		
Weight (kg)	18.81	2.04	20.11	3.05	24.51	2.97	23.28	6.21	< 0.001	0.23
ESR	13.00	15.80	12.17	8.32	15.88	21.45	5.67	3.83	0.69	0.31
CRP	9.33	6.08	9.75	36	17.33	17.60	20.50	29.54	0.12	0.81

SD: Standard Deviation; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein. Mean values were not significant ($p > 0.05$; Student's t test). p1 = time; p2 = interaction time X stent.

Table 5. Quantitative results of cultures of *S. epidermidis* (CFU/mL) in aortic stent samples.

Coating	Staphylococcus epidermidis (CFU/mL)			P
	Min	Max	Mean	
ePTFE (n = 9)	2.5×10^5	1.5×10^6	7.9×10^5	0.434
Dacron® (n = 8)	0.0	2.2×10^6	1.5×10^5	

CFU: colony-forming units. Mean values were not significant ($p > 0.05$; Student t test).

Table 6. Histopathological analysis of the proximal and distal edges of the aorta after implantation of Dacron®- or ePTFE-coated stents.

Variables	Proximal edge		P	Distal edge		P
	ePTFE (n=9)	Dacron® (n=8)		ePTFE (n=9)	Dacron® (n=8)	
Intimal thickening (%)	33.0	0.0	0.206	44.4	37.5	>0.999
Wall thickening (%)	11.1	0.0	>0.999	0.0	25.0	0.206
Inflammation (%)	33.0	0.0	0.206	44.4	25.0	0.62
Colony	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Mean values were not significant ($p > 0.05$) Fischer's exact test.

No bacteria were found in any of the samples during histopathological analyses.

■ DISCUSSION

Infection of endovascular devices is an uncommon complication, but is extremely serious and difficult to treat. When suspected, endoprosthesis infections should be promptly investigated and treated aggressively.^{9,18-20} It is therefore extremely important to identify the etiologic agents causing infections, since they are directly related to increased patient morbidity and mortality.^{4,10,13}

Currently, most endovascular devices are covered by one of two different polymers, Dacron® or ePTFE. The choice of these polymers and the metallic endoprosthesis skeleton is mainly related to their chemical and mechanical stability, rather than properties that inhibit colonization by microorganisms.⁴ There is still no consensus on which of these materials best resists infection.²¹ In our study, we obtained similar infection rates in both coated stents.

Blood cultures were obtained from all animals before the operation, after the operation, and before removal of surgical samples, and all were negative. Stents were implanted through an arteriotomy to minimize exposure and contamination of the device.¹⁷ Additionally, the animals' temperatures varied daily (Table 1), but none of them had fever. Average temperatures were 37.8 °C in the ePTFE group and 37.6 °C in the Dacron group, indicating that bacterial virulence was not elevated, since temperatures of up to 42 °C are normal in pigs.²²

In general, stent infections involve progressive arterial destruction, stent thrombosis, septic embolization, and pseudoaneurysm formation.²³ Acute ePTFE-coated stent thrombosis occurred in one of the pigs. In another, with a stent coated with Dacron®, there was perforation of the aorta. Both animals died during the operation. We believe that these deaths were not related to endoprosthesis infection.

Microscopic examination revealed signs of inflammation in some samples of the aortic wall, with macrophages, plasma cells, and lymphocytes, but there was no predominance of neutrophils (acute inflammation cells), as found in studies by Thibodeaux et al.²⁴ and Hearn et al.,²⁵ who infected stents with *S. aureus*.

Different culture techniques have been used for diagnosis of infection in vascular prostheses.^{10,21,26} Cultures may be negative because of use of antibiotics or presence of biofilm-producing microorganisms that adhere strongly to synthetic materials. There can also be false positives caused by contamination during endoprosthesis removal.^{25,26} Moreover, vascular

prosthesis infections can be under-recognized when identified by standard culture techniques.

