

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Camila Bastos Tavares

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE BACILOS
GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DA GLICOSE NA ÁGUA TRATADA
PARA HEMODIÁLISE NAS UNIDADES DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA DO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE MARÇO E NOVEMBRO DE 2014**

Rio de janeiro
2015

Camila Bastos Tavares

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE BACIOS
GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DA GLICOSE NA ÁGUA TRATADA
PARA HEMODIÁLISE NAS UNIDADES DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA DO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE MARÇO E NOVEMBRO DE 2014**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Tavares, Camila Bastos

Avaliação da qualidade microbiológica e pesquisa de bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose na água tratada para hemodiálise nas unidades de terapia renal substitutiva do município do Rio de Janeiro entre março e novembro de 2014/ Camila Bastos Tavares. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ,2015.

91 f., il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientador: Victor Augustus Marin

1. Bactérias Gram-Negativas. 2. Soluções para Hemodiálise. 3. Controle de Qualidade. 4. Insuficiência Renal Crônica. 5. Insuficiência Renal Crônica. I.Título.

Evaluation of microbiological quality and research of non-fermentative gram negative bacilli on treated water for hemodialysis in renal replacement therapy units in Rio de Janeiro, between March and November of 2014.

Camila Bastos Tavares

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PESQUISA DE BACIOS
GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DA GLICOSE NA ÁGUA TRATADA
PARA HEMODIÁLISE NAS UNIDADES DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA DO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO ENTRE MARÇO E NOVEMBRO DE 2014**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em 26/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Luciana de Sousa Lopes (Doutor)
Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Victor Augustus Marin (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

A Deus pertencem todas as minhas conquistas.

Aos meus pais Ronaldo e Miriam e ao meu irmão Lucas por todo o amor e apoio que recebi e que me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela graça recebida, pelo cuidado, socorro e refúgio em todos os momentos da minha vida. Sem Ele nada seria possível, *“pois tudo, absolutamente tudo, nos céus e na terra, visível e invisível [...] todas as coisas começam Nele e Nele encontram seu propósito”*.

Aos meus pais agradeço por todo o incentivo recebido, fundamental na construção do meu carácter, e que me possibilitou chegar ao final deste curso. A minha mãe por todas as orações que me tranquilizaram em momentos difíceis, ao meu pai por sempre me apoiar em meus estudos.

Ao meu irmão Lucas, pela cumplicidade de amigos, pela companhia e pela paciência ao me ouvir recitar trechos e mais trechos da dissertação, respondendo (mesmo sem saber direito do que se tratava) sempre (que estava afim) com sua opinião sincera.

A minha vó, cuja disposição em sempre continuar aprendendo, é um exemplo que sempre irei carregar para a minha vida. Aos meus tios, David, Rosângela, Eliezer, Ana Paula, Verenir, Paulinho, Solange, Antônio e Neusa, por todas as orações e por sempre comemorarem comigo as minhas conquistas, em especial, ao tio e Pastor Eli, por todas as conversas motivadoras que foram essenciais nos momentos difíceis.

A todos os meus primos, pelas risadas e pela amizade, que fazem da minha vida mais colorida. Em especial as primas Lili e Luciana, e aos primos Gustavo, Danilo, Pedro, Daniel e Aldo, por todas as palavras de carinho, e por todos os bons momentos compartilhados.

Agradeço as amigas Ludmilla, Ivna, Isabele e Natália que sempre se fazem presente no meu dia a dia, e que mesmo que indiretamente contribuíram com essa conquista... seja pelo carinho compartilhado, ou pelo ombro fornecido. E um muitíssimo abrigada as amigas Mariana e Nataly, que dividiram comigo todas as alegrias e dificuldades vividas durante este mestrado. Obrigada meninas! Sem vocês não teria sido o mesmo!

Agradeço as amigas cientistas, Synara e Hilda que ajudaram com opiniões, ideias e incentivos, em especial ao amigo Ivson, que foi solidário nos momentos de

desespero e um conforto nos momentos de distração, e em ambos os casos foi essencial no desenvolvimento deste trabalho. Também a amiga Andréia, pelas horas de estudo compartilhadas no “bonde” mais badalado do INCQS.

Aos bons professores por todo o aprendizado fornecido. Às meninas da secretaria, por toda a ajuda e compreensão, e a coordenadora Kátia, que em todos os momentos sempre fez o que estava ao seu alcance para nos socorrer da melhor forma.

Ao Victor pela orientação que possibilitou a obtenção deste título, e a Joana (tia Jô) por todo o carinho, por toda a orientação fornecida, pelo acolhimento de mãe, e pelas palavras sempre tranquilizadoras que foram primordiais na conclusão deste trabalho.

Agradeço ao apoio financeiro da Fundação Oswaldo Cruz e a todos que de alguma forma ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Muito obrigada!

Uma mente necessita de livros da mesma forma que uma espada necessita de uma pedra de amolar se quisermos que se mantenha afiada.

George R. R. Martin

RESUMO

O processo de hemodiálise tem a água como o veículo primordial na terapia renal substitutiva, tanto na preparação do fluido como na reutilização dos dialisadores. É um processo essencial na vida de pacientes com insuficiência renal crônica, mas ao mesmo tempo em que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal, vem sendo responsável por complicações cuja intensidade e frequência são cada vez mais descritas na literatura. Estudos mostram que bacilos Gram negativos não-fermentadores são capazes de se desenvolver rapidamente em soluções e equipamentos de diálise, podendo estar relacionados à ocorrência de bacteremias, reações pirogênicas, infecções, hipotensão, instabilidade cardiovascular, dor de cabeça e náuseas. No Brasil, a legislação que regulamenta a qualidade microbiológica da água potável é a Portaria Nº 2914 de 2011, enquanto que a água destinada ao processo de diálise é regulamentada pela Resolução Nº 11 de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Apesar da legislação brasileira estabelecer critérios para os limites da presença de bactérias do grupo dos coliformes, dentre os quais correspondem a cerca de 20 espécies de bactérias Gram-negativas, não especifica a presença de bacilos Gram-negativos não fermentadores. Uma vez que bactérias Gram-negativas não fermentadoras são as principais responsáveis pela presença de endotoxinas bacterianas, formação de biofilme e múltiplas resistências a antibióticos, torna-se necessária a formulação de limites quanto a presença destes microrganismos na água utilizada no processo de diálise. No presente estudo foram avaliados a qualidade microbiológica da água de hemodiálise conforme o preconizado na legislação vigente, bem como a presença de bacilos Gram-negativos não fermentadores nas amostras de 16 clínicas de hemodiálise do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas de quatro pontos distintos de cada clínica: da torneira de abastecimento de água (água potável, pré-osmose reversa), da torneira do filtro de osmose reversa (pós-osmose reversa), da máquina de diálise (amostra da solução de hemodiálise) e a amostra do reuso do dialisador. Das dezesseis clínicas avaliadas neste trabalho, sete (43,75%) tiveram o resultado insatisfatório quanto à quantidade de bactérias heterotróficas, cujos valores excederam aos limites estipulados na legislação. Em nenhuma das clínicas

foi observada a presença de coliformes fecais e *Escherichia coli*. Quanto à presença de bacilos Gram-negativos não fermentadores, foram identificados neste trabalho, *Pseudomonas aeruginosa* (12,8%) *Stenotrophomonas maltophilia* (18,75%), *Burkholderia cepacia* (6,25%), *Acinetobacter lwoffii* (6,25%), *Brevundimonas diminuta* (12,5%), *Moraxella osloensis* (12,5%), *Sphingobacterium multivorum* (6,25%), *Achromobacter xylosoxidans* (6,25%), *Sphingomonas paucimobilis* (6,25%), *Achromobacter denitrificans* (6,25%) e *Ralstonia pickettii* (6,25%), todos estes, passivos de causar infecções em pacientes imunossuprimidos. Dentre estes, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *S. maltophilia* e o Complexo *B. cepacia* são descritos pela ANVISA como os principais bacilos Gram negativos não-fermentadores de importância médica. Tendo em vista que pacientes submetidos ao processo de hemodiálise por um período de três anos, ficam expostos a uma quantidade de água superior a utilizada por uma pessoa em condições normais de saúde durante toda a sua vida, a utilização de um fluido de qualidade tende a minimizar infecções e consequentemente garantir uma maior sobrevida de pacientes com doenças renais crônicas.

Palavras-chave: Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Água de hemodiálise. Controle de qualidade. Insuficiência Renal Crônica. Vigilância Sanitária.

ABSTRACT

Water is the primary vehicle on renal replacement in a dialysis process, both in the preparation of the fluid as the reuse of dialyzers. It is an essential process in patients's life with chronic renal failure, but at the same time it changed the prognosis of patients with renal failure, it has been responsible for complications whose intensity and frequency are more and more described in the literature. Studies have shown that Gram-negative non-fermenting bacilli are capable of rapidly developing in solutions and on dialysis equipment and could be related to bacteremia's occurrence, pyrogenic reactions, infection, hypotension, cardiovascular instability, headache and nausea. In Brazil, the legislation governing the microbiological quality of potable water is Portaria No. 2914 of 2011, while the water for the dialysis process is regulated by Brazilian Resolution No. 11 of 2014 of the Brazilian Health Agency (ANVISA). Although the Brazilian legislation establish as criteria for coliform bacterias's presence limits, among which account for about 20 species of Gram-negative bacteria, it does not specify the presence of Gram-negative non-fermenting bacilli. Since Gram-negative non-fermentative bacteria are mainly responsible for the presence of bacterial endotoxin, biofilm formation and resistance to multiple antibiotics, it is necessary to formulate limits for the presence of these microorganisms in water used for the dialysis process. The present study evaluated the hemodialysis's water microbiological quality as recommended in the current legislation, as well as the presence of Gram-negative non-fermenting bacilli in 16 dialysis clinics samples from Rio de Janeiro. Samples were collected from four different points on each clinic: the water supply faucet (potable water, pre-reverse osmosis), the reverse osmosis filter faucet (post-reverse osmosis), the dialysis machine (sample solution hemodialysis) and the dialyzer reuse. Sixteen clinics were evaluated in this study, seven (43.75%) had a unsatisfactory result since the values exceeded the limits stipulated in the legislation for the amount of heterotrophic bacteria. In none of the samples were found fecal coliforms and *Escherichia coli*. As the presence of Gram-negative non-fermenting bacilli, were identified in this study, *Pseudomonas aeruginosa* (12.8%) *Stenotrophomonas maltophilia* (18.75%), *Burkholderia cepacia* (6.25%), *Acinetobacter lwoffii* (6.25%), *Brevundimonas diminuta* (12.5%), *Moraxella osloensis* (12.5%), *Sphingobacterium multivorum*

(6.25%), *Achromobacter xylosoxidans* (6.25%), *Sphingomonas paucimobilis* (6.25%), *Achromobacter denitrificans* (6.25%) and *Ralstonia pickettii* (6.25%), all of these liable of causing infections in immunosuppressed patients. Among these, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *S. maltophilia* and *B. cepacia* complex are described by the National Health Surveillance Agency as the main Gram negative bacilli non-fermenter of medical importance. Given that patients undergoing hemodialysis process for a period of three years, are exposed to a higher amount of water than one person in normal health conditions throughout its life, the use of a fluid with sanitary quality tends to minimize infections and thus ensure greater survival of patients with chronic kidney diseases.

Keywords: Gram-negative non-fermenters. Hemodialysis water. Quality control. Chronic Renal Failure. Health Surveillance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de diálise peritoneal	19
Figura 2 - Imagem ilustrativa do processo de hemodiálise.....	20
Figura 3 - Número de unidades de diálise no Brasil nos anos de 2000 a 2013, conforme censo 2013 da Sociedade Brasileira de Nefrologia	21
Figura 4 - Diagrama do sistema de distribuição e tratamento de água em centro de hemodiálise, com os pontos de coletas utilizados	25
Figura 5 – Situação dos pontos de coleta do sistema de água de hemodiálise de 16 clínicas do município do Rio de Janeiro em 2014	66
Figura 6 – Quantidade de clínicas em que cada microrganismo foi isolado neste trabalho.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros microbiológicos da água e da solução de diálise segundo a Resolução da RDC nº 11, de 13 de março de 2014	43
Tabela 2 – Parâmetros de água potável segundo a Resolução da Portaria nº 2.914 de 2011.....	44
Tabela 3 - Microrganismos de referência utilizados neste trabalho	48
Tabela 4 - Provas bioquímicas complementares para BGN-NF	49
Tabela 5 – Qualidade microbiológica da água do sistema de hemodiálise de 16 clínicas de terapia renal substitutiva, no período de março a novembro de 2014 e microrganismos isolados nas amostras	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMI	Associação para o Avanço de Instrumentos Médicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ágar Padrão para Contagem
APHA	Associação Americana de Saúde Pública
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN-NF	Bacilos gram-negativos não fermentadores
BHI	<i>Ágar Brain Heart Infusion</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DPAC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua
EMB	ágar eosina azul de metileno
EU	Unidade de Endotoxina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	grama
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IRC	Insuficiência Renal Crônica
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LPS	lipopolissacarídeo
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>

MS	Ministério da Saúde
mL	mililitro
nº	número
OF	meio Oxidação-Fermentação
PA	caldo Presença / Ausência
POP	Procedimento Operacional Padronizado
PVC	Policloreto de vinila
RDC	Regime Diferenciado de Contratações
SIM	meio para sulfato, indol e motilidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Farmacopéia Americana
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTRS	Unidade de Terapia Renal Substitutiva
VM	Vermelho de metila
VP	Voges-Proskauer
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	17
1.1.1 <i>Insuficiência renal e tratamento dialítico</i>	17
1.1.2 <i>Contaminantes da água: Poluentes e micropoluentes biológicos</i>	22
1.1.3 <i>Qualidade microbiológica da água para hemodiálise</i>	23
1.1.4 <i>Bacilos Gram-negativos não fermentadores</i>	26
1.1.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.1.4.2 <i>Acinetobacter spp.</i>	30
1.1.4.3 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	32
1.1.4.4 <i>Burkholderia cepacia</i>	34
1.1.5 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	35
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVO.....	41
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE	42
4.2 COLETA DE AMOSTRAS	42
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	43
4.3.1 <i>Contagem de bactérias heterotróficas em água utilizada na preparação de solução para diálise</i>	44
4.3.2 <i>Pesquisa de coliformes totais em água tratada do sistema de diálise</i>	45
4.3.3 <i>Pesquisa de Escherichia coli em água potável fornecida a centros dialíticos</i>	46
4.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NA AMOSTRA DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE	47
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO.....	79
8 REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

O tratamento dialítico, ou a hemodiálise, é um processo essencial na vida de pacientes com insuficiência renal crônica. Mas, ao mesmo tempo em que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal, vem sendo também responsável por complicações, cuja intensidade e frequência são cada vez mais descritas na literatura. O processo de hemodiálise tem a água como o veículo primordial na terapia renal substitutiva, tanto na preparação do fluido como na reutilização dos dialisadores (FERREIRA et al., 2013). Até a década de 70, acreditava-se que a água potável pudesse ser utilizada no tratamento de hemodiálise, entretanto, com o aumento do número de pacientes em tratamento e sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitem correlacionar os contaminantes da água com efeitos adversos do tratamento (SILVA et al., 1996).

Na literatura, encontramos diversos relatos de surtos associados à qualidade da água tratada para diálise (RUDNICK; ARDUINO; BLAND, 1995; ROTH; JARVIS, 2000; OUSEPH; WARD R., 2006). As soluções para diálise e os equipamentos proporcionam ambientes adequados ao desenvolvimento microbiano, especialmente bactérias Gram-negativas. Além de bacteremias, os microrganismos Gram-negativos podem estar relacionados à ocorrência de reações pirogênicas, infecções, hipotensão, instabilidade cardiovascular, dor de cabeça e náuseas (PONTORIERO et al., 2003; HOENICK; RONCO; LEVIN, 2006).

Para garantir a qualidade da água para consumo, o Ministério da Saúde (MS), tem estabelecido padrões de tolerância microbiológica e físico-química através de publicações de Portarias e Resoluções. No Brasil, a legislação que regulamenta a qualidade microbiológica da água potável é a Portaria MS Nº 2914 de 2011, enquanto que a água destinada ao processo de diálise é regulamentada pela RDC 11 de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

Tendo em vista que bactérias Gram-negativas são as principais responsáveis pela presença de endotoxinas bacterianas, a legislação brasileira estabelece critérios para os limites da presença de bactérias do grupo dos coliformes, dentre os quais correspondem a cerca de 20 espécies de bactérias Gram-negativas, entéricas

e não entéricas, não esporogênicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C (BUGNO et al., 2007). No entanto, a legislação brasileira não considera a presença de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa*, cuja presença está relacionada à ocorrência de endotoxinas bacterianas e à possibilidade de formação de biofilmes (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

Considerando os riscos decorrentes da presença de *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise, este trabalho se propõe, além de verificar a qualidade microbiológica da água utilizada no processo de hemodiálise, pesquisar a ocorrência destes microrganismos nas amostras de água tratada para diálise e dialisatos das clínicas de diálise do Município do Rio de Janeiro.

1.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

1.1.1 Insuficiência renal e tratamento dialítico

Insuficiência Renal Crônica (IRC) é caracterizada pela deterioração progressiva e irreversível da função renal, que quando não tratada, leva ao óbito do paciente (NASCIMENTO; MARQUES, 2005). Até que cerca de 50% da função renal tenham sido perdidas, os pacientes permanecem quase assintomáticos. A partir daí podem aparecer sintomas e sinais que nem sempre incomodam muito o paciente, porém quando a função renal é muito reduzida, torna-se necessário o uso de métodos de tratamento da insuficiência renal: diálise ou transplante renal (ROMÃO JUNIOR, 2004). Devido ao diagnóstico tardio, 70% das mortes pela doença acontecem antes mesmo do paciente dar início ao tratamento, conforme estudo da Fundação Pro-Renal, entidade filantrópica, que fornece assistência a pacientes crônicos. (FERREIRA et al., 2013).

A importância da diálise na vida de paciente com IRC está diretamente relacionada ao papel indispensável que o rim desempenha em nosso organismo. Além de funcionar como um filtro do corpo, removendo sais e outras substâncias que estejam em quantidade excessiva, como a água e toxinas, exercendo portanto influência direta no equilíbrio eletrolítico e pressão arterial, este órgão, que tem o tamanho de um punho fechado, também regula o pH sanguíneo e é responsável pela produção e liberação de alguns hormônios, como a eritropoietina que estimula a produção de glóbulos vermelhos (FIGEL, 2011).

