

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE DE
PRODUTOS E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA.
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**PRESENÇA DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* NA ÁGUA
TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO PERÍODO DE 2007 A 2009**

Hilda do Nascimento Nóbrega

Rio de Janeiro

2010

PRESENÇA DE *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* NA ÁGUA
TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO PERÍODO DE 2007 A 2009

Hilda do Nascimento Nóbrega

Curso de Especialização em Controle da
Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços
Vinculados à Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Joana Angélica Barbosa Ferreira

Rio de Janeiro

2010

*PRESENÇA DE STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA NA ÁGUA
TRATADA PARA HEMODIÁLISE NO PERÍODO DE 2007 A 2009*

Hilda do Nascimento Nóbrega

Monografia submetida à Comissão Examinadora composta pelos professores e tecnologistas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Especialização em Controle de Qualidade em Produtos e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em 09 / 12 / 2010

Profa. Dra. Helena Pereira da Silva Zamith
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Ms. Elizabeth Porto Reis Lucas
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Profa. Ms. Catia Aparecida Chaia Miranda Fernandes
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Orientador:

Profa. Ms. Joana Angélica Barbosa Ferreira
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz

Nóbrega, Hilda do Nascimento

Presença de *Stenotrophomonas maltophilia* na Água Tratada para Hemodiálise no período de 2007 a 2009 / Hilda do Nascimento Nóbrega. - Rio de Janeiro: FIOCRUZ / INCQS, 2010.

xii, 29 f. : il. ; 29,5 cm.

Trabalho de conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010.
Orientadora: Joana Angélica Barbosa Ferreira

1. *Stenotrophomonas maltophilia* 2. Microbiologia. I. Título.

Presence of *Stenotrophomonas maltophilia* in Treated Water for Hemodialysis in the Period 2007-2009.

Para Carlos Eduardo, pelo apoio intelectual e psicológico, por me encorajar e lembrar que tudo pode dar certo.

“A ciência é antes um modo de pensar do que propriamente um conjunto de conhecimentos. Seu objetivo é compreender de que forma o mundo funciona, procurar as regularidades que possam existir, penetrar nas conexões das coisas, desde as partículas subnucleares, que talvez sejam as componentes de toda a matéria, até os organismos vivos e a comunidade social humana, e daí ao cosmo como um todo. [...] A ciência é baseada na experimentação, na disposição de desafiar velhos dogmas, numa abertura para ver o universo como ele realmente é. Nesse pressuposto, a ciência muitas vezes requer coragem — pelo menos a coragem de questionar a sabedoria convencional.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Ms. Joana Angélica Barbosa Ferreira, pela receptividade e a orientação, somados ao apoio, às críticas e sugestões, ao ensino e à confiança, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A toda a equipe do Setor de Medicamentos Não-Estéreis, Cosméticos, Artigos e Insumos de Saúde.

À Coordenação de Pós Graduação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde do INCQS/Fiocruz e a seus professores, cujos cursos tive a oportunidade de frequentar durante a especialização.

RESUMO

A terapia renal substitutiva ou hemodiálise é um tratamento primordial para pacientes com insuficiência renal crônica. Apesar das diversas barreiras existentes no sistema de tratamento da água utilizada, ainda existe o risco de contaminação bacteriana. Vários microrganismos patogênicos têm sido pesquisados e identificados por meio da análise microbiológica desta água, demonstrando elevados níveis de reações pirogênicas e bacteremias. Dentre os microrganismos presentes na água purificada, a predominância é de bactérias Gram negativas como a *Stenotrophomonas maltophilia*, potencialmente patogênica quando presente em níveis elevados. O presente estudo aponta este microrganismo como um dos patógenos responsáveis pela contaminação da água de hemodiálise, ressaltando a eficácia do programa de monitoramento conduzido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS/Fiocruz), em colaboração com Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e pela Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização do Município do Rio de Janeiro desde 1999. Os dados apresentados neste trabalho correspondem ao período 2007-2009 e demonstram que, como resultado do constante monitoramento realizado em clínicas de diálise, houve uma redução significativa na presença de *Stenotrophomonas maltophilia* nas amostras analisadas. Em 2007, o nível de contaminação estava em torno de 35%, em 2008, em 13%, e em 2009, em 4,0%. Fica também aqui realçada a necessidade de manutenção desse controle rigoroso do sistema de tratamento da água para hemodiálise, aspecto fundamental para garantir uma boa qualidade de vida dos pacientes envolvidos.

Palavras-chave: hemodiálise, contaminação, *Stenotrophomonas maltophilia*, reações pirogênicas.

ABSTRACT

The renal replacement therapy or dialysis treatment is essential for patients with chronic renal failure. Despite multiple barriers in water treatment system used, there is still the risk of bacterial contamination. Several pathogens have been researched and identified through the microbiological analysis of water, showing high levels of pyrogenic reactions and bacteremia. Among the microorganisms present in purified water, there is a predominance of gram negative bacteria such as *Stenotrophomonas maltophilia*, potentially pathogenic when present at high levels. This study shows that micro-organism as a pathogen responsible for the contamination of hemodialysis water, highlighting the effectiveness of the monitoring program conducted by Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS/Fiocruz), in collaboration with Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro and Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização do Município do Rio de Janeiro since 1999. The data presented in this study correspond to the period 2007-2009 and show that, as a result of constant monitoring carried out in dialysis clinics, there was a significant reduction in the presence of *Stenotrophomonas maltophilia* in the samples considered. In 2007, the level of contamination was 35%, in 2008, 13%, and in 2009, 4.0%. It is here also highlighted the need to maintain strict control of the system of water treatment for hemodialysis, an essential aspect to ensure good quality of life to the patients involved.