Sonication of the graft material with subsequent culture and broad-spectrum PCR was proposed by Ulcar et al.¹³ and Waldvogel¹⁴ to improve bacterial detection. Thus, graft sonication and wide-spectrum PCR of the sonified fluid can contribute to optimized antimicrobial treatment, since they achieved a bacterial recovery rate of 31.8% with standard culture, 66.7% with PCR, and 72.2% in sonified tissues.¹³

Trampuz et al.¹² used sonication to dislodge biofilm and found positive culture rates of up to 78.5% in cultures of synovial fluid from knees and hips. Bergamini et al.¹⁰ showed that rates of bacterial recovery from Dacron® grafts contaminated with biofilm-producing *S. epidermidis* were 30% using agar alone, 72% using broth culture medium, and 83% using broth culture medium and ultrasound. In our pilot study, in which tissue sonication was not used, we were unable to isolate the strains of *S. epidermidis* previously inoculated. In comparison, in our main study we obtained 100% bacterial isolation from ePTFE-coated stents and 89% from those coated with Dacron®, which indicates that ultrasound is an effective method for diagnosing the etiologic agent causing infections.

■ CONCLUSIONS

Identification of the microorganism causing an infection is extremely important in order to provide the best treatment for the patient. Our results indicate that ultrasound should be used routinely by microbiologists to more effectively detect the presence of biofilm-producing bacteria, since the recovery rate of *S. epidermidis* bacteria from infected stents was high when ultrasound was used.

Nitinol stents coated with ePTFE or Dacron® implanted in the aortas of pigs had similar results for number of colony forming units and degree of wall inflammation when infected with *S. epidermidis*. We believe that the coating material does not significantly influence infection rate and most stent infections are mainly due to introduction of bacteria at the time of implantation.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Department of Mechanical Engineering and the Graduate Studies and Research Group in Surgery at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and the Pathology and Microbiology courses and the Animal Laboratory at the Universidade de Caxias do Sul.