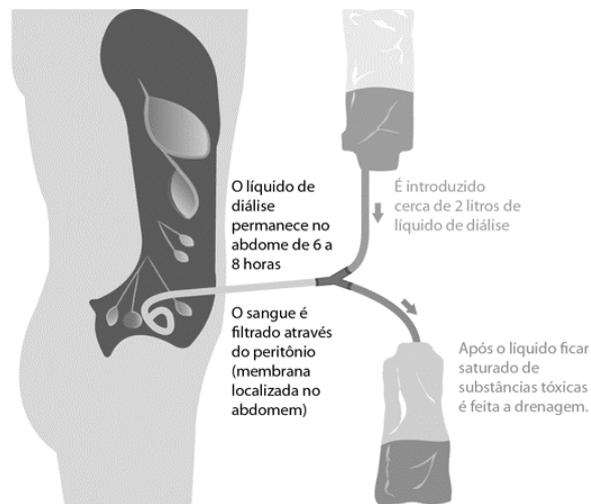
Em virtude das dificuldades na obtenção de um transplante renal, o tratamento dialítico torna-se a única saída do paciente, que pode ter que aguardar por anos para obter o transplante. Durante esse período a qualidade do tratamento será determinante no que diz respeito a qualidade de vida e sobrevida deste paciente (FAVERO et al., 1992; HOENICH; RONCO; LEVIN, 2006).

Historicamente a diálise teve seu início com o físico inglês Thomas Graham em 1854 (CARVALHO, MELO; ANDRAUS, 2001). No Brasil a hemodiálise teve seu início em 19 de maio de 1949 com o Dr. Tito Ribeiro de Almeida, no Hospital das Clínicas de São Paulo (CARVALHO; MELO; ANDRAUS, 2001).

O tratamento de diálise pode ser realizado por dois diferentes métodos: diálise peritoneal e a hemodiálise. A diálise peritoneal é mais indicada em casos de IRC, e é realizada de uma forma contínua conhecida por DPAC (diálise peritoneal ambulatorial contínua). Neste método, um cateter flexível é implantado cirurgicamente no peritônio (revestimento interno de seu abdômen), através do qual uma solução de diálise é introduzida, fazendo com que os resíduos e a água extra no sangue fluam através dos vasos sanguíneos para a solução de diálise (FIGEL, 2011).

Após algumas horas retira-se a solução de diálise, saturada de substâncias tóxicas e água, coloca-se uma solução limpa novamente. A terapia acontece com as trocas da solução de diálise. O número de trocas ou ciclos realizados por dia, assim como o tempo de permanência e drenagem, depende da modalidade de diálise peritoneal escolhida de acordo com as características clínicas de cada paciente. A diálise peritoneal (Figura 1) pode ser feita na própria casa do paciente, ou ainda no local de trabalho, já que o processo de troca do banho de diálise é feito pelo próprio paciente ou por algum familiar (ANDREOLI; NADALETO, 2008).

Figura 1 - Esquema de diálise peritoneal

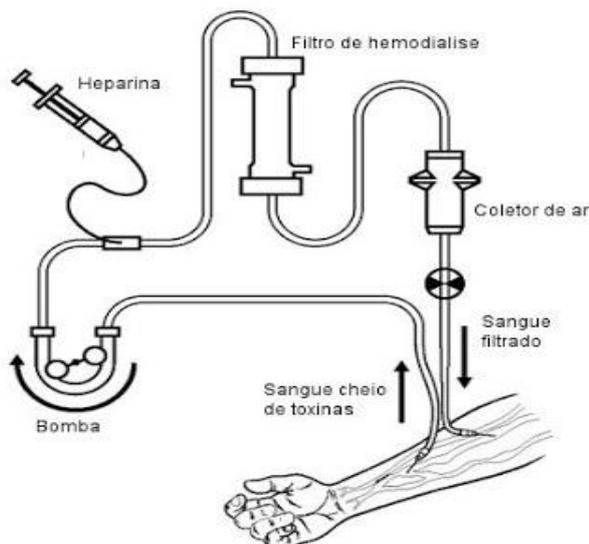


Fonte: <<http://www.dialiseperitoneal.com.br/>> Acesso em: 21 abr. 2013.

Na hemodiálise, o sangue do paciente é filtrado artificialmente, por meio de uma máquina (dialisador), também conhecida como “rim artificial”, através de um cateter ou de uma fístula, procedimento realizado mais comumente nas veias do braço, onde as veias mais espessas calibrosas fornecem um fluxo de sangue constante (ANDREOLI; NADALETO, 2008).

O processo de hemodiálise (Figura 2) consiste na filtragem de substâncias indesejáveis (uréia, creatinina, ácidos orgânicos, medicamentos, etc.) e restauração do equilíbrio eletrolítico no sangue de pacientes com IRC, possibilitado pela transferência de solutos entre o sangue e uma solução de diálise (dialisato), através de uma membrana artificial semipermeável (filtro de hemodiálise ou capilar). (HOENICK; RONCO; LEVIN, 2006).

Figura 2 - Imagem ilustrativa do processo de hemodiálise



Fonte: <<http://www.mdsaude.com/2008/11/hemodilise-parte-i-entenda-como.html>> Acesso em: 21. Abr. 2013.

O equipamento de diálise permite a formação de um fluxo contra-paralelo entre o sangue do paciente e o fluido de diálise (dialisato), pelo qual o sangue do paciente é filtrado (OLIVEIRA JUNIOR, 2008). Após o processo de difusão o sangue depurado retorna para o paciente (FERREIRA et al., 2013).

A solução de diálise ou dialisato é composta principalmente de água tratada, acrescida com uma solução concentrada de eletrólitos (Sódio, Cloreto, Cálcio, Magnésio e Potássio), tampão e glicose, numa proporção de 34:1 (FERREIRA, 2009), que substituem as toxinas presentes no sangue (LEME; SILVA, 2003), sendo, portanto, a água o veículo primordial na terapia renal substitutiva, e uma vez que o fluido de diálise ou dialisato, que banha a membrana semi-permeável (dialisador), não é uma solução estéril, e que, durante uma única sessão de hemodiálise o sangue do paciente entra em contato com aproximadamente 120 litros de água, desta forma a qualidade da água possui uma grande importância na saúde do paciente (BOMMER; JABER, 2006).

De acordo com o censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia de 2013, que pode ser observado na Figura 3 a seguir, estima-se que haja 100.397 pacientes renais crônicos no Brasil, distribuídos em 658 clínicas especializadas (SOCIEDADE

BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2015). Segundo relatório do censo Brasileiro de diálise, em 2011 o número estimado de pacientes em diálise no País foi de 91.314. Destes pacientes, 84% realizam o tratamento pelo SUS, enquanto apenas 16% utilizam outras formas de convênio.

Figura 3 - Número de unidades de diálise no Brasil nos anos de 2000 a 2013, conforme censo 2013 da Sociedade Brasileira de Nefrologia



Fonte: http://sbn.org.br/pdf/censo_2013_publico_leigo.pdf (2015) Acesso em: 22 jan. 2015.

Pacientes tratados por hemodiálise, são expostos a cerca de 18.000 a 36.000 litros de água por ano, distribuídos em sessões de normalmente 3 vezes por semana, durante cerca de 4 horas e um fluxo de 350 a 400mL/min. Considerando-se que durante o procedimento o sangue do paciente se separa da solução de diálise apenas por uma membrana semi-permeável, é possível afirmar que se a água não for corretamente tratada vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos,

poderão ser transferidos para os pacientes. Doenças infecciosas são a segunda causa de morte em pacientes renais crônicos, superadas apenas pelas doenças cardiovasculares, sendo que septicemia ocorre em aproximadamente 75%, destes pacientes (VARO et al., 2007).

Com a finalidade de adequar as características físico-químicas e microbiológicas da água potável à sua aplicação em procedimentos dialíticos, procedimentos complementares foram tomados quanto ao tratamento da água utilizada. Sistemas de tratamento de água com esta finalidade geralmente incluem filtros primários, abrandadores, filtros de carvão ativado, deionizadores e osmose reversa. São utilizadas práticas de desinfecção e manutenção dos circuitos de água, assim como medição das concentrações físico-químicas e bacteriológicas periódicas, devendo ser cloro e pH diariamente controlados (CALDERARO; HELLER, 2001).

Embora a escolha do tipo de sistema de tratamento da água seja importante, é um erro supor que a melhor escolha significa ausência dos problemas relacionados à qualidade da água, uma vez que a qualidade depende também da manutenção e monitoramento do sistema.

1.1.2 Contaminantes da água: Poluentes e micropoluentes biológicos

A água usada nos centros de hemodiálise é geralmente obtida do reservatório de água da comunidade. A água pode vir da superfície ou de leitos subterrâneos. Ambas as fontes podem conter altas concentrações de endotoxina e bactéria. Águas provenientes de câmaras subterrâneas como poços e nascentes geralmente apresentam uma menor quantidade de matéria orgânica e são mais ricas em matéria inorgânica como ferro, cálcio, magnésio e sulfato. Águas superficiais como lagos, lagoas, rios e outros tipos de reservatórios superficiais, são geralmente mais contaminadas com organismos e microrganismos, resíduos industriais, fertilizantes, pesticidas e esgoto (AMATO, 2005).

A água potável tolera a presença de até 2mg/L de substâncias orgânicas. Estas matérias orgânicas, em quantidade elevada, são índices de poluição

ambiental e as consequências da poluição orgânica são o odor desagradável, exacerbado pela cloração, o desenvolvimento de algas, bactérias e fungos que podem se fixar nas tubulações da rede. Métodos utilizados para diminuição dos materiais orgânicos são a oxidação por ozônio ou a clarificação por carvão ativado. Os materiais orgânicos são também eliminados por deionizador ou osmose reversa. O tratamento de água da comunidade reduz o número de bactérias na água, mas, geralmente, não reduz significativamente a concentração de endotoxinas (SILVA et al., 1996).

Os principais contaminantes dos fluidos de diálise são bactérias gram-negativas e micobactérias não tuberculosas. Todos os componentes do tratamento de água podem se constituir em multiplicadores de bactérias e fontes de contaminação por endotoxinas e, por essa razão, devem ser rotineiramente substituídos ou desinfetados conforme pré-estabelecido na legislação vigente (SILVA et al., 1996).

O conteúdo microbiológico da água raramente tem origem na fase de fluido, ou seja, na água, mas sobre as superfícies do sistema, sob a forma de biofilme, no entanto, a água transporta material microbiano para as máquinas de diálise. A contaminação inclui células microbianas, endotoxinas, e metabólitos microbianos formados durante o crescimento no sistema (NYSTRAND, 2008).

Um líquido de diálise de alta qualidade tende a eliminar os efeitos dos impactos microbiológicos, os fluidos não precisam ser estéreis, mas o número máximo de microrganismos deve ser controlado. Na situação de realização de filtração por hemodiálise, é ainda mais importante ter um método sensível de verificação microbiológica para acompanhamento da qualidade (NYSTRAND, 2008).

1.1.3 Qualidade microbiológica da água para hemodiálise

Se por um lado o concentrado de solutos do dialisato deve ser produzido comercialmente numa composição altamente controlada, por outro, a água usada neste tipo de processo pode variar amplamente na sua composição química e

microbiológica. O resultado desta variação irá influenciar diretamente a qualidade do fluido para hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999).

A legislação preconiza que o tratamento da água para hemodiálise deve ser mais rigoroso do que o da água potável, sendo necessário um sistema de purificação adicional onde a água utilizada deve ser potável. Quanto ao preparado do dialisato, o mesmo deve ocorrer poucas horas antes do uso, e o tanque ou equipamento drenado e desinfetado, ao final de cada dia de tratamento (SILVA et al., 1996).

A tubulação do sistema de distribuição de água nos centros de diálise, em geral, é constituída de policloreto de vinila, mais conhecido pelo acrônimo PVC (do nome em inglês Polyvinyl chloride). Tubos galvanizados ou de cobre não devem ser usados porque contaminariam a água com concentrações tóxicas de zinco e cobre. Tubos de grande diâmetro e longos acarretam uma diminuição do fluxo da água e aumentam o potencial de contaminação bacteriana. Conexões grosseiras, pontos cegos, e ramos de tubulação sem uso, também se constituem em reservatórios potenciais e devem ser eliminados, devendo, portanto ser projetados de forma a facilitar a desinfecção, limpeza e enxágue do desinfetante. (SILVA et al., 1996; CALDERARO; BISCHOFBERGER, 1998).

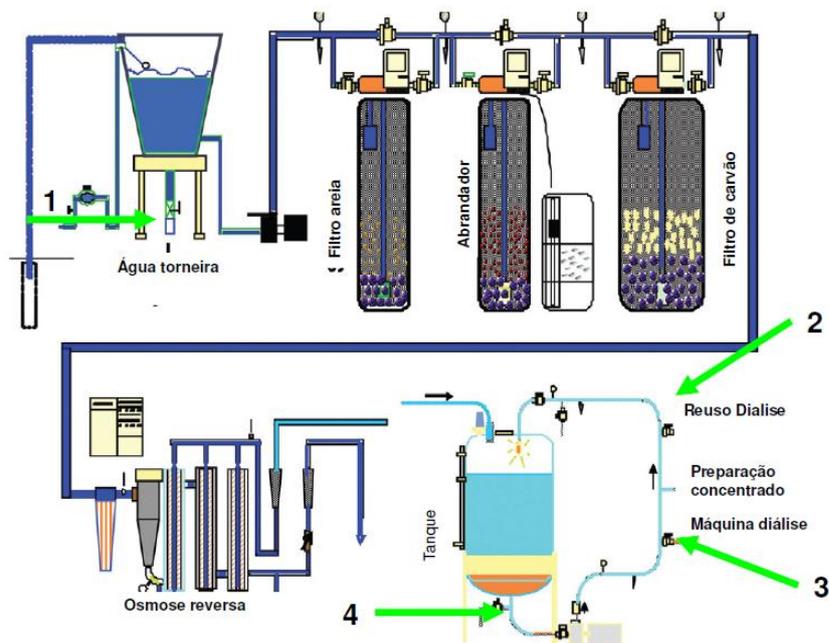
As estratégias para controle de contaminação no sistema de hemodiálise devem incluir a desinfecção dos tanques, tubulações e máquinas, a serem realizadas a um só tempo para que se considere a desinfecção eficaz. Tanto a central única quanto as máquinas de diálise tem tubulações e canais facilmente colonizáveis com bactérias e, geralmente, se constituem numa fonte para contaminação por bactérias e endotoxinas (SILVA et al., 1996).

Sistemas de purificação utilizam a água pré-tratada por diferentes processos de filtração, tais como: filtração por osmose reversa, por troca iônica e outros, que permitem a remoção de partículas, sais e íons, e alguns retêm bactérias da fase líquida antes de ser entregue às unidades de hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999). O pré-tratamento é realizado para impedir que substâncias e partículas possam danificar os equipamentos de purificação, diminuindo sua eficiência e tempo de uso, além de assegurar a qualidade da água resultante (FERREIRA et al., 2013). O tratamento da água por carvão ativado permite a retirada de toxinas presentes na

água, aumentando a segurança quanto à toxicidade nos casos de ingestão pelo homem. (SILVA et al., 1996).

Conforme representado na Figura 4 a seguir, os sistemas de tratamento de água para diálise são compostos de filtros mecânicos, abrandadores (equipamento cuja principal aplicação é remover os íons de cálcio e magnésio responsáveis pela dureza contida na água), filtros de carvão, deionizadores, osmose reversa e tanques para armazenamento da água (MONTANARI et al., 2009). A água tratada deve seguir por tubulações aparentes em PVC ou similar, com conexões em locais estratégicos do circuito, para facilitar o controle de qualidade da água (LEME; SILVA, 2003).

Figura 4 - Diagrama do sistema de distribuição e tratamento de água em centro de hemodiálise, com os pontos de coletas utilizados



Fonte: FIGEL, 2011, adaptado Montanari et al., 2009

Legenda: 1: Ponto de coleta da água potável (torneira hidrômetro e torneiras dentro da clínica)

2: Ponto de coleta da água tratada para diálise (torneiras da sala de reuso)

3: Ponto de coleta do dialisato (máquina hemodiálise pós-capilar)

4: Ponto de coleta da água tratada para diálise (torneira após o tratamento da água)

A eficiência do equipamento de tratamento de água depende da capacidade dos componentes do equipamento, da natureza da água a ser tratada, além de variações sazonais (SILVA et al., 1996).

1.1.4 Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) são microrganismos aeróbios e incapazes de utilizar a glicose como fonte de energia através da fermentação, degradando-a pela via oxidativa (BRASIL, 2012). A maioria é oxidase positiva, móvel e incapazes de formar esporos. Em decorrência da baixa atividade metabólica, quando comparados às enterobactérias, a identificação bioquímica torna-se mais complexa, dependendo portanto do auxílio das características morfológicas, macroscópicas e microscópicas durante o processo de identificação (KONEMAN, 2008).

Estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados em água, solo, peixes congelados, leite cru, soluções desinfetantes e etc, e algumas espécies também podem ser encontradas como comensais no intestino humano (ENOCH; BIRKETT; LUDLAN, 2007).

São frequentemente isolados em ambientes hospitalares onde costumam atuar como microrganismos oportunistas responsáveis por diversas infecções associados aos cuidados de saúde, acometendo pacientes imunocomprometidos, paciente submetidos a procedimento invasivo, infecções no trato respiratório de pacientes com fibrose cística, unidade de queimados e unidades de terapia intensiva, como a hemodiálise (ENOCH; BIRKETT; LUDLAN, 2007).

Muitas espécies de BGN-NF são conhecidas pelo seu potencial patogênico, disseminação e alta resistência a diversas classes de antimicrobianos, tendo a facilidade de adquirir novos mecanismos de resistência. Os principais problemas em BGB-NF são a resistência aos antibióticos, associados a alguns mecanismos de resistência, tais como: produção de β -lactamase; perda de porina; e bomba de efluxo (GALES et al., 2012).

Dentre os gêneros e espécies que compõem o grupo dos BGN-NF, os mais frequentes em infecções humanas são: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* e o Complexo *Burkholderia cepacia*.

1.1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um BGN-NF móvel, frequentemente isolado em pacientes com fibrose cística. Muitas cepas de *P. aeruginosa* isoladas destes pacientes, apresentam o fenotípico mucoide, indicativo de infecção crônica. Tanto a *P. aeruginosa*, quanto a *Acinetobacter baumannii* estão entre as bactérias mais isoladas em hemoculturas e amostras do trato respiratório de pacientes submetidos a internação hospitalar (HAUSER et al., 2011; ANVISA, 2012).

A espécie possui flagelo polar monotríquio, reto ou levemente curvo, tipicamente distribuído aos pares, e uma vez que são não-fermentadores, utilizam carboidratos para seu metabolismo respiratório, com o oxigênio como acceptor final de elétrons. Embora seja definido como aeróbio obrigatório, pode crescer em condições de anaerobiose utilizando nitrato ou arginina como acceptor alternativo de elétron (BLONDEL-HILL; HENRY; SPEERT, 2007; KONEMAN, 2008).