Keywords: hemodialysis, contamination, *Stenotrofomonas maltophilia*, pyrogenic reactions.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| INCQS | Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |
| USP | United States Pharmacopoeia |
| SBN | Sociedade Brasileira de Nefrologia |
| LPS | Lipopolissacarideo |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| POP | Procedimento Operacional Padrão |
| EU | Endotoxine Units |
| AAMI | Associação de Desenvolvimento de Instrumentação Médica |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – Máquina de hemodiálise | 4 |
| FIGURA 2 – Característica da <i>S. maltophilia</i> | 5 |
| FIGURA 2.1 - Teste da Gelatinase e Hidrólise Esculina positivos para <i>S. maltophilia</i> | 6 |
| FIGURA 3 – Isolamento de colônias distintas para pesquisa específica | 14 |
| FIGURA 4 – Presença de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> na água para hemodiálise em 2007. | 16 |
| FIGURA 5 – Presença de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> na água para hemodiálise em 2008. | 17 |
| FIGURA 6 – Presença de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> na água para hemodiálise em 2009. | 18 |
| FIGURA 7 – Pré-tratamento de água para diálise..... | 20 |
| FIGURA 8 – Sistema de pós-tratamento de água para diálise..... | 21 |
| FIGURA 9 – Sistema de reuso e da máquina diálise. | 22 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Limites microbiológicos | 10 |
| TABELA 2 – Pesquisa e identificação microbiana | 15 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 . INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Terapia renal substitutiva | 1 |
| 1.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 5 |
| 1.2.1. Microrganismo Gram negativo | 5 |
| 1.3. Limites microbiológicos | 9 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 11 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 11 |
| 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 12 |
| 5. RESULTADOS | 16 |
| 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO | 19 |
| 7. MEIOS UTILIZADOS..... | 23 |
| 7.1. Ágar Mac Conkey | 23 |
| 7.2. Ágar Citrato de Simmons | 23 |
| 7.3. Ágar Desoxirribonuclease | 23 |
| 7.4. Caldo Lisina, arginina e ornitina | 24 |
| 7.5. Ágar Cetrimide | 24 |
| 7.6. Ágar Uréia | 24 |
| 7.7. Agar Semi Sólido H ₂ S, Indol e Mobilidade (SIM) | 25 |
| 7.8. Caldo Nitrato | 25 |
| 7.9. Caldo para Fermentação de Açúcares | 25 |
| 7.9.1. Indicador de Andrade | 25 |
| 7.9.2. Solução de Açúcar | 25 |
| 7.10. Caldo Vermelho de Metila - Voges Proskauer..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 8. REAGENTES E SOLUÇÕES | 26 |
| 8.1. Reagente de Kovacs ou Ehrlich | 26 |
| 8.1.1. Kovacs..... | 26 |
| 8.1.2. Ehrlich | 26 |
| 8.2. Reagente para o teste de oxidase..... | 26 |
| 8.3. Reagente para o teste de vermelho de metila | 26 |
| 8.4. Reagentes para o teste de Voges-Proskauer..... | 26 |
| 8.4.1. Solução 1 | 26 |
| 8.4.2. Solução 2 | 26 |
| 8.5. Reagentes para Nitrato (GREISS-ILOSVOY) | 27 |
| 8.5.1. Reagente A : α -Naftilamina 0,5% ou Dimetil-L-Naftilamina a 0,6%..... | 27 |
| 8.5.2. Reagente B : Ácido Sulfanílico a 0,8%..... | 27 |
| 8.6. Solução de cristal violeta..... | 27 |
| 8.6.1. Solução A..... | 27 |
| 8.6.2. Solução B | 27 |
| 8.7. Solução de Lugol (Solução de Iodo de Gram) | 27 |
| 8.8. Solução de safranina..... | 27 |
| 8.9. Solução de álcool-acetona | 27 |
| REFERÊNCIAS | 28 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

A hemodiálise é a técnica que, baseada em vários princípios físicos (osmose, difusão etc.), transfere solutos de um meio mais concentrado para outro menos concentrado. No caso do enfermo com insuficiência renal crônica, transfere solutos desde o sangue até o líquido de diálise. Os solutos do dito líquido também podem penetrar no sangue do doente, fato que serve para restaurar o déficit de solutos essenciais. (RILEY, et al., 1990).

A terapia renal substitutiva ou hemodiálise é um tratamento primordial para pacientes com insuficiência renal crônica. A situação torna-se crucial em razão das dificuldades na obtenção de um transplante renal. Um paciente pode atualmente ter que esperar por anos para obtê-lo e, durante este tempo, a qualidade do tratamento de hemodiálise a ele prestado será fator preponderante para a sobrevivência e a qualidade de vida (FAVERO et al., 1992; HOENICH, RONCO & LEVIN, 2006).

A importância da hemodiálise pode ser evidenciada por dados que registram que, no mês de janeiro de 2006, cerca de 60 mil brasileiros foram submetidos a este tratamento (SBN, 2006). Entre esses, poucos conseguiram recuperar o funcionamento dos rins e apenas um pequeno número desses pacientes conseguiu ser submetido a um transplante renal (FERREIRA, 2006).

A hemodiálise promove a restauração dos eletrólitos e o balanço ácido base, além da remoção de substâncias tóxicas e do excesso de líquido acumulado no sangue e nos tecidos do corpo em consequência da falência renal. Este processo ocorre no dialisador (máquina de hemodiálise), também conhecido como “rim artificial”, que possui um sistema contendo uma membrana semipermeável na qual existem um fluxo contra-paralelo do sangue do paciente e o fluido de diálise (dialisato), onde ocorre a migração de substâncias entre os dois sistemas. Após o processo de difusão, o sangue depurado retorna para o paciente (FERREIRA, 2006). A água purificada é armazenada em reservatórios e distribuída por tubulações para as máquinas. O projeto das tubulações deve evitar zonas mortas e volumes de água que não

circulem. É recomendado que a água circule constantemente para evitar proliferação bacteriana. O sistema deve ser projetado de forma a facilitar a limpeza, a desinfecção e o enxágue do desinfetante (CALDERARO & BISCHOFBERGER, 1998).

Apesar das múltiplas barreiras presentes no sistema de tratamento, que podem remover bactérias da água, existe ainda o risco de contaminação bacteriana (MORIN, 2000). A prevenção da contaminação da água requer conhecimento da origem do problema dentro da linha de tratamento. Nestes casos, existe a necessidade da caracterização bacteriológica seguida do tratamento da fonte de contaminação. A solução mais frequentemente adotada é o uso de um método de desinfecção, tal como a cloração. Barato e fácil de aplicar, o hipoclorito de sódio é também o mais eficiente desinfetante contra biofilmes que são formados sobre superfícies e que consistem de microcolônias de bactérias embebidas numa matriz extracelular protetora secretada pelas células que promovem a adesão (MORIN, 2000; RUTALA E WEBER, 1997).

A necessidade de um controle rigoroso no serviço de hemodiálise tornou-se algo de extrema importância para garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes submetidos a este tratamento, uma vez que a falta de controle de qualidade da água tem levado a óbito vários pacientes. O estudo de LIMA (2005) teve como objetivo avaliar as características físico-químicas e bacteriológicas da água utilizada pelos serviços de hemodiálise em hospitais da cidade de São Luís. Os microrganismos identificados na unidade hospitalar B foram: *Burkholderia cepacia*, *Alcaligenes xiloxidans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Na unidade C, foram identificados: *Flavimonas oryzihabitans*, *Ralstonia pickettii* e *Burkholderia cepaci*. Já na unidade A, os níveis de cloro livre estavam dentro dos valores permitidos, nenhum crescimento bacteriano foi observada. O cloro livre e seus derivados (dióxidos de hipoclorito, e cloraminas) são adicionados à água natural para eliminar microrganismos e / ou para oxidar certos iões indesejáveis, tais como ferro e manganês. Houve uma correlação significativa entre a presença de endotoxinas e características físico-químicas da água, tais como turbidez e condutividade. Estes dados revelaram que duas das três unidades hospitalares avaliadas precisavam rever o controle do sistema de água de hemodiálise.

