

# Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas

## Hemodialysis water: occurrence of yeasts, *Pseudomonas aeruginosa*, and heterotrophic bacteria

RIALA6/1001

\*Marise SIMÕES<sup>1</sup>; Maria de Fátima C. PIRES<sup>2</sup>\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz - Lab. I de Campinas e Programa de Pós Graduação/CIP/SES/SP. email: msimoes@ial.sp.gov.br<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Lab. Central de São Paulo

### RESUMO

A hemodiálise é uma modalidade terapêutica para pacientes com insuficiência renal. Durante o verão e inverno de 2003 foram analisadas 200 amostras de água de diálise provenientes de 2 unidades hospitalares denominadas A e B. Os pontos analisados foram: 18 do cavalete de entrada (P1), 18 do pré-tratamento (P2), 18 da osmose reversa (OR)(P3), 28 da entrada da máquina (P4), 30 da solução de diálise (P5), 17 das linhas e dialisador (P6), 9 do “loop” (P7), 11 do filtro de carvão (P8), 18 do reuso C (P9), 18 do reuso B (P10), 15 do reservatório da OR (P11). A metodologia utilizada foi a recomendada pelo “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”, 1995 utilizando as técnicas: “Pour Plate” para contagem de bactérias heterotróficas (BH) em R2A; membrana filtrante para *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Cetrimide e leveduras em Agar Sabouraud – dextrose com 200 mg/mL de cloranfenicol e determinações de fluoreto e condutividade; nitrato e sulfato pela metodologia das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985. Não houve diferença significativa entre verão e inverno. A unidade A apresentou leveduras em 5 amostras, *P.aeruginosa* em 14 e BH acima de 200UFC/mL em 52; enquanto a unidade B apresentou leveduras em 20 amostras, *P.aeruginosa* em 5, e BH acima de 200UFC/mL em 36. Após a OR foi realizada a pesquisa de endotoxinas bacterianas, sendo detectada em duas amostras na unidade A. Os parâmetros químicos revelaram a eficácia das membranas da OR na filtração dos íons fluoreto, nitrato, sulfato, condutividade nas duas unidades durante inverno e verão, ( $p < 0,001$ ). A RDC 154/2004 não faz referências à pesquisa de *P.aeruginosa* e leveduras. Este estudo mostrou que estes microrganismos podem estar presentes e não serem sensíveis a desinfecção como aconteceu com as BH. Manter a qualidade da água de diálise é uma maneira de prevenir riscos aos pacientes.

**Palavras-Chave.** água, hemodiálise, *Pseudomonas aeruginosa*, leveduras, bactérias heterotróficas, desinfecção.

### ABSTRACT

During the summer and winter of 2003, 200 samples of water used for hemodialysis procedures collected from two hospitals A and B were analyzed. The water samples were collected from the following sites: P1 - from incoming public treated water; from city water mains (N=18 samples); P2 - from pre-treatment site (N=18); P3 - from reverse osmosis (OR) treatment site (N=18); P4 - from hemodialysis machine water entry site (N=28); P5 - pre-dialyzing solution (N=30); P6 - from post-dialyzing site with arterial and venous blood lines (N=17); P7 - from loop (N=9); P8 - from carbon filter (N=11); P9 - from reuse C site (N=18); P10 - from reuse B site (N=18); and P11 - from water storage tank for OR (N=11). The analyses were performed according to the methodology recommended in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995, by means of the following assays: pour plate technique for heterotrophic bacteria (BH) counting in R2A agar; filter membrane technique for *Pseudomonas aeruginosa* detection in Cetrimide agar; culture in Sabouraud agar for yeast; technique for fluoride and conductivity determination; determination of sulfate and nitrate performed according to “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz” (Instituto Adolfo Lutz Analytical Guidelines), 1985. No significant seasonal differences were observed on

microorganism findings. From the water samples collected from unit A, five samples presented yeast; *P. aeruginosa* was detected in 14; 52 were positive for BH in a rate over than 200 UFC/mL. On the other hand, in samples collected from hospital B the yeast was detected in 20 samples, *P. aeruginosa* in five specimens, and 36 samples presented BH over than 200 UFC/mL. Bacteria endotoxins were analyzed in P3 sites, and these microorganism were detected in two samples among those collected from hospital A. Chemical parameters data indicated the OR membranes for filtrating fluoride ions, nitrate, sulphate and conductivity were efficacious in both health services no matter which season ( $p < 0,001$ ). Brazilian rules RDC 154/2004 does not make reference on the search for yeast and *P. aeruginosa*, nevertheless the present study showed that these bacteria might occur in hemodialysis system. These findings imply that the microorganisms are not eliminated by the current disinfections, as happened with BH's. Providing high quality water in performing hemodialysis procedure has been a safe and reliable way for preventing risks to the patients.