Pseudomonas aeruginosa são também capazes de crescer sem dificuldade em diferentes meios comuns de isolamento como ágar sangue, ágar MacConkey e ágar EMB (ágar Eosina Azul de Metileno). Normalmente, a identificação de *P. aeruginosa* é simples, visto que a mesma apresenta colônias geralmente grandes, planas, com borda em difusão, e frequentemente, têm aparência de pele de crocodilo; possuem odor adocicado característico e além de produzirem pigmentos hidrossolúveis, tais como, pioverdina (pigmento fluorescente também produzido por outras espécies de *Pseudomonas* pertencentes ao Grupo Fluorescente) e um pigmento azul característico, a piocianina. A combinação destes dois pigmentos é responsável pela cor verde brilhante, visualizada em meio de cultura incolor, característica patognomônica das colônias de *P. aeruginosa*. Algumas cepas são capazes de produzir outros tipos de pigmentos que se difundem no meio, como

fluoresceína (amarelo), piorrubina (avermelhado para o marrom), e piomelanina (marrom a preto) (KONEMAN, 2008).

Estão amplamente distribuídos no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água, mas também são encontrados em todo ambiente hospitalar, distribuídos em vários reservatórios, como soluções, alimentos, equipamentos de respiração artificial e de diálise. Tentativas de eliminar esses microrganismos do ambiente hospitalar são ineficientes, pois ele se encontra amplamente presente em suprimentos hídricos, no mundo todo (BLONDEL-HILL; HENRY; SPEERT, 2007).

Este microrganismo possui uma necessidade nutricional mínima, sendo capaz de utilizar muitos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio, também consegue tolerar uma ampla variedade de temperatura (4°C a 42°C); além de ser resistente a maioria dos desinfetantes, o que contribui para sua prevalência no ambiente hospitalar (BLONDEL-HILL; HENRY; SPEERT, 2007).

Apesar de poder ser encontrado como constituinte da microbiota de indivíduos saudáveis, sua presença não é muito frequente, no entanto, em pacientes hospitalizados o aumento da frequência de colonização tem relação direta com o tempo de hospitalização e o uso de quimioterapia ou antibioticoterapia com antimicrobianos de amplo espectro. Normalmente, a colonização antecede a infecção, tendo esta, efeito direto ao tempo de hospitalização do paciente (POLLACK, 1995; KERR; SNELLING, 2009).

Sua extensa coleção de fatores de virulência está relacionada, em parte, à grande diversidade e gravidade de infecções que podem ser causadas por essa bactéria e, em sua maioria, associada a capacidade de invasão e toxicidade que esta bactéria possui. Ressalta-se entretanto, que a gravidade das infecções também está relacionada à marcante resistência à maioria dos antibióticos (KERR; SNELLING, 2009).

Fatores de virulência incluem o lipopolissacarídeo (LPS) (comum às bactérias gram-negativas), exotoxina A, leucocidinaviscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas. A capacidade de secretar esses fatores de virulência, principalmente através do sistema de secreção do tipo III, aumentam a gravidade das infecções causadas por esse microrganismo (BEN et al., 2011; GELLATLY; HANCOCK, 2013).

Outro fato agravante para a virulência da *P. aeruginosa*, é sua habilidade de formar biofilme, sendo com isso capaz de inibir a fagocitose por células do sistema imune, conferindo desta forma vantagem na proteção bacteriana, além de atribuir maior resistência aos antimicrobianos. Além disso, a piocianina produzida por algumas cepas de *P. aeruginosa* é capaz de provocar dano ao epitélio respiratório, possuindo ação pró-inflamatória e formação de radicais hidroxila (SHIH; HUANG, 2002).

Pseudomonas aeruginosa tem sido descrito como o patógeno humano mais importante do gênero. Trata-se de um microrganismo versátil, com habilidade de causar diversos tipos de infecções, dentre elas podemos citar infecções do trato respiratório inferior, infecções primárias e secundárias da pele, infecções do trato urinário, infecções do aparelho auditivo (otites), infecções oculares, bacteremia, endocardite, dentre outras infecções (SADER et al., 2004; GALES et al., 2012).

Pacientes acometidos por uma destas infecções tem um aumento significativo das taxas de morbidade e mortalidade. No Brasil este patógeno tem sido a causa mais comum de infecções do trato respiratório, segundo em infecção do trato urinário e feridas cirúrgicas, e o quinto em infecção da corrente sanguínea. Dados da Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde da ANVISA, obtidos no período de julho de 2006 a Junho de 2008 mostraram que *P. aeruginosa* foi o quarto microrganismo mais isolado em infecção da corrente sanguínea (GALES et al., 2012).

Alguns grupos de pacientes correm maior risco de adquirir infecção por este microrganismo do que outros. Isso inclui pacientes imunocomprometidos, submetidos a procedimentos invasivos como, incisões cirúrgicas, inserção de cateteres urinários ou vasculares, tubos endotraqueais e queimados. Pacientes em UTIs estão particularmente, correndo risco, devido a baixa imunidade, doença de base, à presença de dispositivos invasivos e utilização de antimicrobianos de forma empírica (TRIGKA et al., 2011; ASHRAF; OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

A mortalidade atribuída a infecções por *P. aeruginosa* em pneumonia associada ao uso de próteses respiratórias ou bacteremia é substancial, especialmente para aqueles pacientes que receberam terapia empírica inadequada. As infecções adquiridas na comunidade, por pacientes imunocompetentes, tendem a ser localizadas e associadas ao contato com água ou soluções contaminadas,

destacando-se as foliculites e otites. As *P. aeruginosa* podem também acarretar infecções oculares devido ao uso de lentes de contato contaminadas, podendo causar úlcera de córnea e perda da função ocular, no entanto a infecção comunitária mais grave fica a cargo da endocardite decorrente do uso de drogas injetáveis ilícitas (FALAGAS; KOPTERIDES, 2006; POCH; OST, 2009).

As infecções por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento devido à existência de limitadas escolhas de agentes antimicrobianos. Essa espécie é intrinsecamente resistente a várias classes de antibióticos, além de ser capaz de adquirir novas resistências, seja através de elementos genéticos móveis (plasmídeo) ou de processos mutacionais que alteram a expressão e / ou função de mecanismos codificados cromossomicamente. Isolados resistentes estão associados a aumentos nas taxas de morbidade, mortalidade, tempo de internação e custo total do tratamento (WEBER et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa é tida portanto como o principal patógeno de importância médica, tanto em importância quanto em prevalência, do gênero dos BGN-NF. Em geral, as crianças com infecção por esse microrganismo apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparados àquelas sem infecção pela bactéria. Mais de 90% dos pacientes adultos são infectados por esse microrganismo (SAIMAN; SIEGEL, 2003; HAUSER et al., 2011).

1.1.4.2 *Acinetobacter* spp.

O gênero *Acinetobacter* compreende espécies de cocobacilos não fermentadores, imóveis, oxidase-negativos, catalase-positivos, aeróbios estritos e que utilizam diferentes fontes de carbono. São microrganismos incapazes de produzir esporos, pigmentos e fixar nitrogênio e apesar de amplamente distribuídos na natureza, também podem ser encontradas no ambiente hospitalar (GRIMONT; BOUVET, 1989; BERGOGNE-BEREZIN; TOWNER, 1996).

A taxonomia do gênero é complexa e tem sido modificada nos últimos trinta anos. Baseado na homologia do DNA, o gênero *Acinetobacter* compreende mais de

quarenta espécies, dentre as quais a identificação presuntiva pode ser realizada com base na carência da atividade de citocromo oxidase, ausência da motilidade e resistência à penicilina. A morfologia das bactérias em colorações de Gram é um indicativo inicial de que um isolado não fermentador pode pertencer ao gênero. Espécies de *Acinetobacter* apresentam um bom crescimento em meios sólidos utilizados na rotina de laboratórios de microbiologia clínica, e sua identificação bioquímica compreende provas bioquímicas básicas, entre as quais, destacam-se: fermentação de glicose, redução de nitrato a nitrito, utilização de citrato e outras fontes de carbono, e principalmente crescimento em caldo de infusão de cérebro e coração (caldo BHI) a 42°C (DIJKSHOON, 2007; PELEG et al., 2008).

Bactérias do gênero *Acinetobacter* apresentam uma grande capacidade de resistir em ambientes considerados hostis, sobrevivendo tanto em superfícies úmidas como em superfícies secas como a pele humana. Este grupo bacteriano possui algumas características importantes que favorecem a sua persistência no ambiente hospitalar: são, geralmente, resistentes à ação de muitos antimicrobianos, resistem aos desinfetantes, propagam facilmente de um paciente para outro, e são resistentes à dessecação, persistindo no ambiente por longos períodos (PELEG et al., 2012).

A importância clínica desta espécie está diretamente relacionada a sua capacidade de acometer qualquer órgão, o que permite o seu envolvimento em um amplo espectro de infecções, incluindo pneumonias, endocardites, bacteremia, meningite, peritonites, infecção do trato urinário e infecções de pele e ferida, porém sua maior prevalência é como agente de pneumonia nosocomial, particularmente, pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (PELEG et al., 2008).

A contaminação do ambiente clínico, hospitalização prolongada, patologias subjacentes, ausência das boas práticas de higienização das mãos são também apontados como fatores facilitadores da transmissão de *Acinetobacter* (PELEG et al., 2008).

Atualmente, as espécies de *Acinetobacter* têm um papel importante na colonização e infecção de pacientes hospitalizados. Em pacientes imunocomprometidos, as infecções tendem a ser mais graves e o tratamento destas infecções é problemático, podendo o microrganismo ser resistente a diferentes

classes de antibióticos. O tratamento específico deve ser guiado por testes *in vitro* e testes de suscetibilidade, porém o tratamento empírico contra infecções graves envolve, geralmente, um antibiótico beta-lactâmico e um aminoglicosídeo (MANCHANDA; SANCHAITA; SINGH, 2010).

Na maioria das vezes, acomete pacientes hospitalizados, que foram submetidos a procedimentos invasivos ou pacientes imunocomprometidos. Poucos trabalhos descrevem infecções por esta bactéria adquiridas na comunidade, sendo no entanto frequentemente isolados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (MARAGAKIS; PERL, 2008).

1.1.4.3 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas é um gênero encontrado nos mais variados nichos, podendo ser isolado de plantas, animais, invertebrados, sistemas de distribuição e tratamento de água, lagos, rios, solução de lentes de contatos, entre outros. Além disso, é descrito como um patógeno importante no contexto das infecções hospitalares. O gênero compreende um grupo de bactérias com alta diversidade genética, o que torna a sua taxonomia ainda não muito definida. Entre as espécies do gênero, destaca-se *S. maltophilia* pela sua importância clínica e relação com a problemática da resistência aos antimicrobianos (BROOKE, 2012).

A identificação correta implica na real compreensão da epidemiologia e disseminação da espécie. Esta espécie foi responsável por 4,3% (n=74,394) das infecções na América do Norte durante 1993-2004. Ainda na América do Norte no período de 1995-2008 a incidência de *S. maltophilia* aumentou de 6,7% para 12% em pacientes com fibrose cística (HAUSER et al., 2011).

Esta espécie pode ser identificada como um bastonete gram negativo, móvel por flagelos polar, não fermentadora de açúcares, aeróbio estrito, oxidase negativa, e positiva para catalase, DNase e esculina, e não crescem acima de 41°C. Essas características nem sempre se tornam claras para o microbiologista e estes isolados são constantemente identificados como outras espécies do gênero *Pseudomonas* ou *Burkholderia*. Até poucos anos o teste de oxidase para *S. maltophilia* podia ser +/- e

a DNAase necessita de 72 horas para confirmação. Além disso, *S. maltophilia* pode ser associada com infecções polimicrobianas e/ou crescer lentamente, o que resulta na dificuldade e isolamento destes isolados (ALMEIDA et al., 2005).

Stenotrophomonas maltophilia emergiu em infecções nosocomiais como um patógeno resistente e com altas taxas de mortalidade (entre 14% a 69%), porém de baixa virulência. Infecções associadas a esse microrganismo incluem: pneumonia, bacteremia, septicemia, endocardite, meningite, infecções de ferida cirúrgica, abscesso hepático e as infecções do trato urinário. Nas últimas décadas tem sido observado que paciente com câncer tem maior probabilidade de ter colonização/infecção por este patógeno. Considerado o terceiro BGN-NF mais frequente, perdendo apenas para *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* Fatores de risco para tais infecções incluem: doença de base, doenças respiratórias, dispositivos invasivos, sistema imune debilitado, uso prévio de antibacterianos, tempo de hospitalização (ALMEIDA et al., 2005).

A capacidade de formar biofilme é um dos fatores importantes para sua presença e aumento no ambiente hospitalar. Esta espécie já foi identificada em superfícies de materiais como crânulas, próteses, nebulizadores, água de consultórios dentários, entre outras. Dados do Programa de Vigilância *SENTRY Antimicrobial* durante 1997-2008 mostram que este isolado foi responsável por 2,3% das pneumonias na América Latina. *S. maltophilia* está entre os 15 principais patógenos em pacientes pediátricos na América Latina, e apesar da carência de estudos sobre sua frequência, é possível observar um aumento do mesmo ao longo dos anos (GALES et al., 2012; WU et al., 2013).

Assim como os demais BGN-FN, possui resistência intrínseca a vários antimicrobianos, e a exposição a estes aumenta a probabilidade de resistência por estes isolados. A resistência intrínseca pode se dar pela baixa permeabilidade da membrana celular, bombas de efluxo e enzimas que degradem ou alterem a molécula de antimicrobiano (ex.: beta-lactamases) (ALMEIDA et al., 2005; WU et al., 2013).

Stenotrophomonas maltophilia também é responsável por infecções adquiridas na comunidade, se tornando um problema não só hospitalar mas também ambiental, principalmente para pacientes com fibrose cística.

1.1.4.4 *Burkholderia cepacia*

O quarto grupo de BGN-NF envolvidos em infecções hospitalares e de difícil tratamento, devido a resistência intrínseca e adquirida, é o gênero *Burkholderia*. Este gênero inclui bacilos móveis, aeróbios e com ampla distribuição, sendo encontrados em diferentes nichos: água, solo, plantas, homem e demais animais, ambientes industriais e hospitalares. Algumas destas espécies são alvos de interesse biotecnológico e agrícola para o biocontrole e a biorremediação, porém outras espécies são causadoras de doenças em animais e humanos (*B. mallei* e *B. pseudomallei*); além de serem patógenos oportunistas associados à fibrose cística e doença granulomatosa crônica, no caso do *complexo B. cepacia* (que envolve cerca de dezessete espécies genômicas) (COENYEL et al., 2001).

Além da associação com fibrose cística, *B. cepacia* também pode causar infecções pulmonares em pacientes com doença granulomatosa crônica e, nestes casos, as infecções estão associadas com pneumonia e septicemia. O *complexo B. cepacia* pode ser encontrado no ambiente hospitalar causando outras infecções como bacteremia, principalmente em pacientes com cateteres, infecção do trato urinário, artrite séptica, peritonite e infecção do trato respiratório. Este gênero ainda apresenta importância como patógenos de plantas (SILVA-FILHO et al., 2002).

O gênero emergiu pelos altos níveis de resistência aos antimicrobianos, levando a uma alta taxa de mortalidade e morbidade por essas infecções. Em países como a Índia, este gênero é o terceiro BGN-NF mais frequente em infecções. Porém, estes indícios podem estar superestimados uma vez que sua identificação é complexa e muitas vezes confundidos com a espécie *P. aeruginosa* (GAUTAM; SINGHAL; RAY, 2011; ROOS; BOER, 2014; REGAN; BHATT, 2014).

A disponibilidade de testes rápidos e precisos permitem uma identificação mais ágil, o direcionamento do tratamento e a diminuição das taxas de mortalidade. Pacientes com fibrose cística tem apresentado prevalência dos isolados pertencentes ao *complexo B. cepacia*, *B. cenocepacia* e *B. multivorans*. Entre as infecções hospitalares, em pacientes sem fibrose cística, destacam-se as espécies

B. cenocepacia e *B. cepacia*, espécies dentro do Complexo (COUTINHO, 2007; LYNCH, 2009).

Pacientes com fibrose cística são considerados de alto risco para este gênero e podem desenvolver um quadro chamado de “síndrome *cepacia*” que é caracterizada pela presença de febre alta, insuficiência respiratória grave, leucocitose e elevada taxa de sedimentação dos eritrócitos. Indivíduos que desenvolvem esta síndrome podem ir a óbito em até seis meses (COUTINHO, 2007).

Além de amplamente distribuídas no ambiente, estes mesmos isolados podem estar presentes na indústria, contaminando principalmente indústrias do petróleo, combustível e abastecimento de água. A análise de isolados recuperados destes três ambientes, realizado por MLST (*Multilocus sequence typing*), mostra que as mesmas cepas são encontradas em amostras clínicas, do ambiente e da indústria. Isso ressalva a grande habilidade deste gênero em sobreviver em diferentes ambientes, o que é reflexo da extensa maquinaria enzimática codificada pelo seu amplo genoma.

A grande problemática destes isolados causando infecções está, mais uma vez, na sua resistência intrínseca, limitando as opções terapêuticas. O gênero é intrinsecamente resistente a diferentes antibióticos. O tratamento recomendado para isolados do gênero *Burkholderia* envolve o uso de um desses antimicrobianos: ceftazidima, minociclina ou meropenem. Porém a pressão seletiva exercida em cima destes isolados tem levado ao aumento da resistência a estes.

1.1.5 Legislação Brasileira

A RDC 11 preconiza o regulamento técnico para funcionamento dos serviços de diálise, enquanto que a água potável deve atender o disposto na Portaria MS Nº 2914 de 2011, de 12 de dezembro de 2011. Água tratada para diálise é a água cujas características são compatíveis com as exigências microbiológicas e químicas da RDC 11 de 2014 da ANVISA. Alguns dos itens descritos na legislação para a

garantia de segurança e qualidade dos procedimentos de diálise, são descritos a seguir (BRASIL, 2011; BRASIL, 2014).

- O Dialisato é a solução de diálise após a passagem pelo dialisador, na proporção indicada para uso.
- O conjunto do paciente (linhas e dialisador) reutilizável deve ser acondicionado separadamente em recipiente limpo, desinfetado, com identificação clara e precisa do nome do paciente, data da primeira utilização e grupo de reprocessamento.
- A assistência ao paciente com sorologia positiva para hepatite B (HBsAg+) deve ser realizada por profissional exclusivo durante toda a sessão de hemodiálise.
- Reuso em diálise é a utilização, para o mesmo paciente, do dialisador e linhas arteriais e venosas, por mais de uma vez, após os respectivos reprocessamentos, sendo que o reprocessamento em diálise é conjunto de procedimentos de limpeza, desinfecção, verificação da integridade e medição do volume interno das fibras, e do armazenamento dos dialisadores e das linhas arteriais e venosas.
- É vedado o reuso de dialisadores por pacientes com sorologia positiva para hepatite B, C e vírus da imunodeficiência humana (HIV).
- Os dialisadores e as linhas arteriais e venosas podem ser utilizados, para o mesmo paciente até 20 (vinte) vezes, quando utilizado reprocessamento automático.
- Só podem ser reutilizados dialisadores que apresentem capilares construídos com membrana biocompatível, sendo que o reuso de dialisadores e das linhas arteriais e venosas não é permitido para os pacientes portadores de HIV.
- Para fins de controle do reuso e descarte, dialisadores e linhas arteriais e venosas devem ser tratados como um único conjunto.
- É obrigatória a medida do volume interno das fibras (*priming*) em todos os dialisadores antes do primeiro uso e após cada reuso subsequente, mantendo arquivados os registros dos dados referentes a todos os testes.