O aspecto microbiológico do tratamento da água foi levado em conta quando se demonstrou que os excessivos níveis de bactérias no dialisato eram responsáveis pelas reações pirogênicas e por bacteremia (LONNEMANN, 2000). Estudos demonstraram que a endotoxina derivada de bactérias Gram negativas podem penetrar na membrana semipermeável do dialisato e ser responsável por reações pirogênicas em pacientes em hemodiálise (LONNEMANN, 1993).

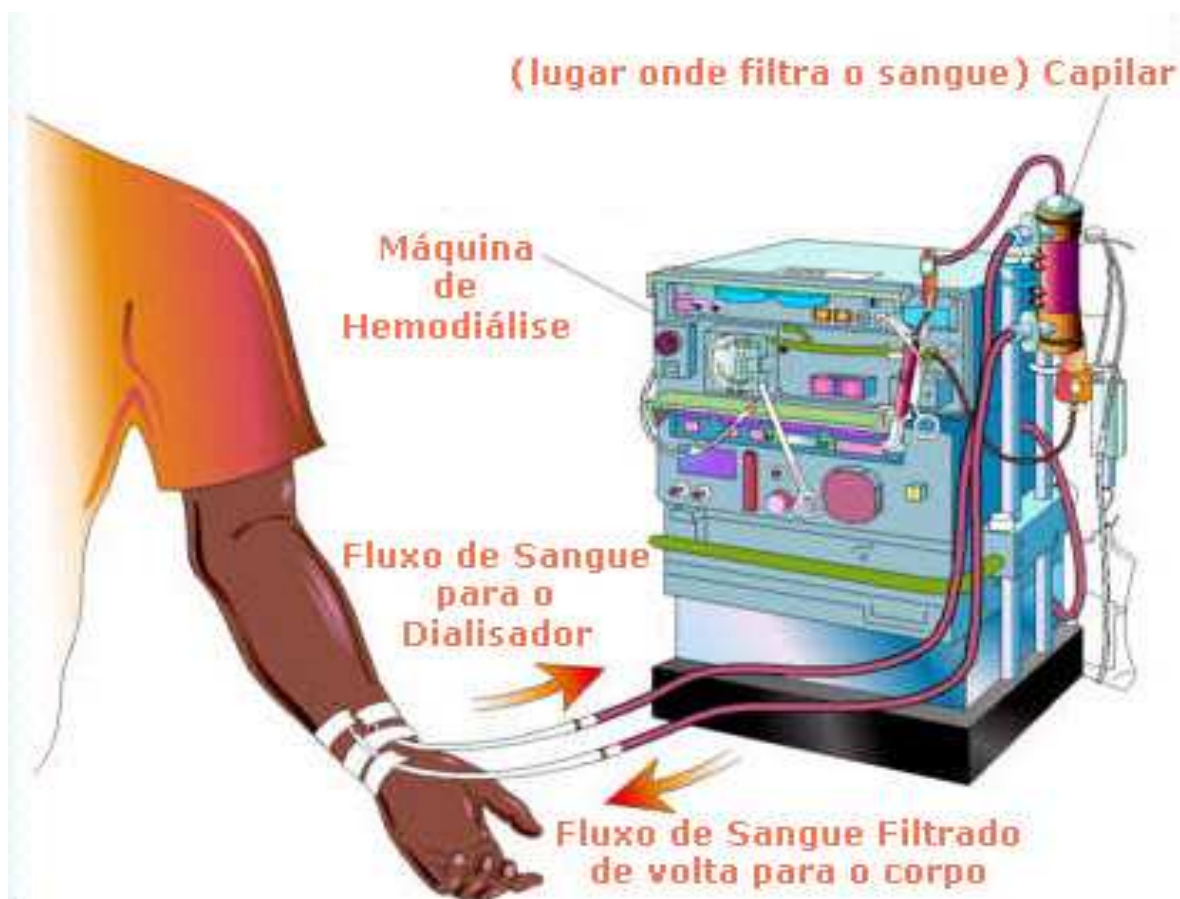
A atividade biológica da endotoxina bacteriana está associada ao lipopolissacarídeo (LPS). A toxicidade está relacionada com o componente lipídico (lipídeo A) e a imunogenicidade está associada ao componente polissacarídico. Os antígenos da parede celular (antígenos O) são também componentes do LPS (ALBERTINO, 2009).

A bacteremia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes de hemodiálise e tem sido atribuída a diferentes causas (AAMI, 2004). A infecção pelo acesso vascular é a causa mais comum devido a cuidados inadequados com o cateter (TENA, et al., 2005; LO CASCIO et al, 2006), entretanto alguns estudos observam uma relação direta entre a ocorrência de casos de bacteremia causadas por bactérias e o isolamento desses microrganismos a partir da água purificada, possivelmente devido a defeitos na integridade da membrana ou à utilização de água contaminada no reprocessamento das máquinas de diálise (WANG et al., 1999; MAGALHÃES et al., 2003).

A água purificada contém predominantemente bactérias Gram negativas do ambiente aquático com índices elevados da espécie de *Stenotrophomonas maltophilia*, que pode crescer nos circuitos de água e nas máquinas de hemodiálise e subsequentemente contaminar o dialisato (BOMMER & JABERT, 2006). Outros estudos sobre identificação dos contaminantes bacterianos da água utilizada para hemodiálise indicam que o gênero bacteriano predominante é *Stenotrophomonas* (MORIN, 2000; FAVERO et al., 1992). Atualmente, várias discussões têm abordado o uso de dialisatos ultrapuros, que possuem limites de contagem menor que 0,1 UFC/mL e nível de endotoxina menor que 0,03 EU/mL, para prevenir a inflamação crônica em pacientes em tratamento por hemodiálise e possíveis infecções devido a contaminações do dialisato (AAMI, 2001; ARIZONO et al., 2004; WARD, 2004; BOMMER & JABERT, 2006).