REFERENCES

- Coggia M, Goëau-Brissonnière O, Leflon V, Nicolas MH, Pechère J-C. Experimental treatment of vascular graft infection due to *Staphylococcus epidermidis* by in situ replacement with a rifampin-bonded polyester graft. *Ann Vasc Surg*. 2001;15(4):421-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s100160010128>. PMID:11525531.
- O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*. 2001;50(7):582-7. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-582>. PMID:11444767.
- Lejay A, Koncar I, Diener H, Vega De Ceniga M, Chakfé N. Postoperative infection of prosthetic grafts or stents involving the supra aortic trunks: a comprehensive review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018;56(6):885-900. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2018.07.016>. PMID:30121172.
- Chakfé N, Diener H, Lejay A, et al. European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical practice guidelines on the management of vascular graft and endograft infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2020;59(3):339-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.10.016>. PMID:32035742.
- Gavali H, Mani K, Furebring M, Mogensen J, Wanhainen A. Branched endovascular aortic plug in patients with infrarenal aortic graft infection and hostile anatomy. *J Endovasc Ther*. 2020;27(2):328-33. <http://dx.doi.org/10.1177/1526602819900988>. PMID:31989857.
- Chaufour X, Gaudric J, Goueffic Y, et al. A multicenter experience with infected abdominal aortic endograft explantation. *J Vasc Surg*. 2017;65(2):372-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2016.07.126>. PMID:27720319.
- Hogg ME, Peterson BG, Pearce WH, Morasch MD, Kibbe MR. Bare metal stent infections: case report and review of the literature. *J Vasc Surg*. 2007;46(4):813-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2007.05.043>. PMID:17903662.
- Popplewell MA, Garnham AW, Hobbs SD. A new technique to explant an infected aortic endograft. *J Vasc Surg*. 2015;62(2):512-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2015.03.033>. PMID:25937607.
- Sharif MA, Lee B, Lau LL, et al. Prosthetic stent graft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*. 2007;46(3):442-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvs.2007.05.027>. PMID:17826231.
- Bergamini TM, Bandyk DF, Govostis D, Vetsch R, Towne JB. Identification of *Staphylococcus epidermidis* vascular graft infection: a comparison of culture techniques. *J Vasc Surg*. 1989;9(5):665-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S0741-5214\(89\)70037-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0741-5214(89)70037-9). PMID:2524605.
- Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(2):277-81. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0702.010226>. PMID:11294723.
- Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654-63. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa061588>. PMID:17699815.
- Ulcar BK, Lalic N, Jeverica S, et al. Contribution of sonicate-fluid cultures and broad-range PCR to microbiological diagnosis in vascular graft infections. *Infect Dis*. 2018;50(6):429-35. <http://dx.doi.org/10.1080/23744235.2017.1418529>. PMID:29260928.
- Waldvogel FA. Ultrasound: now also for microbiologists? *N Engl J Med*. 2007;357(7):705-6. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe078047>. PMID:17699821.
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol*. 1996;20(5):1083-91. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x>. PMID:8809760.
- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa J, Penadés JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001;183(9):2888-96. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001>. PMID:11292810.
- Dutra CF, Pereira AH. Digital morphometric analysis of the aortic wall in pigs following implantation of dacron-covered stents versus non-covered stents. *Acta Cir Bras*. 2004;19(3):210-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000300006>.
- Argyriou C, Georgiadis GS, Lazarides MK, Georgakarakos E, Antoniou GA. Endograft infection after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: a systematic review and meta-analysis. *J Endovasc Ther*. 2017;24(5):688. <http://dx.doi.org/10.1177/1526602817722018>. PMID:28756719.
- Batt M, Feugier P, Camou F, et al. A meta-analysis of outcomes after in situ reconstructions for aortic graft infection. *Angiology*. 2018;69(5):370-9. <http://dx.doi.org/10.1177/0003319717710114>. PMID:28578619.
- Lichtenfels E, Frankini AD, Cardozo MA, D'Azevedo PA. Infecção em endoprótese. *J Vasc Bras*. 2011;10(1):50-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-54492011000100009>.
- Heafner TA, Lewis C, Baluh G, Clemens M, Propper B, Arthurs ZM. Initial inoculation concentration does not affect final bacterial colonization of in vitro vascular conduits. *Surg Infect*. 2018;19(3):352. <http://dx.doi.org/10.1089/sur.2017.195>. PMID:29466092.
- Tavares SLS, Donzele JL, Oliveira RFM, Ferreira AS. Influence of environment temperature on the performance and the physiological traits of barrows from 30 to 60 kg. *Rev Bras Zootec*. 2000;29(1):199-205. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000100027>.
- Paget DS, Bukhari RH, Zayyat EJ, Lohr JM, Roberts WH, Welling RE. Infectibility of endovascular stents following antibiotic prophylaxis or after arterial wall incorporation. *Am J Surg*. 1999;178(3):219-24. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610\(99\)00114-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610(99)00114-2). PMID:10527443.
- Thibodeaux LC, James CV, Lohr JM, Welling RE, Roberts WH. Infection of endovascular stents in a swine model. *Am J Surg*. 1996;172(2):151-4. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610\(96\)00139-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610(96)00139-0). PMID:8795519.
- Hearn AT, James KV, Lohr JM, Thibodeaux LC, Roberts WH, Welling RE. Endovascular stent infection with delayed bacterial challenge. *Am J Surg*. 1997;174(2):157-9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610\(97\)90075-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9610(97)90075-1). PMID:9293834.
- Johnson JJ, Jacocks MA, Gauthier SC, et al. Establishing a swine model to compare vascular prostheses in a contaminated field. *J Surg Res*. 2013;181(2):355-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2012.06.056>. PMID:22795350.

Correspondence

Clandio de Freitas Dutra
Universidade de Caxias do Sul – UCS
Rua Moreira César, 2650, sala 806 - Bairro Pio X
CEP 95034-000 - Caxias do Sul (RS), Brasil
Tel: +55 (54) 3214-0079
E-mail: clandiodutra@hotmail.com

Author information

CFD - Vascular surgeon, with expertise in Angiorradiologia and Cirurgia Endovascular; Board certified, Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV); Professor, Universidade de Caxias do Sul (UCS); PhD in Cirurgia Vascular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
AHP - PhD in Cirurgia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Professor, UFRGS.
CW - PhD in Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS); Professor, UCS.
RP and SVGJ - Vascular surgeons, Hospital Geral de Caxias do Sul.
RF - Anesthesiologist, Clínica de Anestesiologia de Caxias do Sul (CAN).
HN - Urologist, Hospital Santa Mônica Erechim.

Author contributions

Conception and design: CFD, AHP
Analysis and interpretation: CFD, CW
Data collection: CFD, RF, RP, SVGJ, HN
Writing the article: CFD
Critical revision of the article: CFD
Final approval of the article*: CFD, AHP, CW, RF, SVGJ, HN, RP
Statistical analysis: CFD
Overall responsibility: CFD

*All authors have read and approved of the final version of the article submitted to J Vasc Bras.