- Após a medida do volume interno das fibras, qualquer resultado indicando uma redução superior a 20% do volume inicial, torna obrigatório o descarte do dialisador, independentemente do método empregado para o seu reprocessamento.
- Todos os valores da medida do volume interno das fibras dos dialisadores, obtidos tanto antes da primeira utilização como após cada reuso, devem ser registrados e assinados pelo responsável pelo processo e, permanecer disponíveis para consulta dos pacientes.
- A medida do volume interno das fibras deve ser feita por técnico ou auxiliar de enfermagem treinado na realização deste procedimento, usando vidraria graduada íntegra e com boas condições de leitura, sob supervisão do enfermeiro responsável. No caso do reuso automatizado a medida é fornecida pelo *display* da máquina.
- O serviço de diálise deve estabelecer e validar os protocolos de limpeza e esterilização dos dialisadores.
- Os dialisadores processados devem ser acondicionados em recipiente individualizado, com tampa, limpo e desinfetado.
- O recipiente de acondicionamento da solução esterilizante utilizada no processamento dos dialisadores deve possuir características que garantam a estabilidade da solução, conforme orientações do fabricante.
- O dialisador e o recipiente de acondicionamento devem possuir identificação legível, com nome completo do paciente ou outros mecanismos que impeçam a troca.
- O profissional do serviço deve apresentar ao paciente o dialisador, devidamente identificado com o registro da data do primeiro uso, antes de ser submetido à hemodiálise. O registro da utilização de um novo dialisador deve ser assinado pelo paciente e mantido no prontuário do mesmo.
- A água de abastecimento do serviço de diálise deve ter o seu padrão de potabilidade em conformidade com a normatização vigente.
- Deve ser verificada a qualidade bacteriológica da água tratada para diálise toda vez que ocorrer manifestações pirogênicas ou suspeitas de septicemia nos pacientes. Quando a contagem de bactérias ultrapassa a 50 unidades

formadoras de colônias por mL (UFC/ mL) a legislação brasileira prevê o nível de ação indicando a necessidade de adoção de providências para a identificação do foco de contaminação.

- Deve ser estabelecida uma rotina de coleta de amostras, com registro, de forma que anualmente as análises microbiológicas do dialisato tenham sido realizadas em amostras colhidas de todas as máquinas.
- Quando algum paciente apresentar sinais ou sintomas típicos de bacteremia ou reações pirogênicas durante a hemodiálise, deve-se proceder imediatamente à coleta de amostra e envio para análise, sem prejuízo de outras ações julgadas necessárias.

2 JUSTIFICATIVA

A água é o principal componente do tratamento por diálise. Tendo em vista que pacientes submetidos ao processo de hemodiálise por um período de três anos, ficam expostos a uma quantidade de água superior a utilizada por uma pessoa em condições normais de saúde durante toda a sua vida, suas qualidades química e microbiológica são essenciais para evitar riscos adicionais ao indivíduo. Além disto, o paciente renal crônico apresenta às vezes sintomas e intercorrências que necessitam tratamento por vários medicamentos, como antibióticos, fármacos antituberculose, antiarrítmicos cerebrais e miocárdicos, cardiotônicos, imunossupressores, sedativos, etc, que corroboram para um comprometimento imunológico, sendo com isto, mais susceptíveis a infecções.

Por esse motivo o desenvolvimento de programas de monitoramento periódico da qualidade microbiológica desta água tornou-se uma das principais medidas que podem contribuir de forma efetiva na segurança de pessoas submetidas ao tratamento, uma vez que, a falta de controle de qualidade da água, tem levado a óbito, vários pacientes.

Considerando a necessidade de uma fiscalização efetiva sobre a água utilizada na terapia renal substitutiva, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) desenvolve desde 1999, um programa de avaliação da qualidade da água utilizada em unidades de tratamento por hemodiálise em colaboração com a Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro.

Considerando que que bactérias Gram-negativas não fermentadoras podem se desenvolver rapidamente em águas, inclusive quando tratadas por deionização, destilação e osmose reversa; que estes microrganismos podem ser responsáveis pela ocorrência de bacteremias e endotoxemias em processos de hemodiálise, mesmo quando os níveis de contaminação microbiológica da água tratada estão em conformidade com padrões estabelecidos pela legislação; e que a água tratada e dialisatos podem ser reservatórios para várias espécies de *Pseudomonas*,

Acinetobacter, *Stenotrophomonas*, e outros bacilos Gram-negativos, torna-se necessário aprimorar o monitoramento microbiológico da água tratada, a fim de se conhecer as espécies potencialmente patogênicas, que possam estar presentes entre a população bacteriana afim de se estabelecer estratégias de controle da contaminação do sistema que atuem sobre este grupo de bactérias.

3 OBJETIVO

Determinar a qualidade microbiológica dos sistemas de água para o tratamento de hemodiálise, a partir da quantificação de microrganismos nos fluídos de diálise e água de abastecimento em 16 Unidades de Terapia Renal Substitutiva do município do Rio de Janeiro.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*, qualificando por meio destes, as amostras de água, de acordo com os limites preconizados na legislação vigente.

- Identificar a presença de microrganismos Gram negativos não fermentadores da glicose em amostras de água tratada para diálise e água de abastecimento, através de testes bioquímicos.

- Comparar com trabalhos anteriores realizados pelo programa de hemodiálise do INCQS.

4 METODOLOGIA

4.1 CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE

As amostras de água foram coletadas em 16 clínicas de hemodiálise do município do Rio de Janeiro, em colaboração com a Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro, no período de março a novembro de 2014.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de quatro pontos distintos do sistema de tratamento de água utilizado no processo de hemodiálise: amostras da água potável (pré-filtro), da água tratada para diálise (pós-osmose), da sala de reuso (dialisadores) e da solução de diálise (dialisato), em desesseis clínicas especializadas (do sistema público e privado) no município do Rio de Janeiro (Figura 4). As amostras foram coletadas semanalmente, de acordo com o calendário do programa de avaliação estabelecido entre o INCQS e as Vigilâncias Sanitárias do Município do Rio de Janeiro.

O volume coletado para cada amostra foi correspondente a aproximadamente 200 mL, sendo estes armazenados em frascos estéreis. Para a coleta do ponto da entrada da rede de abastecimento (pré-filtro) foi previamente adicionado 1,8% de tiosulfato de sódio a fim de se eliminar a interferência do cloro presente na água.

Nas coletas correspondente ao ponto da água potável e da água pós-osmose reversa, foi realizada uma desinfecção prévia com álcool 70% e gaze esterilizada, em seguida deixou-se a água escorrer por pelo menos trinta segundos para então coletar a amostra. As coleta foram acompanhadas por um técnico da Secretaria

Municipal de Saúde, e pelo responsável técnico da clínica e as amostras coletadas foram armazenadas no mesmo dia e mantidas sob refrigeração, em temperatura inferior a 10°C, até a realização das análises.

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A qualidade microbiológica da água nas amostras de água potável e de água para diálise, foram avaliadas conforme os valores máximos permitidos estabelecido na legislação brasileira vigente. Conforme mostrado nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, a seguir, os parâmetros avaliados incluem, segundo a RDC nº11 (BRASIL, 2014): a contagem de coliformes totais (ausência em 100 ml) e de bactérias heterotróficas (até 100 UFC/ml): Para água de diálise e para o dialisato (solução de diálise) é exigido a contagem de bactérias heterotróficas (até 200 UFC/ml). E segundo a Portaria nº 2.914 (BRASIL, 2011): a contagem de *Escherichia coli* (ausência em 100 ml) e coliformes totais (ausência em 100 ml) para água potável.

Tabela 1 – Parâmetros microbiológicos da água e da solução de diálise segundo a Resolução da RDC nº 11, de 13 de março de 2014

Componentes	Valor máximo permitido
Contagem de coliformes totais	Ausência em 100 mL
Contagem de bactérias heterotróficas	100 UFC / mL
Contagem de bactérias heterotróficas (colhida da máquina)	200 UFC / mL
Endotoxinas	2 EU / mL

Fonte: Adaptado BRASIL, 2014. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise. Nota: Nível de ação de 500 UFC / mL.

Tabela 2 – Parâmetros de água potável segundo a Resolução da Portaria nº 2.914 de 2011

PARÂMETRO	Valor máximo permitido
Entrada da rede de abastecimento	
Escherichia coli	Ausência em 100 ml
Coliformes totais	Ausência em 100 ml
Contagem de bactérias heterotróficas	500 UFC / ml

Fonte: Adaptado BRASIL, 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram preparados do setor de meio de cultivo do departamento de microbiologia de INCQS. Para as análises microbiológicas foram utilizados os métodos preconizados pela USP (2014).

4.3.1 Contagem de bactérias heterotróficas em água utilizada na preparação de solução para diálise

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada pelo método de contagem em placa de profundidade (“Pour Plate”). O procedimento para este método consiste no preparo de uma diluição 1:10, onde 1 mL da amostra é diluído em 9 mL de tampão fosfato, homogeneizando, caso necessário. Posteriormente 1 mL da diluição é inoculado em placas de Petri em duplicata. São adicionados aproximadamente 20 mL do meio APC (ágar padrão para contagem) em placa, previamente fundido e resfriado a 45-50°C, e homogeneizado através de movimentos rotatórios. Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

O procedimento para a contagem do número de colônias nas placas, que contenham até 300 colônias, foi realizado através de um contador de colônias, utilizando para isso a seguinte fórmula:

$$N = \frac{(\sum P_i)}{(\sum V_i)} D$$

- Onde:
- N = Número de UFC/1 g ou 1 mL
 - D = Inverso do fator da diluição utilizada
 - $\sum P_i$ = Somatório do número de colônias observadas nas duas placas da diluição escolhida para a contagem
 - $\sum V_i$ = Somatório do volume de teste em cada placa

A realização do cálculo de incerteza prosseguiu conforme o determinado segundo o Procedimento Operacional Padronizado do INCQS nº 65.1120.061 (MANUAL DE QUALIDADE, 2014). Quando as placas das diluições não apresentavam colônias, a contagem era registrada como sendo menor que uma vez o inverso da menor diluição (<10 UFC/ g ou mL). Por exemplo, se nenhum crescimento fosse detectado na diluição 1:10, a contagem seria expressa como menor que 10 UFC/ g ou mL.

4.3.2 Pesquisa de coliformes totais em água tratada do sistema de diálise

A determinação de coliformes das amostras de água do sistema de diálise foi realizada conforme a técnica de Presença / Ausência (PA). Para este procedimento, o frasco contendo a amostra de água era agitado vigorosamente, por aproximadamente 25 vezes. Posteriormente eram inoculados 100 mL da amostra em 50 mL de caldo PA em concentração tripla. O frasco contendo a mistura era então invertido por uma ou mais vezes, para completa homogeneização e posteriormente incubado por até 48 horas a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. Após 24 – 48 h era realizada a leitura dos resultados.

As amostras que tivessem apresentado crescimento com produção de ácido ou ácido e gás na análise presuntiva, eram então transferidas – uma alçada da

cultura – para um tubo contendo 10 mL de caldo verde brilhante bile lactose em tubo de Durhan, e incubadas por até 48 ± 3 h a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

O controle positivo do meio era verificado através do inóculo de uma alçada da cultura de *Escherichia coli* ATCC 8739 em 50 mL de caldo PA em concentração simples e em 10 mL do caldo verde brilhante bile lactose. O frasco era então incubado a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Após incubação os meios de cultura devem apresentar os seguintes aspectos:

*Caldo PA – turvação e acidificação, alterando a cor do meio para amarelo;
*Caldo verde brilhante bile lactose – turvação do meio e presença de gás no tubo de Durhan.

A presença dos coliformes é evidenciada através da fermentação da lactose e consequente acidificação do meio, com viragem do indicador violeta para amarelo. A acidificação com ou sem a produção de gás em 100 mL da amostra indica a presença de coliformes totais. A presença de gás no interior do tubo de Durhan confirma a presença de coliformes totais.

4.3.3 Pesquisa de *Escherichia coli* em água potável fornecida a centros dialíticos

A pesquisa da presença de *E. coli* nas amostras de água do abastecimento das clínicas de diálise (pré-filtro), foi verificada através do cultivo em ágar MacConkey; meio seletivo e Indicador de bactérias gram negativas fermentadoras de lactose (*Escherichia coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella*). O procedimento consiste no preparo e pré-incubação de uma diluição de 1:10, em 100 ml da amostra coletada, utilizando Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja). Após a incubação a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ durante 18 a 24 horas, o volume de 1 mL da amostra enriquecida é transferido para 100 mL de Caldo MacConkey, e novamente incubado a $43^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24 a 48 horas. Posteriormente era então realizado a subcultura em placa de Agar MacConkey e incubado a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, durante 18 a 72 horas.

O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, com micromorfologia característica de bacilo Gram-negativo, é indicativo da presença provável de *E. coli*, que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. A amostra de água portanto estaria de acordo com os parâmetros exigidos se não fosse observado crescimento de tais colônias ou se as provas microbianas fossem negativas.

4.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NA AMOSTRA DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE

As identificações bioquímicas foram realizadas de acordo com MURRAY e colaboradores (2007). Bactérias Gram negativas não fermentadoras são identificadas através de testes como: fermentação-oxidação da glicose, mobilidade, presença da oxidase, presença da catalase, crescimento em ágar Mac Conkey, utilização de carboidratos e produção de gás, descarboxilação de aminoácidos, crescimento em diferentes concentrações de NaCl, incubação em diferentes temperaturas, detecção do indol, utilização do citrato, Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), utilização da uréia, detecção de DNase, detecção de H₂S, utilização do amido, produção de pigmento, presença de flagelo e outras provas complementares quando necessário. Paralelamente a cada prova bioquímica eram semeados os controles negativos e positivos de cada um dos respectivos testes, conforme o indicado nas Tabelas 3 e 4 a seguir.

Tabela 3 - Microrganismos de referência utilizados neste trabalho

Microrganismos de referência	
<i>Staphylococcus aureus</i>	INCQS 00039 (ATCC 6538)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	INCQS 00230 (ATCC 9027)
<i>Escherichia coli</i>	INCQS 00219 (ATCC 8739)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	INCQS 00103 (ATCC 13637)
<i>Bacillus subtilis</i>	INCQS 00001 (ATCC 6633)
<i>Enterobacter cloacae</i>	INCQS 00074 (ATTCC 13047)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	INCQS 00198 (SSI 5)
<i>Salmonella spp.</i>	INCQS 00150 (ATCC 14028)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	INCQS 00143 (ATCC 19606)
<i>Bacillus cereus</i>	INCQS 00003 (ATCC 11778)
<i>Morganella morganii</i>	INCQS 00082 (ATCC 00082)
<i>Brevundimonas diminuta</i>	INCQS 00070 (ATCC 11568)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ATCC 27062
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 17588
<i>Enterobacter aerogenes</i>	INCQS 000145 (ATCC 13048)

Fonte: POP 65.3210.008 – Anexo F – fl.4 – Rev.14 (MANUAL DA QUALIDADE, 2014).

Tabela 4 - Provas bioquímicas complementares para BGN-NF

Provas	Controle Positivo	Controle Negativo
Mac Conkey	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Catalase	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
Oxidase	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
H₂S	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
Indol	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Mobilidade	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Pigmento	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Piocianina	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Glicose	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>
Xilose	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>
Manitol	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>
Lactose	<i>E. coli</i>	<i>M. morgannii</i>
Sacarose	<i>E. coli</i>	<i>M. morgannii</i>
Maltose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Trealose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Frutose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Galactose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Manose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Raminose	<i>E. coli</i>	<i>B. diminuta</i>
Esculina	<i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cresc. 6% NaCl	<i>A. xylooxidans</i>	<i>B. diminuta</i>
Cresc. 6.5% NaCl	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Cetrimide	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Ureia	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Nitrato	<i>E. coli</i>	<i>A. lwoffii</i>

Provas	Controle Positivo	Controle Negativo
Cresc. 42°C	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Lisina	<i>S. maltophilia</i>	<i>E. aerogenes</i>
Arginina	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Ornitina	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. aerogenes</i>
DNase	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Amido	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Gelatina	<i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i>
VM	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
VP	<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>
Citrato de Simmons	<i>E. coli</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
Agar Tween 80	<i>S. maltophilia</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>

Fonte: POP 65.3210.008 – Anexo F – fl.4 – Rev.14 (MANUAL DA QUALIDADE, 2014). BGN-NF: bacilos Gram negativos não-fermentadores.

A partir das placas APC que apresentassem crescimento de colônias após as 24h de incubação, eram realizados testes bioquímicos necessários para a identificação de possíveis BGN-NF. Cada colônia com características morfológicas distintas, eram então repicadas para tubos de ágar tripticaseína de soja inclinados, e novamente incubadas na estufa, a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, por mais 24h de crescimento a fim de se obter material suficiente para prosseguir com a identificação bioquímica.

– Triagem inicial

As primeiras provas bioquímicas a serem realizadas foram: coloração de Gram, SIM (que reunia o teste de motilidade, produção de Indol e produção de H₂S), prova da oxidação, OF glicose (oxidação da glicose), e crescimento em ágar Cetrimide e Mac Conkey (meios seletivos para BGN-NF). Estas primeiras provas visavam selecionar apenas BGN-NF para realizar a identificação completa a nível de

espécie. Conforme já descrito neste trabalho, os controles negativos e positivos de cada prova eram também semeados, paralelamente a amostra.

As características das colônias após a incubação em ágar Mac Conkey, por 24h a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, foram analisadas macroscopicamente quanto ao tamanho, forma, consistência, cor e produção de pigmento, sendo por vezes necessário a observação após 72 h de incubação, devido ao crescimento lento de algumas BGN-NF (BRASIL, 2008).

– Coloração de Gram

Após o preparo dos esfregaços das culturas, sobre lâminas limpas, previamente desengorduradas e fixadas na chama do bico de Bunsen por três a quatro vezes, estes eram então submetidos ao método de coloração de Gram (KONEMAN, 2008), conforme as etapas descritas a seguir:

- Colocar a lâmina sobre um suporte para coloração e cobrir a superfície com solução de cristal violeta por 1 minuto, em seguida lavar o esfregaço em água corrente ou destilada.
- Cobrir o esfregaço com solução de Lugol, durante 1 minuto. Lavar, com água corrente ou destilada.
- Descorar a preparação com solução de álcool-acetona (60% - 40%). Lavar imediatamente com água corrente ou destilada.
- Cobrir a superfície da lâmina com solução safranina, durante 30 segundos. Lavar com água corrente ou destilada.
- Escorrer o excesso de água e secar a temperatura ambiente e examinar ao microscópio.