Tendo como base as doenças que acometem os pacientes de diálise e suas sintomatologias (tais como: glomerulonefrite, o diabetes, a Hipertensão Arterial (pressão alta) e as infecções urinárias repetidas, que ocorrem quando há dificuldades de escoamento da urina, presença de cálculos ou cistos Renais. Algumas doenças levam anos ou até mesmo décadas para que seu dano se torne aparente), este estudo tem por objetivo a análise da contaminação microbiológica por *Stenotrophomonas maltophilia* relacionada com tais patologias. Neste caso, serão utilizadas as metodologias específicas e a legislação vigente, de acordo com os limites estabelecidos pela RDC nº 154/2004 (republicada em 2006). A contaminação pelo microrganismo em estudo foi quantificada e relacionada com a sintomatologia dos pacientes submetidos à hemodiálise (FIGURA 1).

FIGURA 1. MÁQUINA DE HEMODIÁLISE.



Representação esquemática de uma sessão de hemodiálise.

Fonte: <http://www.jesocarneiro.com.br/saude/hemodialise-estrangulada.html> [Acesso em 20 de novembro de 2010].

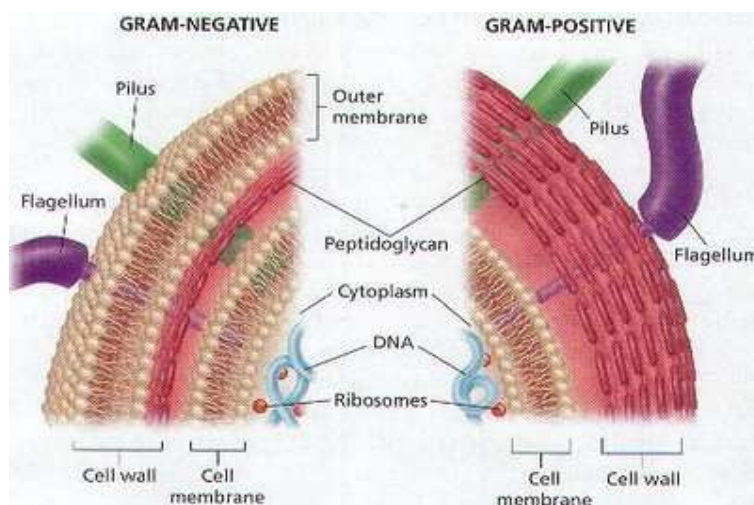
1.2. *Stenotrophomonas maltophilia*

S. maltophilia é um dos bacilos Gram-negativos não-fermentadores mais comumente isolados. Este microrganismo era originalmente classificado no gênero *Pseudomonas* e, mais recentemente, foi incluído no gênero *Xanthomonas*. Apesar da confusão criada por estas alterações taxonômicas, a importância clínica deste patógeno oportunista é bem conhecida. Este microrganismo é responsável por infecções em pacientes debilitados com comprometimento dos mecanismos de defesa. Como *S. maltophilia* mostra-se resistente à maioria dos antibióticos betalactâmicos e aminoglicosídeos comumente utilizados, os pacientes que recebem antibioticoterapia a longo prazo apresentam um risco particular de adquirir infecções por este microrganismo. (MURRAY, 2000).

O espectro de infecções hospitalares causadas por *S. maltophilia* é amplo e inclui bacteremia, pneumonia, meningite, infecções de feridas e infecções das vias urinárias. Epidemias hospitalares causadas por este microrganismo foram atribuídas à contaminação de solução desinfetantes, equipamento de tratamento respiratório ou de monitorização máquinas de fabricação de gelo e tratamento de diálise. (MURRAY, 2000).

O tratamento antimicrobiano é complicado, uma vez que o microrganismo é resistente a muitos fármacos comumente utilizados. (MURRAY, 2000).

1.2.1. Microrganismo Gram-negativo



Fonte: www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg

[acesso em 1 de dezembro de 2010]

FIGURA 2. CARACTERÍSTICA DA *Stenotrophomonas maltophilia*.

A gelatina hidrolisada já não tem a capacidade de gel e, assim, continua a ser um líquido, mesmo se forem colocados a temperaturas inferiores a 28 graus. A presença ou ausência de gelatinase pode ser usado para ajudar na identificação de determinadas bactérias.



FIGURA 2.1. Teste da Gelatinase e da Hidrólise Esculina positivos para *S. maltophilia*

Bactéria presente no ambiente, no solo e na água, a *Stenotrophomonas maltophilia* pode ser transmitida de pessoa para pessoa através de fluidos corporais. Pacientes contaminados por *Stenotrophomonas maltophilia* nos pulmões poderão transmiti-la através de tosses e espirros. A bactéria pode causar sangramentos e feridas e doenças como a pneumonia, mas pode também, dependendo de sua quantidade e de outros fatores, estar presente no organismo sem causar infecções. Uma vez que o paciente tenha sido exposto à bactéria, poderá ocorrer colonização.

No ambiente hospitalar, este microrganismo já foi isolado de água de torneira, pias, respiradores, cateteres de sucção, monitores de pressão arterial, termômetros, equipamentos de diálise, máquinas produtoras de gelo, soluções desinfetantes e, ocasionalmente, das mãos de profissionais de saúde. Também é comum em hospitais como agente comensal da flora endógena do paciente. Foi isolada inicialmente de fezes humanas. (FREITAS, 2008).

Segundo ALMEIDA et al. (2005), a *Stenotrophomonas maltophilia* é um microrganismo cuja história vem mostrar a variedade de gêneros a que já pertenceu. Um exemplo é o da *Pseudomonas maltophilia*, marcando a sua extrema semelhança bioquímica e sintomatológica com o gênero *Pseudomonas*, bactéria patogênica altamente perigosa e principal responsável por infecções hospitalares.

No artigo citado, a *Stenotrophomonas maltophilia* pode ser encontrada em uma grande variedade de ambientes e regiões geográficas, ocupando nichos ecológicos distintos e fontes múltiplas de água, tais como: rios, poços, lagos de reservatórios municipais e até a água utilizada na indústria farmacêutica. Outras fontes de isolamento incluem o solo, detritos, leite cru, peixe congelado, ovos e carcaças de animais. Outras fontes secas e destituídas de nutrientes, como curativos de algodão e placas de Petri, foram descritas como microambientes para a *Stenotrophomonas maltophilia*. Recentemente, foram caracterizadas outras fontes de isolamento inusitadas, como o sêmen e embriões bovinos congelados. Daí a grande importância de se pesquisar esse microrganismo.