**Key Words.** water, hemodialysis, *Pseudomonas aeruginosa*, yeast, heterotrophic bacteria, disinfections.

## INTRODUÇÃO

Hemodiálise é a modalidade terapêutica para pacientes com insuficiência renal crônica, que atende atualmente no Brasil 89,63% dos doentes. Tem como princípio remover as substâncias tóxicas e principalmente o excesso de líquido acumulado no sangue e tecidos do corpo em consequência da falência renal. No processo de hemodiálise, grandes quantidades de substâncias podem ser removidas relativamente rápidas e de maneira efetiva<sup>20</sup>.

Existem muitos relatos de morte e prejuízos à saúde de pacientes associados ao tratamento inadequado da água para diálise.

Em 1989 o "Food Drug Administration (FDA)" revisou e publicou um manual de tratamento em água de diálise e neste relacionou os sintomas com as possíveis causas de contaminação da água, os quais foram: anemia por alumínio, cloramina, cobre e zinco; doença óssea por alumínio e flúor; hemólise por cobre, nitratos, cloraminas; hipertensão por cálcio e sódio; hipotensão por bactéria, endotoxina e nitratos; acidose metabólica por baixo pH e sulfatos; degeneração neurológica por alumínio; náusea e vômito por bactéria, cálcio, cobre, endotoxina, baixo pH, magnésio, nitratos, sulfatos e zinco; morte por alumínio, flúor, endotoxina, bactéria e cloramina<sup>1</sup>.

Em 1996, na cidade de Caruaru em Recife, ocorreu um surto numa clínica que atendia 131 pacientes, que apresentavam suas funções renais comprometidas e se encontravam em tratamento dialítico. Cem pacientes desenvolveram falência aguda do fígado, sendo que 52 foram a óbito em consequência da contaminação da água de hemodiálise por toxinas de cianobactérias<sup>4</sup>.

Neste mesmo ano em Campinas, SP, ocorreu um surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* em uma unidade de hemodiálise. Foram analisadas amostras de água e dialisato e também realizadas hemoculturas dos pacientes afetados, confirmando a presença da mesma cepa de *P.aeruginosa* na amostra de água e no sangue dos pacientes<sup>19</sup>.

No Brasil, somente em outubro de 1996 entrou em vigor a Portaria 2042 do Ministério da Saúde, para tratar, especificamente, da qualidade da água para hemodiálise e essa Portaria foi substituída pela Portaria 82 de janeiro de 2000 e atualmente pela Resolução – RDC Nº 154 de 15 de junho de 2004, a qual estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços e as normas para cadastramento destes serviços pelo SUS<sup>6</sup>. Ressalta-se que esta resolução, assim como as anteriores, não incluiu nos parâmetros microbiológicos as pesquisas de leveduras e *P.aeruginosa*.

Os fatores de virulência expressos pela *Pseudomonas aeruginosa* incluem a produção de exotoxinas, a camada mucóide resistente à fagocitose, síntese de enzimas e hemolisinas que degradam o tecido do hospedeiro. Sua sobrevivência na água por longos períodos mesmo sob condições de falta de nutrientes tem sido objeto de estudo para novas medidas visando sua eliminação<sup>22</sup>.

Durante a última década os fungos emergiram como principal causa de infecções hospitalares. A maioria dos fungos é habitante natural do solo, água e raramente comportam-se como patógenos em um hospedeiro sadio. Entretanto, pacientes submetidos à hemodiálise possuem um sistema imunológico comprometido, e são suscetíveis a vários patógenos<sup>2,13</sup>.

As bactérias representam 60% das complicações que os pacientes sob diálise podem apresentar. Os fungos são causa de 15% das complicações, mas podem, em muitos casos, levar o paciente ao óbito<sup>8</sup>.

Este trabalho teve como objetivos: pesquisar leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas na água da rede pública de abastecimento e na água de diálise, tratada por osmose reversa, em duas unidades de hemodiálise, antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento de osmose reversa, durante o verão e o inverno de 2003; avaliar a eficácia da ação das membranas da osmose reversa, quantificando e comparando a condutividade, os íons sulfato, nitratos e fluoretos nas amostras de água que chegam às unidades pelo sistema de abastecimento público com a água depois de tratada por osmose reversa; pesquisar a presença de Endotoxinas bacterianas após

o tratamento por osmose reversa e propor adoção de medidas de controle para melhorar o monitoramento da qualidade da água de hemodiálise, com mais um parâmetro importante na avaliação das análises microbiológicas, fundamentadas nas conclusões deste estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 200 amostras de água, de 2 unidades de hemodiálise denominadas A e B. Na unidade A foram coletadas 107 amostras e na unidade B 93 amostras, durante 4 semanas no verão e 4 semanas no inverno do ano de 2003.