Bacilos gram negativos eram selecionados para posterior identificação.

– Citocromo oxidase

A partir do crescimento em tripticaseína de soja inclinado, era transferido uma alçada bacteriológica de platina ou bastão de madeira estéril, para uma tira de papel de filtro impregnada com solução de N,N-dimetil-p-fenilendiamino. Alças bacteriológicas de níquel-cromo não poderiam ser utilizadas neste procedimento, afim de se evitar uma interferência, levando a um resultado falso-positivo.

- Teste positivo: Desenvolvimento de coloração rosa à púrpura em 10 a 30 segundos.
- Teste negativo: Ausência de coloração.

As bactérias que produzem oxidase apresentam um sistema de transporte de elétrons denominado sistema citocromo oxidase. A determinação da oxidase é um teste diferencial importante na diferenciação de bactérias Gram negativas. (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC9027 de *P. aeruginosa* e ATCC 6538 de *S. aureus*, respectivamente.

– Fermentação-oxidação da glicose

Alçadas do crescimento em ágar tripticaseína de soja inclinado eram inoculadas em profundidade em 2 tubos contendo 3 ml de meio semi-sólido para fermentação de glicose (OF glicose), um dos tubos deverá ser coberto com óleo mineral estéril, enquanto o outro não. Após 24 h de incubação a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, a coloração do meio era então observada.

Havendo mudança no meio com óleo mineral para amarelo, o microrganismo em questão era considerado positivo para a prova e portanto fermentador da glicose. Com a permanência do meio na cor esverdeada o microrganismo era considerado negativo para a prova e portanto não fermentador da glicose. A mudança no tubo sem óleo mineral indicava se o microrganismo era capaz de oxidar ou não a glicose. (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 8739 de *E. coli* e ATCC 19606 de *A. baumannii*, respectivamente.

– Fermentação-oxidação dos demais açúcares

Assim como na OF glicose, alçadas do crescimento em ágar tripticaseína de soja inclinado eram inoculadas em profundidade em tubos contendo 3 ml de meio semi-sólido para fermentação dos açúcares: xilose, manitol, lactose, sacarose, malose, trealose, frutose, galactose, manose e raminose, mas sem a adição do óleo mineral estéril. Após 24 h de incubação a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, a coloração do meio era então observada.

Com a mudança no meio com óleo mineral para amarelo, o microrganismo era considerado positivo para a prova e portanto fermentador do açúcar em questão, e com a permanência do meio na cor esverdeada o microrganismo era considerado negativo para a prova e portanto não fermentador daquele açúcar. A mudança no tubo sem óleo mineral indicava se o microrganismo era capaz de oxidar ou não o açúcar do meio (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para estes testes encontram-se descritos nas tabelas já apresentadas neste trabalho.

– Prova da motilidade, produção de Indol e produção de H₂S

Com o auxílio de uma agulha bacteriológica, semear uma alçada em um tubo contendo meio SIM semi-sólido, contendo triptona, citrato ferroso de amônio e tiosulfato de sódio para detecção de H₂S. A semeadura deve ser feita no centro do tubo, em uma picadura única de $\frac{3}{4}$ de profundidade do tubo. O meio deve ser incubado por 24 h a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

O objetivo desta prova é detectar a mobilidade do microrganismo, através da turvação ou não-turvação do meio, a produção de H₂S, pela precipitação deste no meio, e a produção do indol através da ação da enzima triptofanase sobre o triptofano presente no meio, ocorrendo a produção de ácido pirúvico e amônia, observado pela formação de um anel rosa (pink) na parte superior do tubo, após a adição de 0,5 ml do reagente Kovacs (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para a motilidade, produção do indol e produção de H₂S, encontram-se descritos nas tabelas já apresentadas neste trabalho.

– Detecção de piocianina

Cerca de 1 mL de clorofórmio era transferido para a superfície de uma placa de ágar Cetrimide previamente incubada por 24h, a $32,5 \pm 2,5$ a partir do repique do tubo de tripticaseína de soja inclinado. Após o acréscimo, o clorofórmio era então removido para um tubo de ensaio (13 x 100 mm), onde era observado se houve a coloração do mesmo (KONEMAN, 2008):

- Coloração azul - Presença de piocianina.
- Incolor - Ausência de piocianina.

Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC9027 de *P. aeruginosa* e ATCC 6538 de *S. aureus*, respectivamente.

– Crescimento a $42 \pm 1^\circ\text{C}$

Uma alçada bacteriológica era transferida para tubos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion). Os tubos foram incubados a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ em banho termostático durante 48 ± 3 horas (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 9027 de *P. aeruginosa* e ATCC 6538 de *S. aureus*, respectivamente.

– Desoxirribonuclease (DNase)

A partir das culturas em ágar tripticaseína de soja inclinado, era feito o repique para uma placa contendo ágar desoxirribonuclease (ágar DNase), que era posteriormente incubada a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

Cepas de alguns microrganismos produzem DNase e endonuclease termoestável. Estas enzimas hidrolisam o ácido desoxirribonucleico (DNA) contido no meio de cultura após um período de incubação. Posteriormente este meio é

acidificado com HCl 1N (ácido clorídrico) para a revelação da prova. A formação de uma zona incolor ao redor do crescimento indica reação positiva (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 6538 de *S. aureus* e ATCC 8739 de *E. coli*, respectivamente.

– Prova da catalase

Com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, uma cultura de 18 a 24 horas em ágar tripticaseína de soja inclinado era transferida para uma lâmina de vidro previamente limpa e desengordurada, e uma gota de peróxido de hidrogênio a 30% era adicionado a lâmina.

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio, e portanto a produção de bolhas na presença do H_2O_2 significa um resultado positivo para esta prova, enquanto a não produção significa um resultado negativo (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 9027 de *P. aeruginosa* e INCQS 00198 (SSI 5) de *S. epidermidis*, respectivamente.

– Prova das descarboxilases

Uma alçada da cultura em ágar tripticaseína de soja inclinado era inoculada cada em caldo, lisina, arginina e ornitina, separadamente, e posteriormente os caldos eram cobertos com 03 ml de óleo mineral estéril e incubados por 24 – 96 horas a $32,5 \pm 2,5^\circ C$.

Descarboxilases são um grupo de enzimas com substrato específico, capazes de reagir com o grupo carboxila dos aminoácidos para fornecerem aminas alcalinas. Essa reação, conhecida como descarboxilação, origina dióxido de carbono como produto secundário. Emprega-se normalmente três aminoácidos para identificação dos microrganismos: lisina, ornitina e arginina. Os produtos aminados específicos, são: Lisina - Cadaverina; Ornitina - Putrescina; Arginina - Citrulina. As cepas que apresentassem reação alcalina (cor púrpura) em todo meio eram consideradas

positivas para o teste (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para estes testes encontram-se descritos nas tabelas já apresentadas neste trabalho.

– Produção de urease

A partir do crescimento em ágar tripticaseína de soja inclinado, uma alçada era semeada por estriamento, na superfície inclinada e incubada a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 – 48h.

Há bactérias que possuem a enzima uréase, capaz de degradar a uréia presente no meio liberando amônia, CO_2 e H_2O . A amônia reage formando carbonato de amônia que alcaliniza o meio. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que em meio alcalino torna a coloração do meio rosa. Uma coloração meio rosa é suficiente para considerar a reação positiva (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 6538 de *S. aureus* e ATCC 8739 de *E. coli*, respectivamente.

– Prova de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho metila (VM)

Um tubo contendo caldo vermelho metila – Voges Proskauer era semeado a partir de uma alçada bacteriológica do crescimento em ágar tripticaseína inclinado e incubado por 48 ± 3 h a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$. Os testes, vermelho de metila (VM) e Voges Proskauer (VP), avaliam respectivamente as bactérias que fermentam a glicose pela via ácida mista, com a produção de vários ácidos (ácido fórmico, láctico, acético), e as que utilizam a fermentação butilenoglicólica, produzindo acetil-metil-carbinol (acetoína), butilenoglicol e pequenas quantidades de ácidos. Estes testes bioquímicos são baseados no resultado final do metabolismo do ácido pirúvico para identificar bactéria da família *Enterobacteriaceae* e diferenciar espécies da mesma. (KONEMAN, 2008).

Após o crescimento 1 ml da cultura era transferido para um tubo vazio, onde era adicionado 0,6 ml de solução de alfa naftol e 0,2 mL de uma solução aquosa de

KOH a 40% agitando a mistura. Após 2h a leitura era realizada de forma que, havendo o desenvolvimento de uma coloração rósea, a reação era considerada positiva para o teste VP. Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 13047 de *E. cloacae* e ATCC 8739 de *E. coli*, respectivamente.

No restante da cultura obtida em caldo vermelho de metila – Voges Proskauer, 5 gotas da solução vermelho metila eram adicionadas, onde o desenvolvimento de uma coloração vermelha indicava reação positiva ao teste VM. Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 8739 de *E. coli* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Prova da redução de nitrato

A partir do crescimento em ágar tripticaseína de soja inclinado era inoculado uma alçada bacteriológica no caldo nitrato e incubado por $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 24 h. Após o período de incubação 1 ml dos reagentes A e B, onde A era uma solução aquosa de α -Naftilamina 0,5% ou dimetil-I-naftilamina a 0,6%, e B era uma solução aquosa de ácido Sulfanílico a 0,8%.

O desenvolvimento de uma coloração vermelha indicava um resultado positivo para a redução do nitrato. Em caso de resultado negativo (ausência da coloração vermelha), 20 mg de pó de zinco eram adicionados para a confirmação do mesmo, onde a coloração vermelha neste caso confirmaria o resultado negativo, eliminando a possibilidade de interferência pela presença de nitrogênio livre.

A habilidade de reduzir nitrato é valiosa para a diferenciação e identificação de vários tipos de bactérias, especialmente da família Enterobacteriaceae. Não fermentadores e outros diversos bacilos gram-negativos variam em sua habilidade de reduzir nitrato (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 8739 de *E. coli* e INCQS 00198 (SSI 5) de *S. epidermidis*, respectivamente.

– Utilização do citrato como única fonte de carbono

Com auxílio de uma agulha bacteriológica, um leve inóculo do crescimento em tripticaseína de soja inclinado era semeado e em meio sólido de citrato de Simmons inclinado, perfurando o meio e deslizando a agulha no bisel em linha reta.

O ágar citrato Simmons é recomendado para a diferenciação de membros da família Enterobacteriaceae com base na utilização do citrato. O meio contém azul de bromotimol que é o indicador de pH, e com a utilização do citrato ocorre a alcalinização do meio, indicado pela alteração da cor do indicador de verde para o azul.

Após o período de incubação a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por até 96 h, era verificado o crescimento, com a mudança da cor do meio (verde) para azul no caso de reação positiva a utilização do citrato, ou a ausência de crescimento e inalteração da cor do meio em caso de reação negativa a utilização do citrato (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 8739 de *E. coli* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Hidrólise da Esculina

A partir de uma alçada do crescimento em tripticaseína de soja inclinado o meio ágar bile-esculina era semeado em estria na superfície do meio, e incubado por 24 – 48h a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$.

O produto hidrolisado reage com o composto férrico do meio proporcionando um precipitado negro intenso nas provas positivas. A coloração ocorre devido a produção de pigmentos por alguns BGN-NF. Em caso de um resultado negativo, o meio permanece em sua cor castanha (KONEMAN, 2008; ANVISA 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 13637 de *S. maltophilia* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Hidrólise da gelatina

Do crescimento em tripticaseína de soja inclinado, uma alçada bacteriológica era retirada e inoculada em meio gelatina e inoculada por 24 h a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. A prova determina a habilidade de um organismo produzir enzimas proteolíticas a gelatinase, capaz de hidrolisar a gelatina. Quando a gelatina se hidroliza, ela perde sua propriedade gelatinosa e se liquefaz.

Alguns grupos de bactérias, como a *Enterobacteriaceae*, produzem a enzima gelatinase. Após o período de incubação, o meio inoculado deve ser levado a geladeira por um período de 2 h, se após este período o meio estiver liquefeito o microrganismo é considerado positivo para o teste. (KONEMAN, 2008; ANVISA 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 13637 de *S. maltophilia* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Hidrólise do Tween 80

A partir do crescimento em tripticaseína de soja inclinado, era semeado, em forma de “spot”, em uma placa de ágar Tween-80 em uma concentração 1% (v/v) que era posteriormente incubada por 24 h a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

Após o crescimento a observação de um halo transparente ao redor do inóculo é indicativo de um resultado positivo para prova, confirmando com isso a presença da enzima lipase (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 13637 de *S. maltophilia* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Hidrólise do amido

A partir de uma alçada bacteriológica do crescimento em ágar tripticaseína de soja inclinado, era semeado uma placa de ágar contendo amido, em “spot”. Após 24 h de incubação na estufa a $32,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$, a leitura da prova era realizada, com a adição de lugol, de forma a se cobrir toda a superfície da placa.

A presença do amido no meio impossibilita a sua coloração pelo lugol, logo a prova é considerada positiva se for observada mudança na coloração do meio (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 6633 de *B. subtilis* e ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, respectivamente.

– Crescimento em solução aquosa de NaCl 6% e 6,5%

Uma a duas colônias eram semeadas do crescimento do ágar tripticaseína de soja inclinado para caldos contendo solução aquosa de NaCl nas concentrações 6% e 6,5% separadamente, após o período de incubação por 24 h de a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ era observado se ocorrera a presença de turbidez no meio, indicativa de crescimento e consequentemente de tolerância do microrganismo a estas concentrações de NaCl (KONEMAN, 2008). Os controles positivos e negativos utilizados para este teste foram, ATCC 27062 de *A. xylosoxidans* e ATCC 11568 de *B. diminuta*, para NaCl 6% e ATCC 6633 de *P. stutzeri* e ATCC 17588 de *P. aeruginosa* para NaCl 6,5%, respectivamente.

5 RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 16 das 32 clínicas de hemodiálise do município do Rio de Janeiro. A coleta das amostras obedeceu o calendário do programa de avaliação da qualidade da água utilizada em unidades de tratamento por hemodiálise que o INCQS desenvolve em parceria com a Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro.

Das 16 clínicas avaliadas, foram coletadas amostras de quatro pontos distintos de cada clínica: da torneira de abastecimento de água (água potável, pré-osmose reversa), da torneira do filtro de osmose reversa (pós-osmose reversa), da máquina de diálise (amostra da solução de hemodiálise) e a amostra do reuso do dialisador. Foram portanto um total de 61 amostras, uma vez que três das dezesseis clínicas analisadas neste presente trabalho não trabalhavam com o reuso do dialisador.

Neste estudo foi avaliado a qualidade microbiológica da água de hemodiálise conforme o preconizado na legislação vigente, bem como a presença de BGN-NF nestas mesmas amostras avaliadas. Das dezesseis clínicas avaliadas neste trabalho, sete (43,75%) tiveram o resultado insatisfatório quanto a quantidade de bactérias heterotróficas, cujos valores excederam aos limites estipulados na RDC 11, enquanto que, em nenhuma das clínicas foi observado a presença de coliformes fecais e *E. coli* (Tabela 5 a seguir).

Tabela 5 – Qualidade microbiológica da água do sistema de hemodiálise de 16 clínicas de terapia renal substitutiva, no período de março a novembro de 2014 e microrganismos isolados nas amostras

Amostras	Origem da amostra	Contagem de bactérias (UFC/mL)		Microrganismos isolados	Laudo
		Coliformes totais	Bactérias heterotróficas		
A1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
A2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
A3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
A4	reuso	Ausência em 100 mL	-	-	-
B1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
B2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>S. maltophilia</i>	Insatisfatória
B3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>S. maltophilia</i>	Insatisfatória
B4	reuso	Ausência em 100 mL	-	-	-
C1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
C2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
C3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
C4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
D1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
D2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
D3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
D4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
E1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
E2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
E3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
E4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória

Amostras	Origem da amostra	Contagem de bactérias (UFC/mL)		Microrganismos isolados	Laudo
		Coliformes totais	Bactérias heterotróficas		
F1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
F2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>S. maltophilia, S. multivorum</i>	Insatisfatória
F3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Insatisfatória
F4	reuso	Ausência em 100 mL	>100	<i>S. maltophilia, S. multivorum</i>	Insatisfatória
G1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
G2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
G3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
G4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
H1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
H2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>Moraxella osloensis, P. aeruginosa</i>	Insatisfatória
H3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>P. aeruginosa</i>	Insatisfatória
H4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
I1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
I2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>Brurkholderia cepacia, S. maltophilia</i>	Insatisfatória
I3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>Brurkholderia cepacia</i>	Insatisfatória
I4	reuso	Ausência em 100 mL	>100	<i>Brurkholderia cepacia</i>	Insatisfatória

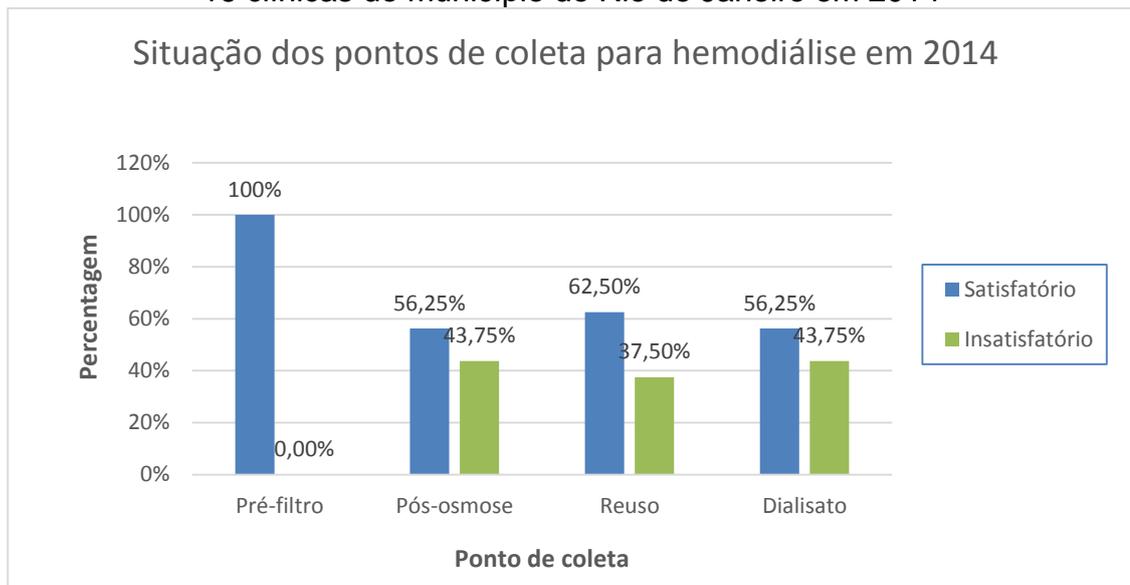
Amostras	Origem da amostra	Contagem de bactérias (UFC/mL)		Microrganismos isolados	Laudo
		Coliformes totais	Bactérias heterotróficas		
J1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
J2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
J3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
J4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
L1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
L2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Insatisfatória
L3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> , <i>B. diminuta</i>	Insatisfatória
L4	reuso	Ausência em 100 mL	>100	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Insatisfatória
M1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
M2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>S. paucimobilis</i> , <i>Ralstonia pickettii</i>	Satisfatória
M3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Satisfatória
M4	reuso	Ausência em 100 mL	-	-	-
N1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
N2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>Acinetobacter lowoffii</i>	Insatisfatória
N3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>A. lowoffii</i> , <i>A. denitrificans</i>	Insatisfatória
N4	reuso	Ausência em 100 mL	>100	<i>Acinetobacter lowoffii</i>	Insatisfatória

Amostras	Origem da amostra	Contagem de bactérias (UFC/mL)		Microrganismos isolados	Laudo
		Coliformes totais	Bactérias heterotróficas		
O1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
O2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	>100	<i>Brevundimonas diminuta</i>	Insatisfatória
O3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	>200	<i>B. diminuta, P. aeruginosa, M. osloensis</i>	Insatisfatória
O4	reuso	Ausência em 100 mL	>100	<i>B. diminuta, P. aeruginosa</i>	Insatisfatória
P1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
P2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
P3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
P4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
Q1	pré-filtro	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
Q2	pós-osmose reversa	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
Q3	solução de diálise	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória
Q4	reuso	Ausência em 100 mL	<10	-	Satisfatória

Fonte: Próprio autor

Conforme demonstrado na Figura 5 a seguir, para as análises realizadas no período de março a novembro de 2014, o número de insatisfatoriedade por ponto de coleta foram: pós-osmose – 43,75%; reuso – 37,50%; e dialisato 43,75%. Para o ponto da água potável não houve resultados insatisfatório.