A diversidade de ambientes e condições físico-químicas em que a *Stenotrophomonas maltophilia* habita favorecem a síntese dos metabólitos que garantem a sua sobrevivência em nichos polimicrobianos. Dentre esses metabólitos, destacam-se a pirrolnitrina e a maltofilina, cujas atividades estão direcionadas contra fungos patogênicos, como a *Candida* spp. e o *Aspergillus fumigatus*,

Em ALMEIDA, 2005, a *Stenotrophomonas maltophilia* é também caracterizada com base em estudos que descrevem a produção de enzimas extracelulares, previamente associadas como fatores de virulência em processos infecciosos originados por outros microrganismos, demonstrando a harmoniosa convivência desses microrganismos no ambiente propício. Além dos outros elementos que podem atuar em processos infecciosos e/ou na colonização, os flagelos e a adesina fimbriada permitem a fixação da bactéria em superfície inerte, resultando na formação de biofilme e constituindo vantagens adaptativas.

Alterações mucocutâneas provocadas por procedimentos invasivos, tais como entubação, sondas, cateteres ou próteses valvulares, podem conferir risco aumentado de sobrevivência e multiplicação dessa bactéria.

Adicionalmente, a habilidade de multiplicação da *Stenotrophomonas maltophilia* em soluções de nutrição parenteral, em infusões intravenosas e em fluidos de diálise, liberando pirogênio de baixo peso molecular, contribui para a patogênese das infecções e suas manifestações febris. Outro aspecto importante apontado pelos resultados da pesquisa diz respeito à suscetibilidade antimicrobiana de *Stenotrophomonas maltophilia*, que se caracteriza por ser uma bactéria multirresistente aos antimicrobianos clássicos, incluindo β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos.

As manifestações clínicas a que se refere o trabalho e seus fatores de risco mostram ser a *Stenotrophomonas maltophilia* potencialmente patogênica e oportunista, principalmente em ambiente nosocomial. Deste modo, vários surtos de infecção ou colonização intra-hospitalar já foram descritas. Das manifestações clínicas associadas à presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, algumas das mais comumente referidas são: bacteremia, septicemia, endocardite, pneumonia, meningite, infecção do trato urinário, entre outras.

Além dessas, a *Stenotrophomonas maltophilia* é frequentemente isolada a partir de lesões da pele ou ferimentos e em pacientes portadores de fibrose cística. A *Stenotrophomonas maltophilia* possui um potencial patogênico que a torna forte indicador de taxa de mortalidade (em torno de 40%) entre indivíduos severamente debilitados ou imunodeprimidos. Os fatores de risco associados às infecções por *Stenotrophomonas maltophilia* incluem a hospitalização prolongada, a quimioprofilaxia, a cirurgia cardíaca associada ou não ao uso prévio de fármacos intravenosos, o comprometimento congênito das válvulas cardíacas e o trauma.

Para ALMEIDA, 2005, o estabelecimento de um perfil epidemiológico das infecções causadas por *Stenotrophomonas maltophilia* tem aprimorado estratégias de tipagem baseadas em métodos fenotípicos ou genotípicos. Os fenotípicos, por exemplo, são baseados em características bioquímicas, fisiológicas e antigênicas, isto é, na análise dos produtos de expressão gênica do microrganismo. O antibiograma é considerado um desses métodos de tipagem, apesar de seu baixo poder discriminatório quando se pretende diferenciar populações bacterianas que exibem resistência intrínseca e/ou adquirida.

A conclusão de ALMEIDA, 2005, é a de que a *Stenotrophomonas maltophilia* é um patógeno emergente, que apresenta resistência intrínseca à maioria dos antimicrobianos e resistência adquirida aos poucos disponíveis contra eles, sobretudo em virtude da utilização indevida de fármacos cada vez mais potentes. Apresenta-se em grande diversidade de ambientes, aumentando assim, as possíveis fontes de contaminação.

1.3 LIMITES MICROBIOLÓGICOS

Embora o papel da qualidade da água usada para a hemodiálise tenha sido enfatizado por vários autores, não existe uma padronização universal que inclua todos os parâmetros químicos e microbiológicos. Uma vez que a pureza do dialisato está relacionada com complicações agudas e crônicas em pacientes em tratamento por hemodiálise, os limites de contagem microbiana e de endotoxina têm sido reduzidos (WARD, 2004).

Em 1981, a *Association Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI) recomendava o limite de 2000 UFC/mL para o dialisato, 200 UFC/mL para a água purificada e não havia limite para endotoxinas. Atualmente, há o limite de 200 UFC/mL e 2 EU/mL para o dialisato (AAMI, 2001).

O limite de contagem microbiana de 100 UFC/mL é recomendado para o dialisato no Japão e na Suécia e nos Estados Unidos da América. A Farmacopéia Européia (*EUROPEAN PHARMACOPOEIA*, 2002) recomenda o valor de 100 UFC/mL para água purificada.

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). Mais recentemente, vários relatos têm discutido a utilização do dialisato ultrapuro (BOMMER e JABER, 2006).

Os parâmetros utilizados no presente estudo foram estabelecidos pela RDC nº 154/2006, que fixa o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise. De acordo com a resolução citada, que é a legislação vigente no Brasil, o limite microbiológico é de no máximo 200 UFC/mL para a água purificada e de 2000 UFC/mL para o dialisato. O padrão estabelecido é de ausência de coliformes totais em 100mL de água tratada.

TABELA 1. LIMITES MICROBIOLÓGICOS.

RDC nº 154/2004 (republicada em 2006)

| Componentes | Valor máximo permitido |
|---|-------------------------------|
| Coliforme total | Ausência em 100 mL |
| Contagem de bactérias heterotróficas | 200 UFC/mL |
| Contagem de bactérias heterotróficas(colhida da máquina ou dialisato) | 2000 UFC/mL |
| Endotoxinas | 2EU/mL |

Segundo a RDC 154/2004, as amostras da água para fins de análises físico-químicas e microbiológicas devem ser colhidas nos pontos contíguos à máquina de hemodiálise e no reuso, devendo ser um dos pontos na parte mais distal da alça de distribuição (loop).

O nível de ação relacionado à contagem de bactérias heterotróficas é de 50 UFC/ml; Deve ser verificada a qualidade bacteriológica da água tratada para diálise toda vez que ocorrerem manifestações pirogênicas, bacteremia ou suspeitas de septicemia nos pacientes. Os serviços de tratamento e distribuição de água da rede pública devem disponibilizar às Secretarias de Saúde os laudos dos exames de controle de qualidade da água potável e informar sobre qualquer alteração no método de tratamento ou sobre acidentes que possam modificar o padrão da água potável. Os resultados das análises realizadas para controle das condições de potabilidade da água da rede pública devem ser fornecidos pelas Secretarias de Saúde aos serviços de diálise (RDC 154/2004).

2. JUSTIFICATIVA

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade (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 do Município do Rio de Janeiro.