As duas unidades realizavam 3 turnos diários de atendimento a pacientes com insuficiência renal crônica. A unidade A atendia 120 pacientes e a unidade B 42 pacientes, diariamente. As duas unidades utilizavam no pré-tratamento da água para hemodiálise, filtro de areia, abrandador e filtros de carvão e no tratamento osmose reversa. A hemodiálise dos pacientes em máquinas de proporção.

Tanto a unidade A como a B contavam com 2 salas de lavagem denominadas de sala de “reuso”. A sala do “reuso” branco, para lavagem dos acessórios de pacientes não portadores de hepatite, e outra do “reuso” C, para lavagem dos acessórios dos pacientes portadores de hepatite C.

As amostras de água foram coletadas do cavalete de entrada, do pré-tratamento e de diferentes pontos de distribuição do sistema de tratamento de hemodiálise, durante o verão e inverno de 2003 (Tabela 1).

A coleta foi realizada segundo a metodologia recomendada pelo “Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater” e “American Public Health Association

(APHA)” e para a análise microbiológica foram utilizados frascos estéreis de 300mL, para a análise química de 1000 mL e para a pesquisa de endotoxinas bacterianas frascos de vidro apirogênicos de 100 mL, em duplicata. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração em recipiente térmico, encaminhado ao laboratório e submetidas à análise imediatamente<sup>12</sup>.

As técnicas utilizadas segundo Eaton et al.<sup>12</sup> foram: “Pour Plate” para contagem de bactérias heterotróficas em Ágar R2A, 35°C/72 h; membrana filtrante (100 mL) para *P. aeruginosa* em 100 mL de amostra, em Ágar Cetrimide 35°C/48h; *P. aeruginosa* isoladas foram classificadas segundo o critério apresentado pelo Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology - Palleroni<sup>18</sup>, e leveduras em 100 mL de amostra em Agar Sabouraud – dextrose com 200mg/mL de cloranfenicol, 25°C/7dias (as leveduras isoladas foram bioquimicamente caracterizadas e identificadas segundo Kurtzman e Fell<sup>15</sup>; fluoreto e condutividade<sup>12</sup>. A análise de nitrato e sulfato foi realizada segundo a metodologia recomendada pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>14</sup>. A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada segundo a metodologia recomendada pela “United States Pharmacopeia”, pelo método de formação de Gel<sup>23</sup>.

As legislações utilizadas foram: Portaria 518 de março de 2004 do Gabinete do Ministro - Ministério Da Saúde – que estabelece os parâmetros da água tratada de rede pública de abastecimento<sup>7</sup> e a Resolução RDC - N°. 154 de 15 de junho de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Ministério da Saúde, que estabelece os parâmetros da água utilizada para diálise<sup>6</sup>.

Os dados foram analisados com critério de probabilidade significativa de  $p < 0,05$ , utilizando-se do programa Epi Info 6 do Center for Disease Control & Prevention and World Health

**Tabela 1.** Número de coletas realizadas, durante o verão e inverno de 2003 nas unidades A e B.

Pontos de Coleta	Unidades						Total
	A			B			
	Verão	Inverno	Total parcial	Verão	Inverno	Total Parcial	
P1 – Cavalete de entrada	5	4	9	5	4	9	18
P2 – Pré-tratamento	5	4	9	5	4	9	18
P3 – Osmose reversa (OR)	5	4	9	5	4	9	18
P4 – Entrada da máquina	12	8	20	4	4	8	28
P5 – solução de diálise	13	8	21	5	4	9	30
P6 – Linhas e dialisador	5	4	9	4	4	8	17
P7 – “Loop” da OR	-*	-*	-*	5	4	9	9
P8 – Filtro de carvão	2	4	6	1	4	5	11
P9 – Reuso C	5	4	9	5	4	9	18
P10 – Reuso Branco	5	4	9	5	4	9	18
P11 – Reservatório da OR	4	2	6	5	4	9	15
<b>Total</b>	61	46	107	49	44	93	200

Organization<sup>11</sup>. Empregaram-se os seguintes testes : X<sup>2</sup> para análise do efeito da desinfecção nos vários pontos amostrados nas duas unidades estudadas e para a análise da sazonalidade (verão e inverno) nas duas unidades estudadas. Teste t student para a análise da condutividade, nitrato e fluoreto nos pontos amostrados nas duas unidades através da análise média comparada.

Este trabalho seguiu as recomendações da Resolução 196/96. Foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.