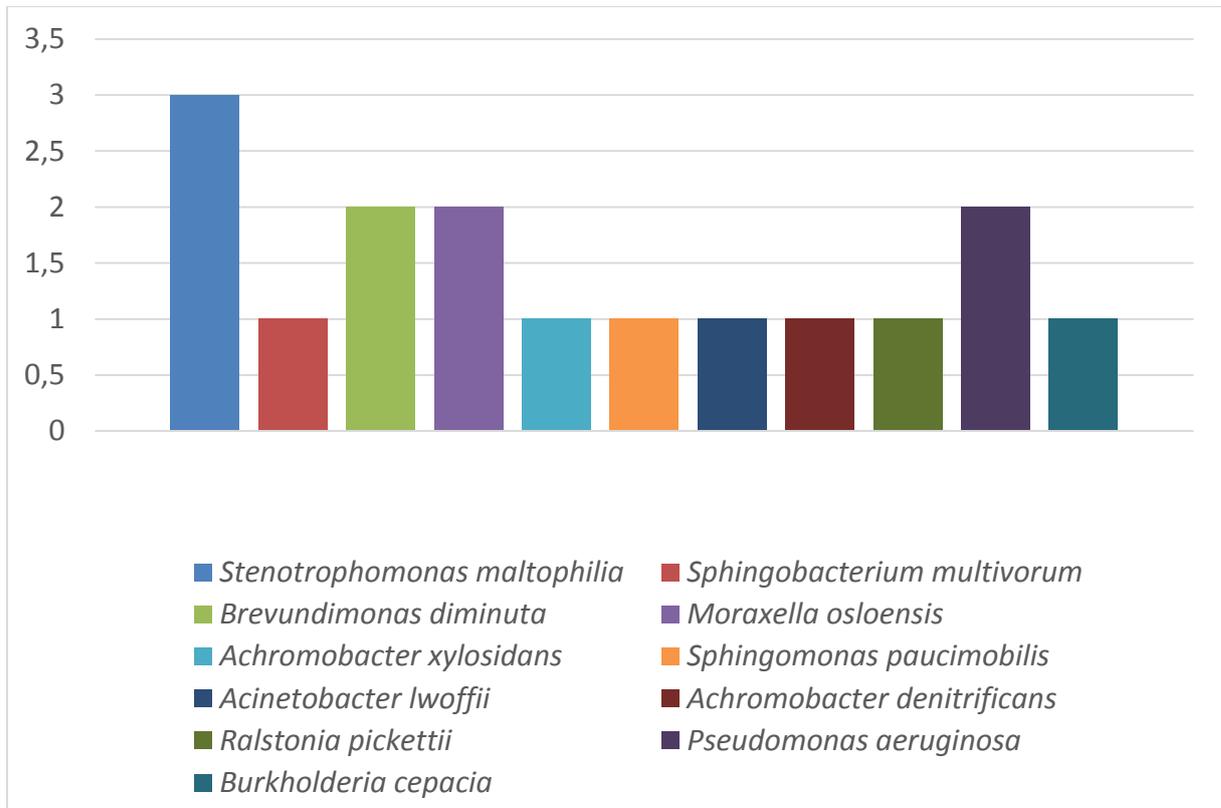
Figura 5 – Situação dos pontos de coleta do sistema de água de hemodiálise de 16 clínicas do município do Rio de Janeiro em 2014



Fonte: Próprio autor

Observando a Figura 6 a seguir, é possível perceber que dos BGN-NF identificados neste trabalho, o mais recorrente nas clínicas avaliadas foi *Stenotrophomonas maltophilia*, isolada em três diferentes clínicas de UTRS (18,75%), enquanto os microrganismos de segunda maior ocorrência foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevundimonas diminuta*, *Moraxella osloensis*, cuja presença foi notada em pelo menos duas diferentes clínicas de UTRS (12,5%), dos encontrados em apenas uma das clínicas de UTRS (6,25%), estão *Sphingobacterium multivorum*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Achromobacter denitrificans*, *Ralstonia pickettii* e *Burkholderia cepacia*.

Figura 6 – Quantidade de clínicas em que cada microrganismo foi isolado neste trabalho



Fonte: Próprio autor

6 DISCUSSÃO

O INCQS, desde 1999, estabeleceu em parceria com a Coordenação de Vigilância Sanitária do estado do Rio de Janeiro e a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância, e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro um programa de fiscalização da qualidade da água do sistema das UTRS do município do Rio de Janeiro. A criação desse programa nasceu da necessidade observada em decorrência de recorrentes problemas de contaminação reportados na literatura, e da evidência direta na sobrevida dos pacientes em processo de hemodiálise (KLAASSEN, 2008).

O programa que até hoje perdura permitiu um acompanhamento, estudo e implementação de ações que contribuíram positivamente com a melhora da qualidade de vida de pacientes submetidos ao processo de hemodiálise no município do Rio de Janeiro. Através da constatação dos problemas relacionados à qualidade da água de diálise foram dadas pelo programa sugestões de melhorias na desinfecção de máquinas e equipamentos, manuseio correto dos profissionais envolvidos, monitoramento da qualidade da água pela clínica e demais ações que visavam melhor saúde para os pacientes. As atividades empregadas acarretaram em avanço positivo no resultado das análises de água com o decorrer dos anos, bem como na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

Ferreira (2009) evidenciou esta melhora em seus estudos, ao comparar os resultados das análises ao longo destes anos. De acordo com o autor, durante o período de 1999 a 2003, os resultados obtidos no INCQS mostravam um quadro de 69,77% de insatisfatoriedade nas análises microbiológicas para a água. A preocupação com os resultados levou a determinação de um nível de ação de 50 UFC/mL referente à contagem de bactérias heterotróficas por parte do Programa de Hemodiálise do INCQS, que foi acatado e incluído na resolução nº 159 revisada em 2006 (BRASIL, 2006) que substituiu a Portaria nº. 82/200 (BRASIL, 2000). Este nível de ação estabelecido pela AAMI, *Association for the Advanced of Medical Instrumentation* (AAMI, 2001, 2004) é até hoje recomendado na resolução mais recente, a RDC nº11 de 2014 (BRASIL, 2014).

A RDC nº11 de 2014 define “nível de ação” como parâmetro que indica a necessidade de adoção de providências para identificação do foco de contaminação.

Conforme o apontado por Ferreira (2009), o cumprimento deste nível de ação pelas clínicas de hemodiálise repercutiu positivamente na melhora do resultado das análises subsequentes, resultando maior qualidade da água de hemodiálise, uma vez que de 2004 a 2006, o percentual de amostras insatisfatórias analisadas pelo Programa foi reduzido para 6,99% de insatisfatoriedade.

Nóbrega (2010) em um estudo também relacionado ao Programa de hemodiálise / INCQS, constatou nas análises da água de hemodiálise correspondentes a 20 clínicas de UTRS no período de 2007 a 2009, uma insatisfatoriedade de: 24, 42% no ponto de pós-osmose, 34,88% no ponto de reuso, 30,23% no dialisato, enquanto que em 2008, os resultados insatisfatórios foram 15,79% no ponto pós-osmose, 13,69% no ponto de reuso e 14,74% no dialisato, em 2009 o resultado foi de 2,20% na pós-osmose, 4,50% no reuso e 6,98% no dialisato.

A redução da contaminação bacteriana nos 3 anos de estudos realizados por Nóbrega (2010), da mesma forma que evidenciam a importância do monitoramento constante do Programa frente a melhora na qualidade da água do sistema de diálise, também comprovam as dificuldades de se alcançar padrões de qualidade satisfatórios e permanentes, uma vez que ao se comparar com os resultados de Ferreira (2009) é possível notar um aumento considerável de contaminação na água entre 2006 e 2007, e o mesmo pode ser dito em relação ao presente trabalho, em que novamente notamos um alto índice de contaminação (43,75%) nas 16 clínicas analisadas no ano de 2014, o que evidencia a necessidade em se continuar buscando melhorias e soluções que resolvam em definitivo os problemas recorrentes de contaminação nas amostras de água, uma vez que estes problemas repercutirão na saúde do paciente em tratamento de hemodiálise.

Não obstante, a Vigilância Sanitária vem tentando por meio de portarias e resoluções estabelecer medidas que solucionem o problema da constante falta de qualidade na água utilizada no processo de hemodiálise. Em 2004 foi publicada a resolução RDC nº 154/2004 (revisada em 2006), onde foi estabelecido um controle mais rigoroso para a água de hemodiálise (BRASIL, 2006), além de todo o regulamento técnico que permeia o funcionamento dos serviços de diálise. Com a mesma preocupação, foi publicada uma nova resolução em 2008, para regulamentar o sistema de tratamento e distribuição da água tratada para hemodiálise, a RDC nº 33/2008 (BRASIL, 2008). Entretanto, como havia serviços de diálise, não abrangidos

pela RDC nº 154/2004, foram estabelecidos parâmetros para execução de procedimentos dialíticos em ambiente hospitalar, por meio da Nota técnica nº 006/2009 (BRASIL, 2009) e em 13 de março de 2014 foi publicada a RDC nº 11, que dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise empregadas no presente (BRASIL, 2014).

Em 2013, ano em que o levantamento bibliográfico referente ao presente estudo iniciou, a legislação que vigorava em relação aos parâmetros referentes a qualidade da água de hemodiálise era a RDC nº 154 de junho de 2004 (BRASIL, 2006), no entanto antes do início dos experimentos deste estudo a legislação em vigor passou a ser atual RDC nº 11 (BRASIL, 2014). A mudança mais importante em relação a estas duas resoluções foi a que se refere aos limites de contagem de bactérias heterotróficas, tanto nos pontos de pós-osmose reversa e reuso, como no ponto do dialisato, exposto na Tabela 7 a seguir.

Tabela 6 – Limites microbiológicos da RDC nº 154, de 2006 e a RDC nº 11, de 2014

Resoluções	Contagem de bactérias heterotróficas		Pesquisa de Coliformes totais
	Pós-osmose / Reuso	Dialisato	
RDC Nº154/2006	200 UFC / mL	2000 UFC / mL	Ausência em 100 mL
RDC Nº11/2014	100 UFC/ mL	200 UFC / mL	Ausência em 100 mL

Fonte: Adaptado BRASIL, 2006 e BRASIL, 2014.

Conforme visualizado na Tabela 7 apresentada anteriormente, a RDC 154/2004 estabelecia como limite para contagem de bactérias heterotróficas no dialisato o valor de 2.000 UFC/mL. Este limite era dez vezes mais alto quando comparado com o limite estabelecido para a água tratada para hemodiálise (pós-osmose e reuso). O padrão de 2.000 UFC/mL, assim como o restante dos limites, foram baseados na AAMI, que estabeleceu estes valores em 1981. Em 2004 a AAMI alterou o limite de 2.000UFC/mL para contagem de bactérias heterotróficas no dialisato para o limite de 200 UFC/mL. Em países da Europa e no Japão este limite já foi reduzido para 100 UFC/mL (NYSTRAND, 2008). No Brasil, o valor limite para bactérias heterotróficas no dialisato continuou 2.000 UFC/mL até março de 2014, com a publicação da RDC nº 11. A pressão por conta do Programa de hemodiálise /

INCQS, bem como outros programas semelhantes no país, tiveram peso na mudança legal, uma vez que apontaram as necessidades de uma revisão na resolução em vista das preocupações de que conforme o demonstrado na literatura, a concentração bacteriana nesta proporção (2.000 UFC/mL), geralmente determina nível de endotoxina suficiente para causar respostas fisiológicas agudas e até mesmo complicações a longo prazo nos pacientes (RAMIREZ, 2009). Alguns estudos têm mostrado a importância da manutenção da contagem bacteriana de 100 UFC/mL no dialisato a fim de que sejam prevenidas complicações clínicas oriundas da contaminação bacteriana do fluido de diálise (LONNEMANN, 2000) e, vários relatos têm discutido a utilização do dialisato ultrapuro (LONNEMANN, 2000; BOMMER; JABER, 2006).

O presente estudo, assim como o realizado por Ferreira (2006), Ferreira (2009) e Nóbrega (2010), não encontrou contaminação no ponto da água potável de abastecimento das clínicas, e sim na água de hemodiálise, após o tratamento de osmose reversa. Isso pode ser explicado uma vez que as áreas com água estagnada nos sistemas de água para diálise, os tubos, tanques e torneiras representam potenciais reservatórios para microrganismos contribuindo para a formação de biofilmes (HOENICH; LEVIN, 2003; TAPIA; YEE, 2006; FERREIRA, 2009, MONTANARI et al., 2009) e além disso, uma outra explicação para a maior quantidade de bactérias heterotróficas após o processo de purificação é o tratamento que a água sofre, uma vez que durante o tratamento da água por osmose reversa ocorre retirada do cloro, deixando a água mais propícia ao crescimento de bactérias. (CAPPELLI et al., 2000).

Observou-se também nesses estudos uma ausência comum da presença de coliformes totais nas amostras analisadas. É sabido que a legislação vigente, bem como as anteriores, preconiza a identificação de *E. coli* em caso de presença de coliformes totais em 100 mL, no entanto não há qualquer recomendação da identificação de BGN-NF, que são justamente os mais isolados em amostras de água de hemodiálise (cerca de 90%). Segundo Borges e colaboradores (2007) e Ramirez (2009), dentre os surtos de Gram-negativas em unidades de hemodiálise, a principal fonte de contaminação foi a desinfecção inadequada do sistema de tratamento de água e distribuição, o que favoreceu o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes.

Biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células microbianas protegidas por uma matriz polissacarídica ou protéica que é sintetizada pelas células e aderente tanto às superfícies inertes quanto às vivas (MOSSINI, 2014). Mesmo em pacientes saudáveis, infecções relacionadas a biofilmes microbianos são dificilmente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, sendo estas comumente crônicas, de difícil tratamento e com sintomas recorrentes mesmo após ciclos de terapia antimicrobiana. Em muitas ocasiões são eliminadas por método cirúrgico ou com elevadas doses de agentes quimioterápicos. Por tudo isso, o custo do tratamento destas infecções é elevado, chegando a cerca de um bilhão de dólares por ano (FUX et al., 2005).

Segundo a RDC nº 33/2008, foi estabelecido como critério obrigatório a ser obedecido a manutenção dos sistemas de tratamento de água, em circuito fechado (*looping*), para forçar a circulação da água 24 horas por dia, ou seja, a água tratada por osmose reversa é direcionada para alimentar as máquinas de hemodiálise e os reusos, e retorna ao sistema de tratamento para, novamente, alimentar máquinas e reuso. A legislação vigente não estabelece nenhum tratamento adicional a esta água que retorna ao sistema antes da mesma realimentar máquinas e reusos. Considerando que o trajeto percorrido pela água durante a sua distribuição pode contar com a presença de biofilmes nas paredes das tubulações e conexões, existe também uma preocupação com a qualidade da água que retorna ao sistema pela possibilidade da sua contaminação quando da existência de espaço morto no circuito hidráulico (RAMIREZ, 2009).

Além das diferenças na legislação, comparando a legislação brasileira com a de outros países, quanto aos limites para contagem de bactérias e também para concentração de endotoxina, em alguns países como a Austrália, a Alemanha e a Itália, também é realizada a análise obrigatória de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo, o valor permitido inferior a 1 UFC/50mL, 1 UFC/100mL e 1 UFC/250mL, respectivamente (NYSTRAND, 2008; BUZZO et al., 2010; LYDIO; GOMES, 2013).

Analisando a legislação vigente, no Brasil percebe-se uma falha quanto a esse quesito, pois a análise de *P. aeruginosa* não é exigida por lei. No presente estudo, *P. aeruginosa* foi o segundo microrganismo mais frequentemente isolado (12,5%), juntamente com *Brevundimonas diminuta*, *Moraxella osloensis*. Uma vez que microrganismos não fermentadores conseguem se multiplicar rapidamente,

mesmo em água esterilizada, podendo alcançar concentrações maiores que 105 UFC/mL em menos de 24 horas, e que em soluções de diálise, este crescimento pode ser mais acelerado pela presença de glicose e bicarbonato, o que acarreta na produção de biofilme, assim como na presença de endotoxina (BORGES *et al.*, 2007; RAMIREZ, 2009; FERREIRA 2009). Sendo assim, tornam-se necessárias mudanças na legislação que prevejam a presença de BGN-NF em água de hemodiálise.