A importância da qualidade da água é evidente e avaliá-la ao longo de todo o processo desde o ponto de entrada, antes do tratamento de purificação, após diferentes etapas deste e em pontos de utilização é primordial para obter informações que orientam o desenvolvimento tecnológico do processo e a tomada de medidas de vigilância sanitária visando à minimização dos riscos para os pacientes de hemodiálise.

Tendo como base as doenças que acometem os pacientes de diálise e as suas sintomatologias, este tema de estudo que é a presença de *Stenotrophomonas maltophilia* na água tratada para hemodiálise e no dialisato, conforme dados coletados no período que vai de 2007 a 2009. Foram utilizadas as metodologias específicas de acordo com a legislação vigente (RDC nº 154/2006). A contaminação pelo microrganismo foi quantificada, pesquisada e relacionada com a sintomatologia dos pacientes submetidos a terapia renal substitutiva.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada nas unidades de tratamento por hemodiálise quanto à presença de *Stenotrophomonas maltophilia*, visando a auxiliar as ações de vigilância sanitária e o desenvolvimento tecnológico para a melhoria contínua do tratamento oferecido aos pacientes, verificando o cumprimento da Resolução RDC nº154/2006.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar pesquisa de *Stenotrophomonas maltophilia* nas amostras de água de diferentes pontos do sistema de tratamento de água tratada para hemodiálise e no dialisato.
- Avaliar os resultados obtidos a partir das análises da água com a presença de *Stenotrophomonas maltophilia* realizadas no período de 2007 a 2009.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 70 isolados de 20 clínicas de hemodiálise localizadas no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2007 a 2009, considerando-se as especificações da RDC Nº 154/2006.

Foram coletadas amostras provenientes de diversos pontos do sistema de tratamento de água:

- Pós-osmose reversa (FIG.8)
- Sala de reuso (FIG.9)
- Dialisato (FIG.9)

Foi coletado um volume aproximado de 200 mL de água tratada para hemodiálise em frascos estéreis. As amostras foram mantidas em temperatura inferior a 10°C e processadas no mesmo dia da coleta.

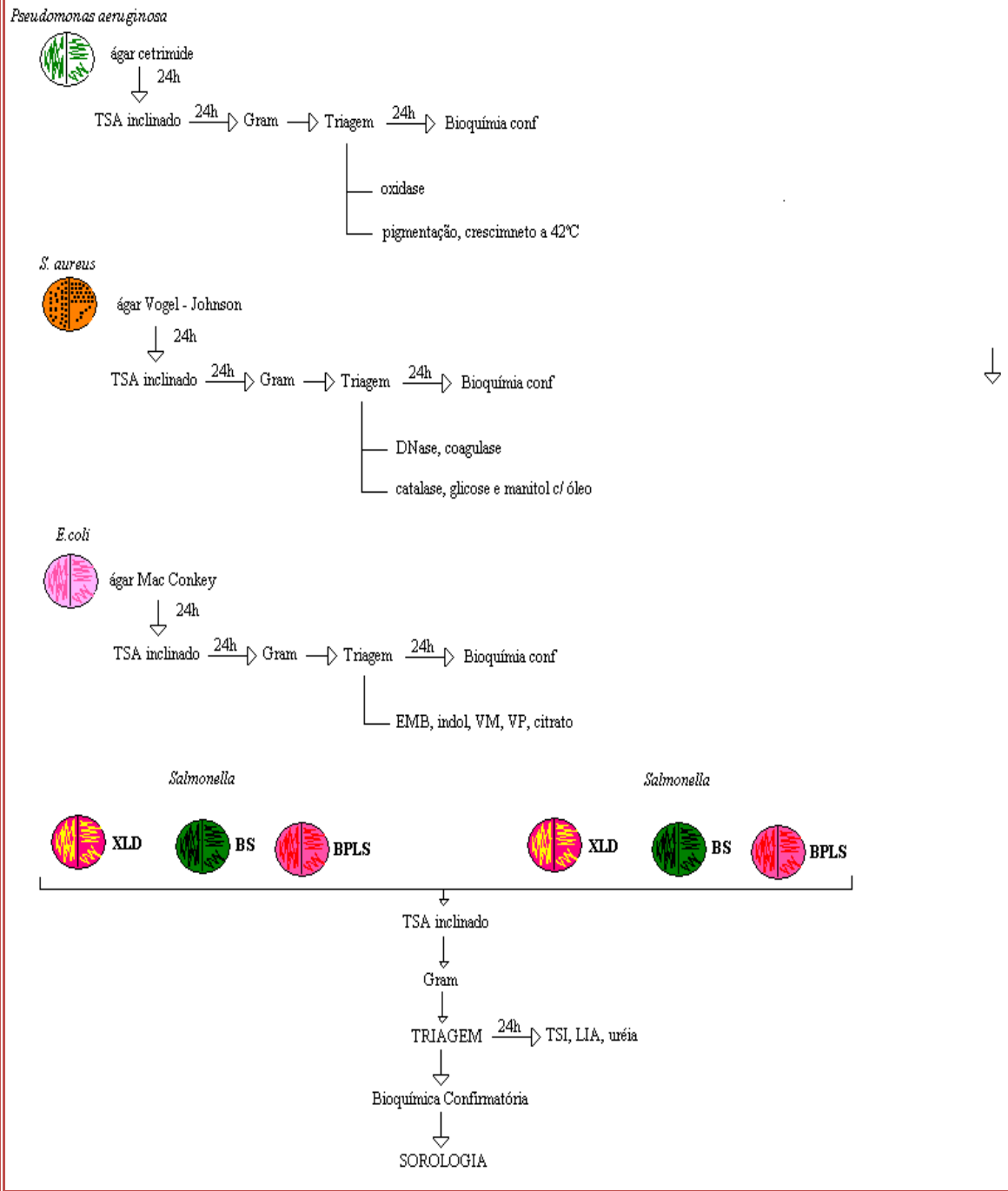
A pesquisa e a identificação de *Stenotrophomonas maltophilia* foram realizadas segundo metodologia descrita por MURRAY e colaboradores (2003), Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002), *The United States Pharmacopeia* (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 2007) e o

POP INCQS n° 65.3210.008 – Pesquisa de Patógenos em Produtos Não Estéreis e Matérias Primas de Uso em sua Fabricação.

Coloração de Gram:

- Preparar, sobre uma lâmina limpa e desengordurada, um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar a temperatura ambiente.
- Fixar o material na lâmina, através da chama de bico de Bunsen por três a quatro vezes.
- 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.