## RESULTADOS

Das 200 amostras de água analisadas nas duas unidades de hemodiálise durante as duas estações verão e inverno no ano de 2003, 55% (110/200) foram coletadas no verão e 45% (90/200) no inverno. Foram analisadas na unidade A 53,5% (107/200) das amostras coletadas, sendo 30,5% (61/200) do verão e 23,0% (46/200) do inverno. Na unidade B foram analisadas 46,5%, (93/200) das amostras coletadas, sendo 24,5% (49/200) do verão e 22,0% (44/200) do inverno.

Todas as amostras de água que continham leveduras estavam dentro do circuito da água após o tratamento por osmose reversa, onde foram coletadas 153 amostras nos pontos: P4- entrada da máquina, P5- solução de diálise, P6- linhas e dialisador, P7- "loop", P9- reuso C, P10- reuso branco e P11- reservatório da osmose reversa. Leveduras foram isoladas em 16,34% (25/153) amostras, sendo 5 espécies diferentes em 5 amostras na unidade A e 5 espécies em 20 amostras na unidade B. As espécies encontradas foram *Candida suecica* 36% (9/25), *Rhodotorula rubra* 12% (3/25), *Cryptococcus laurentii* 12% (3/25), *Candida fluvitalis* 4% (1/25), *Candida ciferrii* 4% (1/25), *Candida humícula* 4% (1/25), *Rhodotorula glutinis* 4% (1/25), e *Aureobasidium sp* 24% (6/25) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Espécies de leveduras isoladas nas unidades A e B

Leveduras isoladas	Unidade A	Unidade B	Total
<i>Aureobasidium sp</i>	-	6	6
<i>Candida fluvitalis</i>	-	1	1
<i>Candida ciferrii</i>	1	-	1
<i>Candida suecica</i>	-	9	9
<i>Candida humícula</i>	1	-	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	2	3
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1	-	1
<i>Rhodotorula rubra</i>	1	2	3
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>25</b>

Das 25 cepas isoladas 14 (56%) foram das salas de lavagem, sendo 28% (7/25) da sala de reuso branco e 28% (7/25) da sala de reuso C das duas unidades (Tabela 3).

*P. aeruginosa* foi isolada dentro do circuito da água após o tratamento por osmose reversa, onde foram coletadas 153 amostras nos pontos: P4- entrada da máquina, P5- solução de diálise ou "dialisato novo", P6- linhas e dialisador, P10- reuso branco (sala de lavagem de material de pacientes sem hepatite (Tabela 3).

*P. aeruginosa* foi isolada em 12,42% (19/200) das amostras. Das 19 cepas isoladas, nas duas unidades, 84,21% (16/19) foram da solução de diálise (P5), água que sai da máquina para entrar no dialisador adicionada da solução dialisadora (Tabela 3).

A pesquisa de bactérias heterotróficas foi realizada a fim de avaliar as condições higiênicas da água e estabelecer uma correlação com os patógenos oportunistas: leveduras e *P. aeruginosa*.

Das 200 amostras, 47 foram coletadas fora do sistema de tratamento da osmose reversa, sendo 18 amostras do cavalete de entrada, 18 amostras do pré-tratamento e 11 amostras dos

**Tabela 3.** Leveduras, *P. aeruginosa* e bactérias heterotróficas acima de 200 UFC/mL isoladas em 10 pontos nas duas unidades de hemodiálise analisadas

Pontos de Coleta	A			B			Total
	Leveduras	<i>P. aeruginosa</i>	BH>200UFC	Leveduras	<i>P. aeruginosa</i>	BH>200UFC	
P2 - Pré-tratamento	-	-	-	-	-	1	1
P3 - Osmose reversa	-	-	1	-	-	-	1
P4 - Entrada-máquina	-	1	13	1	-	6	21
P5 - solução de diálise	2	12	14	1	4	8	41
P6 - Linhas/ dialisador	-	-	-	2	1	-	3
P7 - "Loop"	-	-	-	3	-	4	7
P8 - Filtro de carvão	-	-	6	-	-	3	9
P9- Reuso C	2	-	8	5	-	8	23
P10 - Reuso B	1	1	6	6	-	4	18
P11 - Reservatório OR	-	-	4	2	-	2	8
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>52</b>	<b>20</b>	<b>5</b>	<b>36</b>	<b>132</b>

OR = osmose reversa

filtros de carvão e os resultados obtidos foram analisados segundo a Portaria 518/2004.

Nas 18 amostras do pré-tratamento, somente uma amostra da unidade B, apresentou contagem de bactérias heterotróficas em desacordo com a Portaria 518/2004 ( $2,2 \cdot 10^3$  UFC/mL) (Tabela 3).

Das 11 amostras coletadas nos filtros de carvão, 9 também estavam em desacordo com a Portaria 518/2004, com contagem de bactérias heterotróficas acima de 500UFC/mL, sendo que destas 4 estavam acima de  $3 \cdot 10^3$  UFC/mL.