Dentre o grupo das Gram-negativas, as espécies mais isoladas são a *P. aeruginosa* e a *B. cepacia* (LYDIO; GOMES, 2013). *P. aeruginosa*, além de oportunistas, apresentam uma rápida multiplicação nos dialisatos que é favorecida pela presença dos elementos químicos do sangue dos pacientes que passam pelas máquinas durante o processo de hemodiálise, além de estar associada à resistência intrínseca aos antibióticos, como β -lactâmicos e fluorquinolonas (ROSSOLINI; MANTENGOLI, 2008), à diminuição da susceptibilidade aos antissépticos desinfetantes e à sua forte capacidade de formação de biofilme (FERREIRA; LALA, 2010). Segundo GALES e colaboradores (2012) *P. aeruginosa* foi o quarto microrganismo mais isolado em infecção da corrente sanguínea, sendo mais frequentemente encontrados em pacientes imunocomprometidos, submetidos a ambientes invasivos como, incisões cirúrgicas, inserção de cateteres urinários ou vasculares, tubos endotraqueais e em queimados (TRIGKA *et al.*, 2011; ASHRAF; OSTROSKY, 2012).

Mulcahy (2011) destaca a capacidade de produção de biofilme como a principal barreira na erradicação da contaminação por *P. aeruginosa* nos sistemas de hemodiálise, sendo portanto o fator determinante no princípio de uma infecção por este microrganismo. A ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* em ambiente hospitalar representa um grande problema na prescrição de antimicrobianos eficazes, uma vez que estes possuem em sua maioria múltiplas resistências a diferentes antibióticos. O estabelecimento de estratégias preventivas, que visem evitar a infecção dos pacientes de hemodiálise, como a implementação de leis mais rigorosas quanto a presença de *P. aeruginosa* em amostras de água de hemodiálise seria, portanto, fundamental na qualidade de vida destes pacientes.

E uma das clínicas analisadas neste trabalho, foi identificada a presença de *Burkholderia cepacia* nas amostras de água de hemodiálise (6,25%). Pode-se notar

na literatura um crescente aumento de relatos de surtos de contaminação em água de hemodiálise, tendo a *Burkholderia cepacia* como o microrganismo mais prevalentemente isolado dentre as espécies de BGN-NF (REIS, 2010). Em um estudo com 28 pacientes de uma UTRS, Souza e colaboradores (2004), relatam um surto causado por *B. cepacia*, onde a limpeza inadequada e um vazamento da conexão de osmose reversa, foram identificados como principais suspeitos na origem do foco de contaminação, mesmo tendo sido tomadas medidas de prevenção necessárias e obedecendo aos padrões de qualidade de água, foram isoladas cepas de *B. cepacia* no sangue de pacientes dialíticos. Cascio e colaboradores (2006) relatam um surto envolvendo 38 pacientes de hemodiálise em Verona, associado a contaminação em cateter, onde foram isoladas cepas de *B. cepacia* no sangue destes pacientes e nos guardanapos utilizados na desinfecção dos cateteres. Neste mesmo estudo, são relatados um caso de infecção por *B. cepacia* em hospital brasileiro, devido à limpeza inadequada das membranas da osmose reversa, um vazamento da conexão da osmose com a tubulação, e um caso de infecção em hospital da Tailândia, devido ao uso de soluções desinfetantes de cetrimida e cloreximida contaminadas. Tais observações confirmam a necessidade de padronizações mais exigentes para a água utilizada em hemodiálise.

Além de *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, foram também isolados, neste presente estudo, *Stenotrophomonas maltophilia* (18,75%), *Brevundimonas diminuta* (12,5%), *Moraxella osloensis* (12,5%), *Sphingobacterium multivorum* (6,25%), *Achromobacter xylosoxidans* (6,25%), *Sphingomonas paucimobilis* (6,25%), *Acinetobacter lwoffii* (6,25%), *Achromobacter denitrificans* (6,25%) e *Ralstonia pickettii* (6,25%), todos estes BGN-NF, passivos de causar infecções em pacientes imunossuprimidos. Dentre estes, a ANVISA (2012) descreve *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* e o Complexo *Burkholderia cepacia* como principais BGN-NF como principais responsáveis por infecções em humanos.

O principal microrganismo isolado neste estudo, sendo encontrado em 3 das 16 UTRS, foi *Stenotrophomonas maltophilia*. Apesar de possuir baixa virulência, há muitos relatos na literatura de infecções causadas por *S. maltophilia* em pacientes imunocomprometidos ou que passam por procedimentos invasivos, como a inserção de cateteres venosos, como é o caso de pacientes em hemodíalises, sendo este contato na maioria das vezes através de fontes de água

(GNANASEKARAN; BAJAJ, 2009). Além de muito difundido no ambiente, *S. maltophilia* é frequentemente isolada em ambiente hospitalar. Um estudo em um hospital universitário na Turquia realizado por Caylan e colaboradores (2004), apontou um crescente aumento de infecções provocadas por *S. maltophilia* em pacientes hospitalizados, e a maioria de cepas com múltiplas resistências a antibióticos. Em um período de 20 meses Caylan e colaboradores (2004) isolaram *S. maltophilia* em 41 pacientes. *S. maltophilia* tem se tornado um grande problema de morbidade hospitalar, principalmente em pacientes com câncer. Caylan e colaboradores (2004) apresentam taxas de mortalidade de 45,4% de pacientes infectados em hospitais, centros de câncer e comunidade, sendo esta 36,5% do total de pacientes.

A espécie *Acinetobacter*, está entre BGN-NF de maior importância médica, segundo a ANVISA (2012), com destaque para *A. baumannii*. Ohkouchi e colaboradores (2015) em um estudo comparativo entre bactérias e cianobactérias frequentemente isoladas em sistemas de água, aponta *Acinetobacter lwoffii* como um dos microrganismos de maior produção de endotoxina, juntamente com *P. aeruginosa*, ocasionando em respostas inflamatórias mais potentes. Na literatura é encontrado relato de *A. lwoffii* como o responsável por uma doença respiratória fatal em um paciente do sexo feminino de 68 anos (TOYOSHIMA; CHIDA; SUDA, 2010).

O gênero *Moraxella* consiste de BGN-NF que são aeróbicos, oxidase positiva e indol negativo. Apesar de amplamente distribuído na natureza e em ambientes hospitalares, *M. osloensis* é um agente causador de infecções raras nos seres humanos com a maioria dos casos relatados em pacientes imunocomprometidos (SCHRECKENBERGER; DANESHVAR; HOLLIS, 2007). Em um estudo realizado pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (GRAHAM et al., 1990), de 933 isolados da espécie *Moraxella* 199 isolados foram identificados como *M. osloensis*, tornando-se a segunda espécie mais comum isolada, sendo que 44 cepas do *M. osloensis* foram derivados de culturas de sangue. Bard e colaboradores (2011) relatam em seu estudo casos de infecções relacionadas a *M. osloensis* incluindo bacteremia, infecção do cateter venoso central, meningite, sinovite, osteomielite, peritonite e pneumonia. A maioria destes casos associados a pacientes imunocomprometidos.

Quanto a *Brevundimonas diminuta*, isolada em duas das clínicas analisadas neste trabalho, trata-se de um BGN-NF, não-esporulado, móvel, que tem sido ocasionalmente associado a bacteremia, infecções urinárias, pulmonares e enfisemas em imunocomprometidos (CHI-YU et al., 2004; HAN; ANDRADE, 2005; MENUET et al., 2008; LEE et al., 2011). Além de amplamente distribuído no ambiente é frequentemente isolado na água. *B. diminuta* é raramente associado a bacteremia, no entanto, uma vez que pacientes em hemodiálise possuem muitas das vezes o sistema imune comprometido, principalmente nos estágios finais da IRC, estão mais predispostos a infecções por cepas oportunistas, como reportado em seu estudo por CHI e colaboradores (2004). No mesmo estudo, em um teste de sensibilidade, a cepa isolada mostrou-se resistente a múltiplos antibióticos, sendo portanto outro agravante na eficácia do tratamento de pacientes imunossuprimidos infectados.

Achromobacter xylosoxidans, é um BGN-NF oxidase-positivo, recentemente caracterizado como um patógeno emergente em pacientes com cateter. Sua patogenicidade e principais vias de transmissão ainda não estão claras, mas apesar de raras, infecções hospitalares com *A. xylosoxidans* podem ocorrer em pacientes imunossuprimidos. A mais comum é a bacteremia, e tem sido descrita mais frequentemente em humanos. Os meios de contaminação mais associada a este microrganismo são intravenosas, diálise, incubadoras, soluções anti-sépticas e ventiladores mecânicos. A mortalidade de bacteremia associada a *A. xylosoxidans* variam de 15% a 48%, dependendo da susceptibilidade da cepa a antibióticos (GÓMEZ-CEREZO et al., 2003; MOLINA-CABRILLANA et al., 2007; TURGUTALP et al., 2012).

Achromobacter denitrificans, também citado como *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans*, isolado em uma das clínicas deste trabalho, é um BGN-NF de importância clínica pouco determinada, com poucos estudos que aprofundam sua patogenicidade, mas há relatos na literatura que também apontam para o risco de pacientes imunocomprometidos hospitalizados. (LEDGER; CORDY, 2007; HANSEN et al., 2010; CANKAYA et al., 2014).

Ralstonia pickettii, cuja a população de risco também compreende quase exclusivamente pacientes imunocomprometidos, em terapia intensiva e com cateteres de longa permanência, foi demonstrado que o agente é causador de

infecções invasivas graves, incluindo osteomielite, artrite séptica, meningite, etc. Há relatos na literatura de casos envolvendo contaminação em pacientes que sofrem de ICR (VANEECHOUTTE et al., 2001; ZELLWEGER et al., 2004; RYAN; ADLEY, 2014).

O gênero *Sphingobacterium* consiste de bacilos Gram-negativos ambiental que raramente estão envolvidos nas infecções humanas. As espécies, *Sphingobacterium multivorum* e *Sphingobacterium spiritivorum* (anteriormente classificados como *Flavobacterium spp.*), têm sido ocasionalmente associadas com bacteremia, peritonite, e as infecções respiratórias crônicas em pacientes com condições de baixa imunidade severa. A espécie isolada neste presente trabalho, *S. multivorum* foi relatado apenas duas vezes claramente como um patógeno humano, sendo uma delas associada a infecção em paciente de diálise, no entanto o paciente se recuperou dentro de 3 semanas quando tratado com antibióticos apropriados (POTVLIEGE et al., 1984; TRONEL et al., 2003).

Sphingomonas paucimobilis é um BGN-NF de flagelo único e mobilidade lenta que é amplamente distribuído no ambiente natural (especialmente água e solo) e tem sido associado a relatos de casos clínicos adquiridos na comunidade. As infecções relacionadas a este microrganismo incluem bacteremia, sepses relacionadas a cateter, meningite, peritonite, infecções cutâneas, abscessos viscerais, infecções do trato urinário e doenças diarreicas (LISA et al., 2009). *S. paucimobilis* é capaz de causar uma variedade de infecções em indivíduos saudáveis e pacientes imunocomprometidos, e tem sido cada vez mais detectados em ambientes hospitalares, e mesmo possuindo virulência clínica, sua importância não pode ser negligenciada. Pascale e colaboradores (2013) apontam a necessidade de considerar *S. paucimobilis* um importante patógeno, tanto em infecções nosocomiais como adquirida na comunidade.

Sabe-se que pacientes com doenças renais crônicas possuem deficiência na imunidade tanto humoral como na mediada por células, e estas deficiências predispõem o paciente a diversos processos infecciosos (JOHNSON; CUNHA, 2001). Uma vez que indivíduos com esta doença renal se enquadram muitas vezes na categoria de pacientes imunocomprometidos, necessitando de tratamento que incluem medicamentos, antibióticos, antituberculos, antiarrítmicos cerebrais e miocárdicos, cardiotônicos, imunossupressores, sedativos, etc, mesmo os

microrganismos de baixa capacidade de infecção representam um risco a saúde destes pacientes (FRAM et al., 2009).

7 CONCLUSÃO

As conclusões do trabalho foram as seguintes:

- Das 16 clínicas avaliadas, sete (43,75%) tiveram o resultado insatisfatório quanto a quantidade de bactérias heterotróficas, excedendo os limites estipulados na RDC 11. Nenhuma das amostras apresentaram presença de coliformes fecais e *E. coli*, assim como constatado em anos anteriores, segundo relatos da literatura.
- Apesar da qualidade da água mostrar-se melhor em relação ao início do Programa de hemodiálise do INCQS (1999), também comprovam as dificuldades de se alcançar padrões de qualidade microbiológicos satisfatórios e permanentes, uma vez que é possível perceber uma queda da qualidade da água do sistema de diálise frente aos resultados mais recentes do programa (2006 e 2007).
- A ausência de contaminação nos pontos referentes a água tratada para diálise aponta para possíveis contaminações no sistema de água para diálise, decorrente de formação de biofilme nas tubulações do sistema, além de um favorecimento do crescimento bacteriano devido a retirada do cloro no processo de osmose reversa.
- Este trabalho identificou a presença dos quatro principais bacilos Gram negativos não-fermentadores de importância médica, segundo a ANVISA: *S. maltophilia*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e o complexo *B*, além de *B. diminuta*, *M. osloensis*, *S. multivorum*, *A. xyloxidans*, *S. paucimobilis*, *A. lwoffii*, *A. denitrificans* e *R. pickettii*, que apesar de possuírem baixa virulência, todos são capazes de causar infecções em pacientes imunocomprometidos.
- Uma vez que mesmo em pacientes saudáveis existem dificuldades em se tratar infecções relacionadas a biofilmes microbianos, e que bacilos gram-negativos não fermentadores são os principais responsáveis por formação de biofilme, além de estarem frequentemente associados a resistência a múltiplas drogas, torna-se necessário aprimorar leis que considerem a presença destes microrganismos, como já acontece em alguns países.

- O programa desenvolvido pelo INCQS, em parceria com a Coordenação de Vigilância Sanitária do estado do Rio de Janeiro e a Superintendência de Controle de Zoonozes, Vigilância, e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro, permitiu melhorias na qualidade da água do município do Rio de Janeiro, que repercutiram não apenas no controle de qualidade do processo de diálise, como também influenciaram diretamente a qualidade de vida dos pacientes em diálise e diminuição das taxas de morbidade em decorrência de infecções associadas aos fluidos de diálise.
- A partir do presente estudo, mudanças na legislação são sugeridas, para melhor controle da qualidade da água de hemodiálise, tais como: estabelecer limites para a presença de bacilos Gram negativos não-fermentadores da glicose, e reduzir ainda mais o limite para a contagem de bactérias heterotróficas no dialisato para 100 UFC / mL, conforme já é exigido em alguns países.

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA M. T. G.; BERTELLI, E. C. P.; ROSSIT, A. R. B.; BERTOLLO, E. M. G.; MARTINEZ, M. B. Infecções Hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. **Arq Cienc Saúde**, v. 12, n. 3, p. 141-145, 2005.

AMATO, R. L. Water treatment for hemodialysis-undated to include the latest AAMI standards for dialysate (RD52:2004). **Nephrology Nursing Journal**, Pitman, v. 32, n. 2, p. 151-167, 2005.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington. p. 9-19, 2005.

ANDREOLI, M. C. C.; NADALETTO, M. A. Diálise. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?dialise&menu=8>> Acesso em 11 dez. 2013.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology**, Athens, v. 95, n. 1, p. 180-185, 2003.

ASHRAF, M.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Ventilator-associated pneumonia: a review. **Hosp Pract (1995)**. v. 40, n. 1, p. 93-105, 2012.

BEN HAJ KHALIFA, A.; MOISSENET, D.; VU THIEN, H.; KHEDHER, M. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. **Ann Biol Clin**, Paris, v. 69, n. 4, p. 393-403, 2011.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K.J. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148-165, 1996.

BOMMER, J.; JABER, B. L. Ultrapure dialysate: facts and myths. **Seminars in Dialysis**, v. 19, p. 115-119, 2006.

BLAND L. A.; ALTER M. J.; FAVERO M. S.; CARSON L. A.; CUSICK L. B. Hemodializer reuse: practices infection control. **Trans Amer Soc Artif Internal Organs (ASAIO)**. v. 31, p. 556-559, 1985.

BLONDEL-HILL, E.; HENRY, D. A.; SPEERT, D. P. Pseudomonas. In Murray PR. **Manual of clinical microbiology**, ASM press, Washington DC, p. 734-748, 2007.

BRASIL. Portaria nº 82, de 03 de janeiro 2000. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para o cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, DF Brasília, 08 fev. 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 154, de 15 de junho de 2004 (Republicada – 31.05.2006). Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF Brasília, 17 jun. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 1671, de 30 de maio de 2006. Estabelece os indicadores para subsidiar a avaliação do serviço de diálise. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF Brasília, 31 mai. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 3 de junho de 2008. Dispõe sobre o regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação dos Sistemas de tratamento e Distribuição de Água para Hemodiálise no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF Brasília, 3 jul. 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica Nº 006/2009-GGTES/ANVISA. Estabelece parâmetros para execução de procedimentos dialíticos em ambiente hospitalar fora dos serviços de diálise abrangidos pela RDC/Anvisa n. 154, de 15 de junho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 dez. 2009 Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/pdf/portarias/NotaTecnica006-2009-GGTES-ANVISA.pdf>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 dez. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Boletim Informativo - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012)**. – Disponível em: <<http://www20.anvisa.gov.br/>> Acesso em: 14 de mar. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 mar. 2014.

BROOKE J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. **Clin Microbiol Rev.** v. 25, n. 1, 2012.

BUGNO, A.; ALMODÓVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C.; AURICCHIO, M. T. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2. p.172-175, 2007.

BUZZO M. L.; BUGNO A.; ALMODOVAR A. A. B.; KIRA C. S.; CARVALHO M. F. H.; SOUZA A.; SCORSAFAVA; M. A. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo. v. 69, n. 1, p.1-6, 2010.

CALDERARO, R.V.V.; BISCHOFBERGER, C. Tratamento e vigilância da qualidade das águas de hemodiálise. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 3, n. 3 e 4, p. 118-127, 1998.

CALDERARO, R. V. V.; HELLER, L., Surto de reações hemolíticas associado a residuais de cloro e cloraminas na água de hemodiálise. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n.5, p. 481-486, 2001.

CANKAYA, E.; KELES, M.; GULCAN, E.; UYANIK, A.; UYANIK, H. A Rare Cause of Peritoneal Dialysis–Related Peritonitis: *Achromobacter denitrificans*. **Perit Dial Int**. Turkey, v. 34, n. 1, p. 135-137, 2014.

CAPPELLI, G.; BALLESTRI, M.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A.; INGUAGGIATO, P.; ALBERTAZZI, A. Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. **Blood Purif.** v.18, n. 3, p. 224-230, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1159/000014421>> Acessado em: 15 jan. 2015.

CARVALHO, I. M. P.; MELO, R. L.; ANDRAUS, L. M. S. - Produção científica de enfermagem em nefrologia, no Brasil, no período de 1989 até 1999. **Revista Eletrônica de Enfermagem (online)**, Goiânia, v.3, n.2, 2001. Disponível em: <<http://www.fen.ufg.br/revista>>. Acesso em 10 jul. 2013.