ISOLAMENTO DE COLÔNIAS DISTINTAS PARA PESQUISA ESPECÍFICA



Joana Angélica Barbosa Ferreira

FIGURA 3. ISOLAMENTO DE COLÔNIAS DISTINTAS PARA PESQUISA ESPECÍFICA.

| PROVAS | AMOSTRA | CONT. POSITIVO | CONT. NEGATIVO |
|--------------------|---------|-----------------------|--------------------------|
| Mac Conkey | + | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Catalase | + | <i>P. aeruginosa</i> | <i>Streptococcus sp.</i> |
| Oxidase | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| H ₂ S | NEG. | <i>Salmonella</i> | <i>E. coli</i> |
| Indol | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella</i> |
| Mobilidade | + | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Pigmento | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| Piocianina | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> |
| Glicose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>A baumannii</i> |
| Xilose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>A baumannii</i> |
| Manitol | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. cereus</i> |
| Lactose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>M. morgannii</i> |
| Sacarose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>M. morgannii</i> |
| Maltose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Trealose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Frutose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Galactose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Manose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Raminose | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Esculina | + | <i>S. maltophilia</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Cresc. 6% NaCl | NEG. | <i>A xylooxidans</i> | <i>B. diminuta</i> |
| Cresc. 6.5% NaCl | NEG. | <i>P. stuzeri</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Cetrimide | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| Ureia | NEG. | <i>S aureus</i> | <i>E. coli</i> |
| Nitrato | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>A lwoffii</i> |
| Cresc. 42°C | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| Lisina | + | <i>S. maltophilia</i> | <i>E. agglomerans</i> |
| Arginina | NEG. | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> |
| Ornitina | NEG. | <i>P. mirabilis</i> | <i>E. agglomerans</i> |
| DNase | + | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |
| Amido | NEG. | <i>B. subtilis</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Gelatina | + | <i>S. maltophilia</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| VM | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| VP | NEG. | <i>E. cloacae</i> | <i>E. coli</i> |
| Citrato de Simmons | NEG. | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Agar Tween 80 | + | <i>S. maltophilia</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> |

Resultado: *Stenotrophomonas maltophilia*

TABELA 2: PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA

5. RESULTADOS

Nas pesquisas realizadas a partir das amostras provenientes de estabelecimentos públicos e privados do Estado e do Município do Rio de Janeiro, dos pontos de coleta (pré-filtro, pós-osmose, reuso e dialisato) da água tratada para hemodiálise, foram isoladas, entre outras, cepas de *Stenotrophomonas maltophilia*, demonstrando que em 2007, ano em que se iniciou este estudo, o número de insatisfatoriedade foram os seguintes: pós-osmose - 24,42%; reuso - 34,88%; e dialisato 30,23%; em 2008: pós-osmose - 15,79%; reuso - 13,69%; e dialisato - 14,74%; já em 2009: pós-osmose - 2,20%; reuso - 4,50%; e dialisato - 6,98% .Houve uma redução considerável de contaminação bacteriana, o que se deve ao constante monitoramento e às análises realizadas no INCQS, como demonstram as figuras 4, 5 e 6.

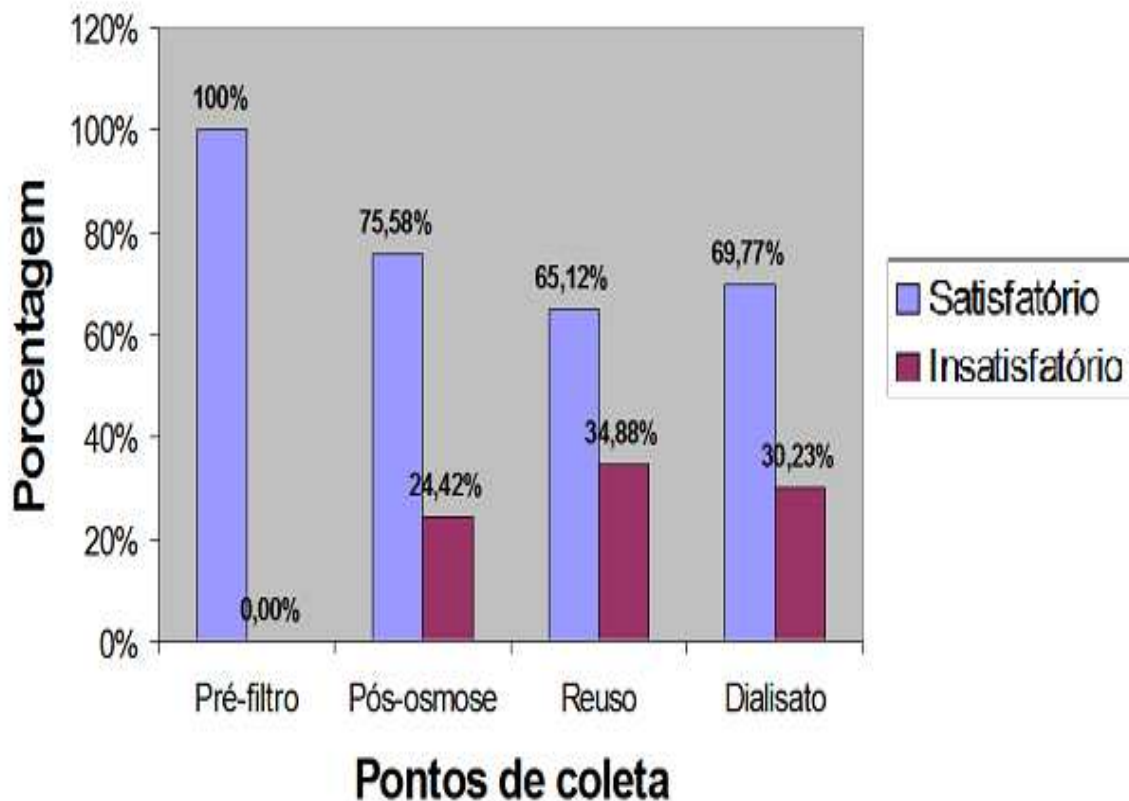


FIGURA 4. PRESENÇA DE *Stenotrophomonas maltophilia* NA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE EM 2007.