Considerando a RDC N°. 154/2004, que trata da água de diálise, das 200 amostras analisadas, 153 foram enquadradas nesta resolução, sendo que 50,98% (78/153) estavam em desacordo, acima de 200UFC/mL. Dessas 24,35% (19/78) pertenciam à entrada da máquina (P4) e 28,21% (22/78) à solução de diálise (P5) (Tabela 3).

Observou-se diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na relação entre as amostras satisfatórias (35) e em desacordo (1) com os padrões microbiológicos vigentes para bactérias heterotróficas, nos pontos do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P3) com os demais pontos, nas 164 amostras coletadas após o tratamento de osmose reversa (Tabela 4).

Em uma das coletas do verão na unidade B foi isolado, simultaneamente, nas linhas e dialisador (P6) *Candida suecica* e *Paeruginosa* com bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL.

Em uma das coletas do inverno na unidade A foi isolado, simultaneamente, na solução de diálise (P5) *Rhodotorula rubra* e *P. aeruginosa* com bactérias heterotróficas acima de 3.000 UFC/mL.

Das 25 amostras com leveduras isoladas das unidades A e B 36% (9/25) foram satisfatórias para bactérias heterotróficas, as quais apresentaram contagem abaixo de 200 UFC/mL, segundo a RDC N°.154/2004. As 64% (16/25) das amostras restantes estavam em desacordo com a RDC N°.154/2004 por apresentarem contagem de bactérias heterotróficas acima de 200 UFC/mL.

Em 9 amostras de água aprovadas para bactérias heterotróficas, segundo a atual resolução, foram isoladas as seguintes leveduras: *C. ciferii* (1), *C. suecica* (2), *Cryptococcus laurentii* (2), *Rhodotorula rubra* (2) e *Aureobasidium sp* (2).

Das 19 amostras com *P. aeruginosa* isoladas das unidades A e B 15,80% (3/19) foram aprovadas para bactérias heterotróficas com contagem abaixo de 200 UFC/mL, segundo a RDC N°.154/2004. As 84,20% (16/19) amostras restantes além de apresentarem *P.aeruginosa* estavam em desacordo com a RDC N°. 154/2004 com contagem de bactérias heterotróficas acima de

200 UFC/mL.

Foram coletadas 36 amostras para análise dos parâmetros físico-químicos: fluoreto, nitrato, sulfato e condutividade. Sendo 18 amostras da unidade A, onde 9 eram provenientes do cavalete de entrada (P1) e 9 da osmose reversa (P3) e 18 amostras da unidade B, sendo 9 provenientes do cavalete de entrada (P1) e 9 da osmose reversa (P3).

A Portaria 518 de 23/03/2004 trata dos parâmetros físico-químicos para fluoretos, nitrato, sulfato e condutividade em água tratada destinada ao consumo humano. Já a Resolução RDC N°. 154/2004 trata destes parâmetros para a água utilizada em diálise.

Todas as 18 amostras do cavalete de entrada (P1), coletadas nas unidades A e B apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 0,8mg/L), nitrato (abaixo de 10mg/L) e sulfato (abaixo de 250 mg/L) dentro dos limites da Portaria 518/2004. Assim como as 18 amostras da osmose reversa (P3), coletadas em A e B, apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 0,2 mg/L), nitrato (abaixo de 2 mg/L) e sulfato (abaixo de 100mg/L) dentro da RDC N°.154/2004.

A Portaria 518/2004 não estabelece limite máximo para condutividade em amostras coletadas no cavalete de entrada (P1).

Todas as 18 amostras coletadas neste ponto (P1), em A e B, apresentaram teores de condutividade que variaram de 76,5  $\mu$ S/cm até 230,6  $\mu$ S/cm. Apesar da diferença estatística significativa ( $p < 0,005$ ) para condutividade em P1 em relação a P3, a condutividade em 6 das 18 amostras coletadas na osmose reversa (P3) estava fora do limite estabelecido pela RDC N°.154/2004, sendo 5 amostras em A e 1 amostra em B. As 12 amostras (P3) restantes estavam de acordo com a RDC N°.154/2004 (abaixo de 10  $\mu$ S/cm).

A diferença entre as amostras do cavalete de entrada (P1) e da osmose reversa (P3) foi significativa para as duas unidades, nas estações verão e inverno, para fluoretos, nitrato e condutividade.

A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada durante o verão e inverno nas duas unidades, no ponto da osmose reversa (P3), sendo detectada em duas amostras da unidade A durante o verão.

A desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa aconteceu nas 2 unidades uma vez por mês. Os pontos de coleta envolvidos na desinfecção do sistema foram: colunas da osmose reversa (P3); entrada da

**Tabela 4.** Comparação entre os resultados para bactérias heterotróficas das amostras colhidas nos pontos do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P3) com os demais pontos

Pontos	Satisfatórias	Em desacordo	Total	p
P1 e P3	35	1	36	<0,001
Demais Pontos	77	87	164	
<b>Total</b>	112	88	200	

máquina (P4); ponto em que a solução de diálise entrava no dialisador (P5); linhas e dialisador (P6); “loop” para o reservatório da osmose reversa (P7); reuso C (P9); reuso branco (P10); e reservatório da água tratada por osmose reversa (P11).

Foram analisados os resultados antes e depois da desinfecção, referentes à presença de leveduras, *P. aeruginosa* e contagem de bactérias heterotróficas. Esses resultados das 2 unidades foram estudados juntos por não haver diferença significativa de comportamento entre elas com relação aos efeitos da desinfecção. Em cada unidade, uma das coletas, foi realizada no dia seguinte a desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa.

Foram comparadas todas as amostras da unidade A mais B, coletadas antes da desinfecção com as amostras coletadas depois da desinfecção, a fim de verificar como se mantinha a qualidade da água ao longo do mês até a próxima desinfecção. Assim foram comparadas 153 amostras analisadas. O resultado do efeito da desinfecção nas duas unidades, nestas 153 amostras analisadas, não foi significativo ( $p > 0,05$ ) para leveduras e *P. aeruginosa*, não havendo redução destes microrganismos depois da desinfecção, porém, para bactérias

heterotróficas a redução nas duas unidades, foi significativa com  $p < 0,001$  (Tabelas 5, 6 e 7).

As leveduras isoladas antes da desinfecção foram *C. humícola*, *R. glutinis*, *C. suecica* e *C. fluvitalis*. Sendo que *C. humícola* e *R. glutinis*, estavam presentes na sala de lavagem de reuso B (P10) e solução de diálise (P5), respectivamente, e foram isoladas somente na unidade A. *C. fluvitalis* e *C. suecica* foram isoladas na sala de lavagem de reuso B (P10), sendo que a *C. suecica* foi isolada em maior quantidade de amostras em P10, porém, as duas na unidade B.

*C. ciferrii* foi isolada só na unidade A e depois da desinfecção. Enquanto *C. laurentii* e *R. rubra* foram encontradas nas unidades A e B, antes e depois da desinfecção.

*Aureobasidium* sp, foi isolado na unidade B, antes e depois da desinfecção.

Das 19 cepas de *P. aeruginosa* isoladas, 57,90% (11/19) foram de amostras coletadas na unidade A antes da desinfecção, e 10,52% (2/19) na unidade B. *P. aeruginosa* estava presente antes e depois da desinfecção nas duas unidades, sendo que 15,78% (3/19) foram isoladas na unidade A e 15,78% (3/19) na unidade B depois da desinfecção.

**Tabela 5.** Presença de leveduras antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

Leveduras	Leveduras isoladas nas unidades A e B antes e depois da desinfecção				Total	X <sup>2</sup>	p
	AD*		DD**				
	Ausência	Presença	Ausência	Presença			
Total	87	18	41	7	153	0,16	0,691

**Tabela 6.** Presença de *P. aeruginosa* antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> nas unidades A e B antes e depois da desinfecção				Total	X <sup>2</sup>	p
	AD*		DD**				
	Ausência	Presença	Ausência	Presença			
Total	92	13	42	6	153	0	0,983

\*AD = antes da desinfecção

\*\*DD = Depois da desinfecção

**Tabela 7.** Contagem de bactérias heterotróficas, abaixo e acima de 200UFC/mL antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

BH***	Bactérias heterotróficas em A e B antes e depois da desinfecção				Total	X <sup>2</sup>	p
	AD*		DD**				
	<200UFC/mL	>200UFC/mL	<200UFC/mL	>200UFC/mL			
72h							
Total	42	63	33	15	153	10,9	<0,001

\*AD = antes da desinfecção

\*\*DD = Depois da desinfecção

\*\*\*BH = bactérias heterotróficas

Com relação às bactérias heterotróficas, antes da desinfecção foram analisadas 105 amostras, sendo que 60% (63/105) estavam em desacordo com a Resolução - RDC N<sup>o</sup>.154/2004, acima de 200UFC/mL. Destas 65,08% (41/63) da unidade A e 34,92% (22/63) da unidade B. Depois da desinfecção foram analisadas 48 amostras com 31,25% (15/48) apresentando contagem acima de 200 UFC/mL. Dessas 33,34% (5/15) da unidade A e 66,66% (10/15) da unidade B.