CASCIO, G.; BONORA, M.G.; ZORZI, E.; MORTANI, N.; TESSITORE, N.; LOSCHIAVO, C.; LUPO, A.; SOLBIATI, M.; FONTANA, R. A napkin-associated outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 1 p. 56-62, 2006.

CAYLAN, R.; KAKLIKKAYA, N.; AYDIN, K.; AYDIN, F.; YILMAZ, G.; OZGUMUS, B.; KOKSAL, I. An epidemiological analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* strains in a university hospital. **Jpn J Infect Dis**. v. 57, n. 2, p. 37-40, 2004.

CHIH-YU CHI; CHANG-PHONE FUNG; WING-WAI WONG; CHENG-YI LIU. *Brevundimonas Bacteremia*: Two Case Reports and Literature. **Scand J Infect Dis**. v. 36, n. 1, p. 59-61, 2004.

COENYEL, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **J Clin Microbiol**. v. 39, n. 10, p. 3427-3436, 2001.

COUTINHO, H. D. *Burkholderia cepacia* complex: virulence characteristics, importance and relationship with cystic fibrosis. **Indian J Med Sci**. v. 61, n. 7, p. 422-429, 2007,

DIAS, R. S.; SANTOS, D. N.; FERNANDES, M. G.; FERREIRA, J. G. G. Infecção hospitalar - IH - causas múltiplas e fatores de risco associados a microrganismos de veiculação hídrica. **Revista Tecer**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, 54-60, 2008.

DIJKSHOORN, L; NEMEC, A; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews**. v.5, 2007.

ENOCH, D. A.; BIRKETT, C. I.; LUDLAM, H. A. Non-fermentative Gram-negative bacteria. **Int J Antimicrob Agents**. v. 29, n. 3, p. 33-41, 2007.

FALAGAS, M. E.; KOPTERIDES, P. Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review of the literature. **J Hosp Infect**. v. 64, n. 1, p. 7-15, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5 ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.
MICROBIOLOGICAL examination of nonsterile products: microbial enumeration tests.

FAVERO, M. S.; ALTER, M. J.; BLAND, L. A. A. Dialysis-associated infections and their control. In: **HOSPITAL Infections**, 3. ed. Boston; Toronto; London: Little, Brown and Co., p. 375-403, 1992.

FAVERO, M. S. Role of the CDC in hemodialysis: an historical perspective. **Seminars in Dialysis**, Irvine, v. 13, n. 2, p. 64-67, 2000.

FERREIRA, J. A. B. **Avaliação Microbiológica da Água Utilizada na Terapia Renal Substitutiva no Estado do Rio de Janeiro**. Monografia - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2006.

FERREIRA, J. A. B. **Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de Pseudomonas aeruginosa isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva**. Dissertação (Mestrado Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009

FERREIRA, H.; LALA, E.R.P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 12. n. 2. p. 44-50, 2010.

FERREIRA, J. A. B.; NOBREGA, H. N.; VIEIRA, V. V.; ABRANTES, S. M. P. Diversidade Genética e Produção de Biofilme de amostras de *Pseudomonas Aeruginosa* Isoladas da Água Utilizada em Unidades de terapia Renal Substitutiva. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 65, p. 56-70, 2013.

FIGEL, I. C. **Avaliação microbiológica em sistemas de água de diálise em clínicas especializadas de Curitiba, PR**. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, Mod. Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011.

FRAM, D. S.; TAMINATO, M.; FERREIRA, D.; NEVES, L.; BELASCO, A. G. S.; BARBOSA, D. A. Prevenção de infecções de corrente sanguínea relacionadas a cateter em pacientes em hemodiálise. **Acta Paulista de Enfermagem**. São Paulo, v. 22, n. 2, p. 564-568, 2009.

FUX, C.A et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.

GAUTAM, V.; SINGHAL, L.; RAY, P. *Burkholderia cepacia* complex: beyond *pseudomonas* and *acinetobacter*. **Indian J Med Microbiol**. v. 29, n 1, p. 4-12, 2011.

GELLATLY S. L.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathog Dis**. v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013.

GNANASEKARAN, I.; BAJAJ, R. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in end-stage renal disease patients receiving maintenance hemodialysis. **Dialysis & Transplantation**. v. 38, n. 1, p. 30-32, 2009.

GÓMEZ-CEREZO, J.; SUÁREZ, I.; RÍOS, J. J.; PEÑA, P.; GARCÍA DE MIGUEL, M. J.; DE JOSÉ, M.; MONTEAGUDO, O.; LINARES, P.; BARBADO-CANO, A.; VÁZQUEZ, J. J. *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 22, n. 6, p. 360–363, 2003.

GRAHAM, D. R.; BAND, J. D.; THORNSBERRY, C.; HOLLIS, D. G.; WEAVER, R. E. Infections caused by *Moraxella*, *Moraxella urethralis*, *Moraxella-like* groups M-5 and M-6, and *Kingella kingae* in the United States, 1953–1980. **Rev Infect Dis**. v. 12, p. 423–431, 1990.

GRIMONT, P. A.; BOUVET, O. M. Diversity of glucose entry routes in the Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiol Rev**. v. 5, n. 1-2, p. 109-114, 1989.

HAN, X. Y.; ANDRADE, R. A. *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. **Jornal Antimicrob Chemother**. n. 55, p. 853-859, 2005.

HANSEN, C. R.; PRESSLER, T.; NIELSEN, K. G.; JENSEN, P. O.; BJARRNSHOLT, T.; HOIBY, N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**. v. 9, n. 1, p.51-58, 2010.

HAUSER, A. R.; JAIN, M.; BAR-MEIR, M; MCCOLLEY, S. A. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24, n. 1, p. 29-70, 2011.

HOENICH, N. A.; LEVIN, R. The implications of water quality in hemodialysis. **Sem Dial**. v. 16, n. 6, p. 492-497, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-139X.2003.16106.x>> Acessado em: 16 jan. 2015.

HOENICK N. A.; RONCO C.; LEVIN R., The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. **Blood Purif**, Newcastle upon Tyne, v. 24, n. 1, p. 11-18, 2006

ISAIARASI GNANASEKARAN, M. D.; RISHI BAJAJ, M. D. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in end-stage renal disease patients receiving maintenance hemodialysis. **Dialysis & Transplantation**. v. 38, n. 1, p. 30-32, 2009.

JOHNSON, D. H.; CUNHA, B. A. Infections in cirrhosis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 15, p. 363-71, 2001.

KLAASSEN, C. D. **Cassarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: Mcgraw-Hill, 2008.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection** v. 73, p. 338-344, 2009.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnostico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. Ed. 6^a. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

LEE, M. R.; HUANG, Y. T.; LIAO, C. H.; CHUANG, T. Y.; LIN, C. K.; LEE, S. W.; LAI, C. C.; YU, C. J.; HSUEH, P. R. Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2010. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, n.10, p. 1185-1191, 2011.

LEDGER, S. G.; CORDY, P. Successful treatment of *alcaligenes xylosoxidans* in automated peritoneal dialysis-related peritonitis. **Perit Dial Int**. v. 27, p. 596-598, 2007.

LEME, I.L.; SILVA, V.G. Recomendações para a garantia da qualidade da água para uso em unidades de hemodiálise. **Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes**, 2003.

LONNEMANN, G. Should ultra-pure dialysate be mandatory? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, suppl 1, p. 55-59, 2000.

LYDIO, R. L.; GOMES, D. L. R. **Fatores de risco associados ao desenvolvimento de infecção em pacientes submetidos à hemodiálise**. Curso de Bacharelado em Farmácia – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) – Campus Realengo, Rio de Janeiro, 2013.

LYNCH, J. P. *Burkholderia cepacia* complex: impact on the cystic fibrosis lung lesion. **Semin Respir Crit Care Med**. 3ª ed., v. 30, n. 5, p. 596-610, 2009.

MANCHANDA, V.; SANCHAITA, S.; SINGH, N.P. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal Global Infectious Diseases*, v. 2, n. 3. p. 291-304, 2010.

MANUAL DA QUALIDADE. Pesquisa de patógenos em produtos não estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise. Rev. 14. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, nº 65.3210.008, 2014.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 1254-1263, 2008.

MARAGAKIS, L. L.; CHAIWARITH R.; SRINIVASAN, A.; TORRIANI, F. J.; AVDIC, E.; LEE, A.; ROSS, T. R.; CARROLL, K. C.; PERL, T. M. *Sphingomonas paucimobilis* Bloodstream Infections Associated with Contaminated Intravenous Fentanyl. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, n. 1, p. 12-18, 2009.

MENUET, M.; BITTAR, F.; STREMLER, N.; DUBUS, J. C.; SARLES, J.; RAOULT, D.; ROLAIN, J. M. First isolation of two colistin-resistant emerging pathogens, *Brevundimonas diminuta* and *Ochrobactrum anthropi*, in a woman with cystic fibrosis: a case report. **Journal of Medical Case Reports**. v. 2, n. 373, 2008.

MÉTODOS Biológicos. In: FARMACOPÉIA BRASILEIRA 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. *MICROBIOLOGICAL examination of nonsterile products: microbial enumeration tests*. United States Pharmacopeial Convention. **The United States pharmacopeia**. 35. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2012

MOLINA-CABRILLANA, J.; SANTANA-REYES, C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, A.; BORDES-BENÍTEZ, A.; HORCAJADA, I. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. **Eur J Clin Microbiol. Infect Dis**. v, 26, n. 6, p.435–43, 2007.

MONTANARI, L. B.; SARTORI, F. G.; CARDOSO, M. J. O.; VARO, S. D.; PIRES, R. H.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K.; MARTINS, C. H. G. Contaminação microbiológica no sistema de distribuição de água de um centro de hemodiálise. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2009.

MURRAY, R. et al., **Manual of Clinical Microbiology**, 9. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2007.

NASCIMENTO, C. D.; MARQUES, I. R. Intervenções de enfermagem nas complicações mais frequentes durante a sessão de hemodiálise: revisão da literatura, **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 58, n. 6, p. 719-722, 2005.

NÓBREGA, H. N. **Presença de *Stenotrophomonas maltophilia* na água tratada para hemodiálise no período de 2007 a 2009**. Curso de especialização em Controle de Qualidade de Produtos e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2010.

NYSTRAND, R. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis, review article. **Journal Chinese Medical Association**, Taipei, v. 71, n. 5, p. 223–229, 2008.

OHKOUCHI, N.; OGAWA, N. O.; CHIKARAISHI, Y.; TANAKA, H.; WADA, E. Biochemical and physiological bases for the use of carbon and nitrogen isotopes in environmental and ecological studies. **Prog. Earth Planet. Sci.** 2:1, 2015.

OLIVEIRA JUNIOR, V.T. Água filtrada na hemodiálise. **Meio Filtrante**, ano VII, n. 32, 2008. Disponível em:
<http://www.meiofiltrante.com.br/materias_ver.asp?action=detalhe&id=382&revista=n32>. Acesso em: 21/01/2014.

OUSEPH R.; WARD R.A. Water treatment for hemodialysis: ensuring patient safety. **Seminars in Dialysis**, Louisville, v. 15, n. 1, 50-52, 2006.

PASCALE, R.; RUSSO, E.; ESPOSITO, I.; LEONE, S.; ESPOSITO, S. *Sphingomonas paucimobilis osteomyelitis* in an immunocompetent patient. A rare case report and literature review. **Infectious Diseases Unit**. Italy, v. 36, p. 423-426, 2013.

PELEG, A.; SEIFERT, H.; PATERSON, D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clin Microbiol Rev.** v.21, n.3, p. 538–582, 2008.

PELEG, A. Y.; DE BREIJ, A.; ADAMS, M. D.; CERQUEIRA, G. M.; MOCALI, S.; GALARDINI, M.; NIBBERING, P. H.; EARL, A. M.; WARD, D. V.; PATERSON, D. L.; SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L. The success of acinetobacter species; genetic, metabolic and virulence attributes. **PLoS One**. v. 7, n. 10, p. 1-11, 2012.

POCH, D. S.; OST, D. E. What are the important risk factors for healthcare-associated pneumonia? **Semin Respir Crit Care Med**. v. 30, n. 1, p. 26-35, 2009.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Principles and practice of infectious diseases. (MANDELI, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. E. D. S.). New York, Churchill Livingstone. Ed. 4, p. 1980-2003, 1995.

PONTORIERO, G.; POZZONI, P.; ANDRULLI, S.; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, suppl. 7, p. 21-25, 2003.

POTVLIEGE, C. C.; DEJAEGHER-BAUDUIN, W.; HANSEN, M.; DRATWA, F.; COLLART, C.; TIELEMANS, E.; YOURASSOWSKY. *Flavobacterium multivorum* septicemia in a hemodialyzed patient. **J. Clin. Microbiol**. v. 19, p. 568-569. 1984

RAMIREZ, S. S. **Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007**. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

REGAN, K. H.; BHATT, J. Eradication therapy for Burkholderia cepacia complex in people with cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev**. 2014.

REIS, B. A. B. **Produção de biofilme por bastonetes Gram-negativos isolados de água de Hemodiálise**. Dissertação - curso Bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Botucatu, Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

ROMÃO JUNIOR, J. E. O rim e suas doenças. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/index.html>>. Acesso em: 11 jul 2013.

ROOS, D.; DE BOER, M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. **Clin Exp Immunol**. v. 175, n. 2, p. 139-149, 2014.

ROTH, V. R.; JARVIS, W. R. Outbreaks of infection and or pyrogenic reactions in dialysis patients. **Seminars in Dialysis**, Atlanta, v. 13, n. 2, p. 92-96, 2000.

RUDNICK J. R.; ARDUINO M. J.; BLAND L. A. An outbreak of pyrogenic reactions in chronic hemodialysis patients associated with hemodialyzer reuse. **Artif Organs**. V. 19, p. 289-94, 1995.

RYAN, M. P.; ADLEY, C. C. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 33, n. 3, p. 291-304, 2014.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. **Am. J. Infect. Control**. v. 31, n. 3, p. S1-62, 2003.

SADER H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C.; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**. v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SCHRECKENBERGER, P.; DANESHVAR, M.; HOLLIS, D. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative Gram-negative rods. In **Manual of Clinical Microbiology**. 9^a ed., p. 749–779, 2007.

SESSO, R.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; BEVILACQUA, J. L.; ROMÃO, J. E. J.; LUGON, J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 233-238, 2008.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, V. J.; ROMÃO JUNIOR, J. E. Revisão/ Atualização em diálise: Água para hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SILVA-FILHO, L. V. F.; VELLOSO, L. F.; BENTO, C. N. O.; GYTIN, E.; TATENO, A. F.; LEVI, J. E.; RODRIGUES, J. C.; RAMOS, S. R. T. S. Use of selective medium for *Burkholderia cepacia* isolation in respiratory samples from cystic fibrosis patients. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo, v. 44, n. 4, 203-208, 2002.

SMEETS, E.; KOOMAN, J.; VAN DER SANDE, F.; STOBBERING, E.; FREDERIK, P.; CLAESSEN, P.; GRAVE, W.; SCHOT, A.; LEUNISSEN, K. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. **Kidney International**, New York, v. 63, p. 1574-1576, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de Diálise SBN - 2011**. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2011_publico.pdf>. Acessado em 13 nov. 2012.

SOUZA, A. V.; MOREIRA, C. R.; PASTERNAK, J.; HIRATA, M. L.; SALTINI, D. A.; CAETANO, V. C.; CIOSAK, S.; AZEVEDO, F. M.; SEVERINO, P.; VANDAMME, P.; MAGALHÃES, V. D. Characterizing uncommon *Burkholderia cepacia* Complex isolates from an outbreak in a hemodialysis unit. **Journal of Medical Microbiology**. Birmingham, v. 53, n. 10, p. 999-1005, 2004.

TAPIA, G.; YEE, J. Biofilm: its relevance in kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis**. v. 13, n. 3 p. 215-224, 2006.

TOKARS J. L.; ALTER M. J.; FAVERO M. S. National surveillance of hemodialysis. Associated Diseases in the United States. 1990. **ASAIO**. v. 39, p. 71-80, 1993.

TOYOSHIMA, M.; CHIDA, K.; SUDA, T. Fulminant community-acquired pneumonia probably caused by *Acinetobacter lwoffii*. **Respirology**. v. 15, n. 5, p. 867-868, 2010.

TRIGKA, K.; DOUSDAMPANIS, P.; CHU, M.; KHAN, S.; AHMAD, M.; BARGMAN, J. M.; OREOPOULOS, D. G. Encapsulating peritoneal sclerosis: a single-center experience and review of the literature. **Int Urol Nephrol**. v. 43, n. 2, p. 519-526, 2011.

TRONEL, H.; PLESIAT, P.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D. Bacteremia caused by a novel species of Sphingobacterium. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 9, n. 12, p. 1242–1244, 2003.

TURGUTALP, K.; KIYKIM, A.; ERSOZ, G.; KAYA, A. Fatal catheter-related bacteremia due to *Alcaligenes (Achromobacter) xylosoxidans* in a hemodialysis patient. **Int Urol Nephrol**. v. 44, n. 4, p. 1281-1283, 2012.

UNITED STATES Pharmacopeial Convention. **The United States pharmacopeia 38**. 38. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2014.

VANEECHOUTTE, M.; DE BAERE, T.; WAUTERS, G.; STEYAERT, S.; CLAEYS, G.; VOGELAERS, D.; VERSCHRAEGEN, G. One case each of recurrent meningitis and hemoperitoneum infection with *Ralstonia mannitolilytica*. **J Clin Microbiol**. v. 39, n. 12, p. 4588–4590, 2001.

VARO, S. D.; MARTINS, C. H. G.; CARDOSO, M. J. O.; SARTORI, F. G.; MONTANARI, L. B.; PIRES-GONÇALVES, R. H. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Franca, v. 40, n. 3, p. 326-331, 2007.

VERSALOVIC, J.; CARROLL K.; FUNKE G.; JORGENSEN J.; LANDRY M. L.; WARNOCK D. **MANUAL of clinical microbiology**. 10 ed. Washington D.C., American Society for Microbiology, 2011.

VORBECK-MEISTER, I. et al. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.14, p.666-675, 1999.

WEBER, S. G.; MILLER, R. R.; PERENCEVICH, E. N.; TOLENTINO, J.; MELTZER, D.; PITRAK, D.; MCGREGOR, J. C; Y.; VAN LAETHEM, Y., JACOBS, F.; LEBECQUE, P.; MALFROOT, A.; TULKENS, P. M., VAN BAMBEKE, F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n. 6, p. 560–578, 2007.

WU, K.; YAU, Y. C.; MATUKAS, L.; WATERS, V. Biofilm compared to conventional antimicrobial susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates from cystic fibrosis patients. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 57, n. 3, p. 1546-1548, 2013.

ZELLWEGER, C.; BODMER, T.; TÄUBER, M. G.; MÜHLEMANN, K. Failure of ceftriaxone in an intravenous drug user with invasive infection due to *Ralstonia pickettii*. **Infection**. v. 32, n. 4, p. 246-248, 2004.