Com relação aos resultados obtidos para o estudo da sazonalidade as 2 unidades foram avaliadas em conjunto por não haver diferença significativa na qualidade da água durante o verão e o inverno nas 200 amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

Leveduras e *Pseudomonas aeruginosa* são patógenos oportunistas. A presença desses microrganismos na água de hemodiálise pode representar riscos à saúde dos pacientes com insuficiência renal crônica. O gênero bacteriano mais isolado em águas tratadas para diálise, solução dialisadora e dialisato tem sido *Pseudomonas*<sup>5,21,13,19,3</sup>. Os fungos durante a última década surgiram como principal causa de infecções adquiridas em ambiente hospitalar<sup>2</sup>. Considerando-se as 200 amostras analisadas, o índice de contaminação por leveduras foi de 12,5% (25/200) e de *P. aeruginosa* 9,5% (19/200).

As bactérias heterotróficas, por serem utilizadas como indicadores das condições higiênicas da água, foram analisadas com o objetivo de se estabelecer relação entre a sua contagem e a presença de leveduras e *Paeruginosa*.

O fato de se ter utilizado nesse estudo o meio R2A para a contagem de bactérias heterotróficas, que apresenta melhor desempenho na recuperação de células bacterianas injuriadas, pode ter interferido na análise desta relação com leveduras e *Paeruginosa*. O número de amostras com contagem de bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL, poderia ter sido maior caso não se utilizasse o meio R2A; estaria assim, aprovando-se um maior número de amostras de água de diálise, baseados na contagem de bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL com possibilidade de estarem contaminadas por leveduras e/ou *Paeruginosa*. Linde et al.<sup>16</sup> comparando o desempenho do R2A com o TSA e com período de incubação de até 10 dias à temperatura de 25°C ± 2°C, verificou que a contagem de colônias no R2A foi significativamente maior que no TSA, tanto para solução de diálise como para as amostras de água tratada por osmose reversa. Concluiu que haveria uma discordância nos resultados de contagens de 16% quando se utilizasse o TSA, e de 3% se utilizasse o R2A.

Para ser considerada eficaz a desinfecção nos reservatórios, tubulações e máquinas deve ser realizada a um só tempo, utilizando solução germicida química específica.

A desinfecção que ocorre mensalmente em todo o sistema de osmose reversa, reduziu significativamente as bactérias heterotróficas, porém, leveduras e *P. aeruginosa*, não

apresentaram redução pela desinfecção. Sabe-se que estes microrganismos podem estar envolvidos na formação de biofilmes, tornando-se mais resistentes às desinfecções<sup>9, 10</sup>.

O ponto mais vulnerável do pré-tratamento em termos de contaminação é o filtro de carvão, que se satura pela adsorção de partículas orgânicas e de microrganismos, podendo ser foco de multiplicação desses assim como de algas. Sua troca deve ser periódica<sup>20</sup>. Nesse estudo fizemos 11 coletas deste ponto e observamos que 81,8% (9/11), apresentaram contagem de bactérias heterotróficas acima de 500UFC/mL.

A qualidade da água sofre modificações de acordo com as estações do ano, portanto as variações sazonais representam um dos fatores que influenciam no tratamento da água<sup>21</sup>.

Em nosso estudo apesar da sazonalidade não ter influenciado na quantidade de microrganismos, influenciou na diversidade da microbiota fúngica.

No verão foram quatro espécies de origem ambiental: *C. suecica*, *C. fluvitalis*, *C. ciferrii* e *Aureobasidium* sp. No inverno foram cinco espécies de origem ambiental e humana: *C. humícola*, *R. glutinis*, *C. laurentii*, *R. rubra* e *Aureobasidium* sp.

Os parâmetros físico-químicos forneceram subsídios importantes para a avaliação do trabalho das membranas da osmose reversa.

A exposição dos pacientes em hemodiálise a endotoxinas, por um longo período de tempo, pode acarretar respostas inflamatórias crônicas<sup>1</sup>. A incidência de reações pirogênicas pode ocorrer quanto maior for a contagem de colônias de bactérias heterotróficas na solução de diálise<sup>20</sup>. Baseados na Resolução a RDC N<sup>o</sup>.154/2004, que estabelece para endotoxinas bacterianas o limite de até 2 EU/mL, tivemos duas amostras em desacordo na unidade A durante o verão.

Oie et al.<sup>17</sup> sugerem que a máquina de hemodiálise é a principal fonte de contaminação da água.

Neste estudo estabeleceu-se a coleta da solução de diálise (P5), ponto que mostra a qualidade de água que entrará em contato com o sangue do paciente, formada pela água tratada de diálise mais a solução dialisadora. Este ponto revela as condições microbiológicas da máquina, pois ao analisarmos o ponto em que a água entra na máquina (P4) e o ponto antes da entrada no dialisador (P5), numa mesma coleta, estamos avaliando o percurso da água dentro da máquina de diálise. Com os resultados obtidos verificou-se, na maioria das coletas, que o (P5) apresentou maior contaminação em relação à (P4), para leveduras, *Paeruginosa* e bactérias heterotróficas nas duas unidades estudadas. (Tabela 3).

Com base nos resultados desta pesquisa propõe-se aos órgãos oficiais de controle a inclusão de novas medidas para melhorar o monitoramento da qualidade da água de hemodiálise com análises microbiológicas dos pontos: entrada da máquina, entrada do dialisador, "loop", reuso B, reuso C e reservatório da osmose reversa e pesquisas de leveduras e *Paeruginosa* nos diversos pontos de controle do sistema de hemodiálise.

## CONCLUSÕES

- Leveduras e *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas em 25 e 19 amostras, respectivamente, enquanto 88 amostras apresentaram contagem de bactérias heterotróficas em desacordo com a legislação vigente.
- A desinfecção do sistema de hemodiálise não apresentou a mesma eficácia para leveduras e *P.aeruginosa* como apresentou para bactérias heterotróficas
- A sazonalidade não influenciou na quantidade dos microrganismos isolados, porém, na diversidade da microbiota fúngica.
- As cepas de leveduras isoladas são de origem humana e ambiental.
- As membranas da osmose reversa foram 100% eficazes na redução dos íons sulfatos, nitratos e fluoretos e 66,67% com relação a condutividade.

## AGRADECIMENTOS

À Vigilância Sanitária de Piracicaba, representada na pessoa do Engenheiro Flávio Bush, pelo auxílio prestado durante as coletas.

## REFERÊNCIAS

1. Amato, R.L. Water Treatment for Hemodialysis, Including the Latest AMMI Standards. **J Nephrol Nurs**, 28:612-9,2001.
2. Arvanitidou, M. et al. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. **J. Hospital Infection**, 45: 225-30, 2000
3. Arvanitidou, M et al. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **J. Applied Microbiology**, 95:180-5, 2003.
4. Azevedo, S.M et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, 182: 441-446,2002.
5. Bambauer, R. et al. Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. **ASAIO J.**, 40: 1012-6,1994.
6. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Diretoria Colegiada Nº154, - **Diário Oficial da União**, de 17 de junho de 2004, Brasília; Seção 1, p.65-9.
7. Brasil, Portaria Nº 518, de março de 2004, Gabinete do Ministro – Ministério Da Saúde, **Diário Oficial da União**, Brasília nº 59 de 26/03/2004, Seção 1, pág. 266 –70
8. Brem, A. Fungal peritonitis in patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Europ. J.Clin.Microbio.Infect.Disease**, 17: 839-43, 1998
9. Cappelli, G. et al. Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. **J. Blood Purif**, 18(3):224-30, 2000.
10. Capelli, G. et al. C. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **J. Nephrol Dial Transplant**, 18(10): 2105-11, 2003.
11. Center For disease Control & Prevention, USA e World Health Organization, Geneva, Switzerland. **Epi Info 6**, 1994; version 6.02.
12. Eaton, A.D. et al. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, Washington, DC. (APHA). 19<sup>th</sup> ed., 1995.
13. Favero, M.S. et al.. Dialysis-associated infections and their control. **J. Hospital Infection**, 24: 357-78,1998.
14. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Químicos e Físico para Análise de Alimentos. São Paulo. 3<sup>a</sup>.ed., Sulfato e Nitrato, 1985; V.1, p.302-30.
15. Kurtzman, C.P. e Fell, J.W.. **The yeasts: a taxonomic study**, New York, 1998.
16. Linde, K. et al. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. **Nephrol Dial Transplant**, 14: 2433-7, 1999.
17. Oie, S. et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **J. Hospital Infection**, 54:115-9, 2003.
18. Palleroni, N.J. Genus I – *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986, p.141-99.
19. Pisan, B. et al. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na Unidade de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 51-6, 2000.
20. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância. **Roteiro de Inspeção da Vigilância Sanitária de Serviços de Terapia renal Substitutiva**, 1997.
21. Silva, A.M.M. et al. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.** 18 (2):180-8,1996.
22. Teixeira, P et al.. Evaluation Of Survival Patterns And Cellular Injury Of *Pseudomonas aeruginosa* In Different Bottled Waters Stored Under Various Conditions. **J. Food Safety**. 21: 167-80, 2001.
23. USA, Pharmacopeia, USP XXIV, Rockville, Twinbrook Parkway, Bacterial Endotoxins Test, 1995; 24:1829-30.