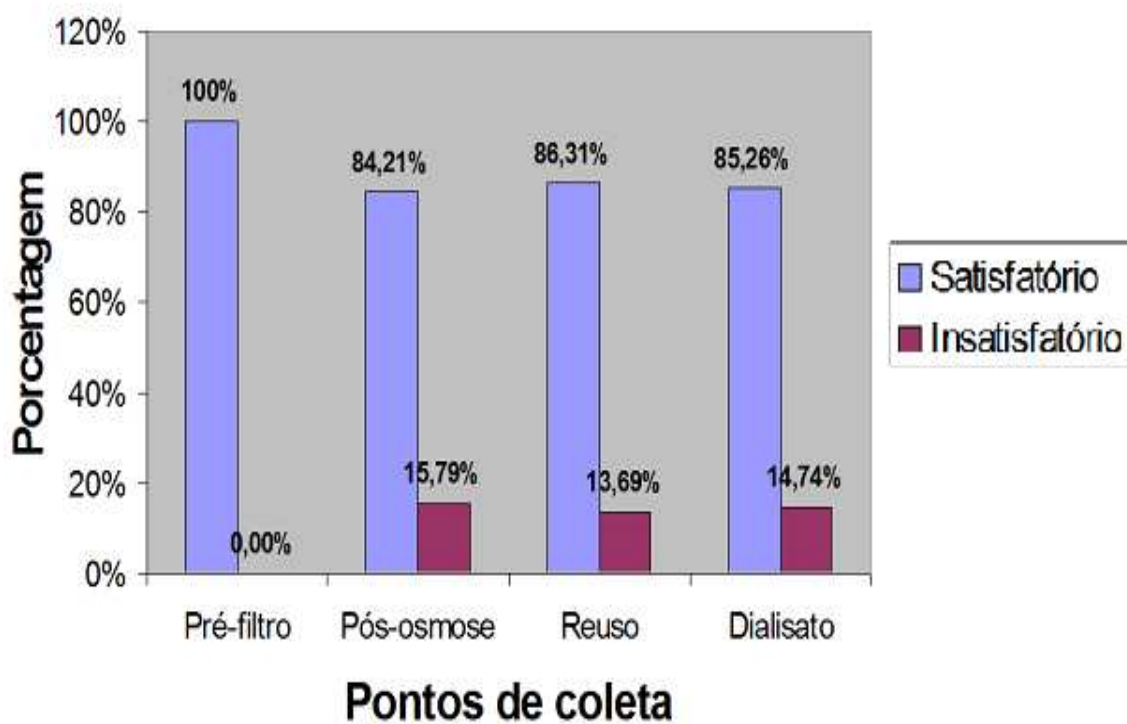


FIGURA 5. PRESENÇA DE *Stenotrophomonas maltophilia* NA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE EM 2008.

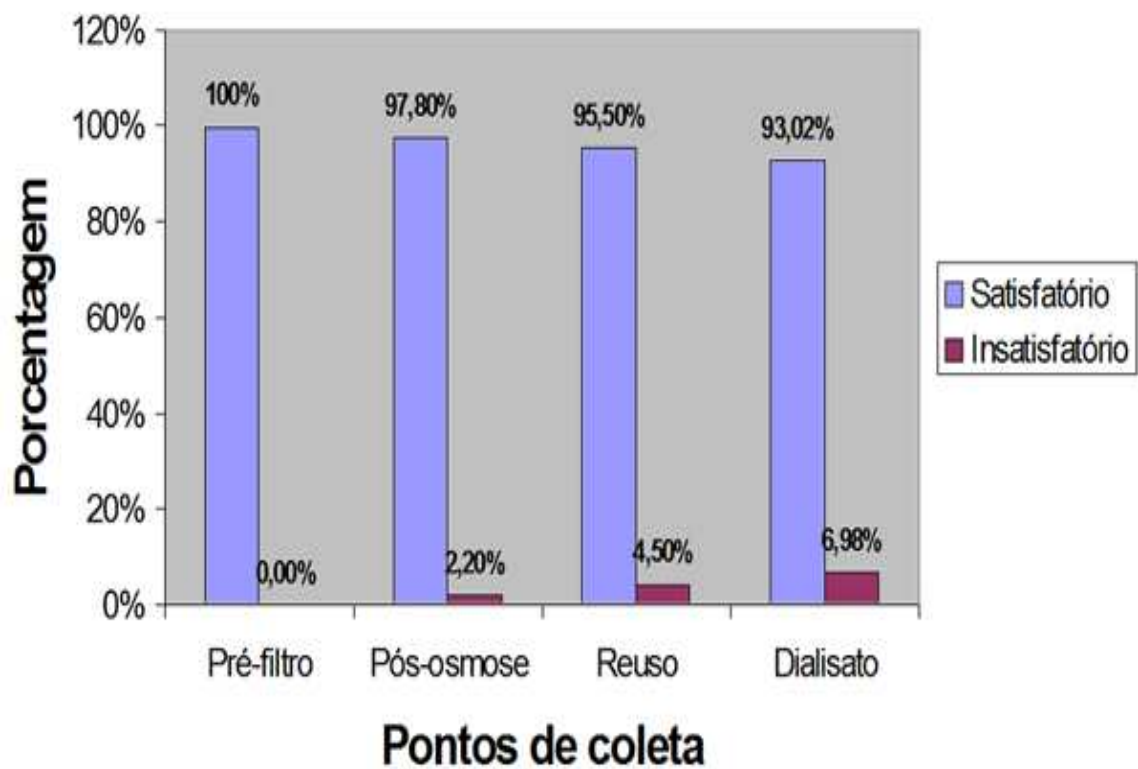


FIGURA 6. PRESENÇA DE *Stenotrophomonas maltophilia* NA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE EM 2009

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A importância da qualidade da água é evidente e avaliá-la ao longo de todo o processo, desde o ponto de entrada até as máquinas dialisadoras, é primordial para obter informações que orientem o desenvolvimento tecnológico do processo e a tomada de medidas de vigilância sanitária visando à melhoria contínua da saúde dos pacientes.

A pesquisa de *Stenotrophomonas maltophilia* na água tratada para hemodiálise observada neste estudo sugere mudanças e atuações importantes que contribuem para a minimização dos riscos à saúde dos pacientes.

Os dados obtidos por meio deste estudo poderão auxiliar as ações da Vigilância Sanitária para melhoria do sistema de tratamento de diversas clínicas do Estado do Rio de Janeiro.

Outros estudos mostram a importância dos procedimentos de desinfecção e existem vários guias e protocolos internacionais que preconizam o estabelecimento de procedimentos a serem utilizados por clínicas de hemodiálise. Entretanto, estes procedimentos são bastante negligenciados e estudos que investigaram a qualidade da água purificada e do dialisato produzidos nos centros de diálise em vários países mostram a dificuldade de alcançar padrões de qualidade satisfatórios permanentemente (FERREIRA, 2009).

O trabalho realizado pelo Programa de Hemodiálise do INCQS mostra também a importância do monitoramento constante das clínicas de hemodiálise e da avaliação microbiológica da qualidade da água utilizada (FERREIRA, 2006).

FIGURA 7. PRÉ-TRATAMENTO DE ÁGUA PARA DIÁLISE.



Fotografia do sistema de pré-tratamento de água para diálise.

Fonte: autorizada pelo Hospital Clínica Grajaú, 2006

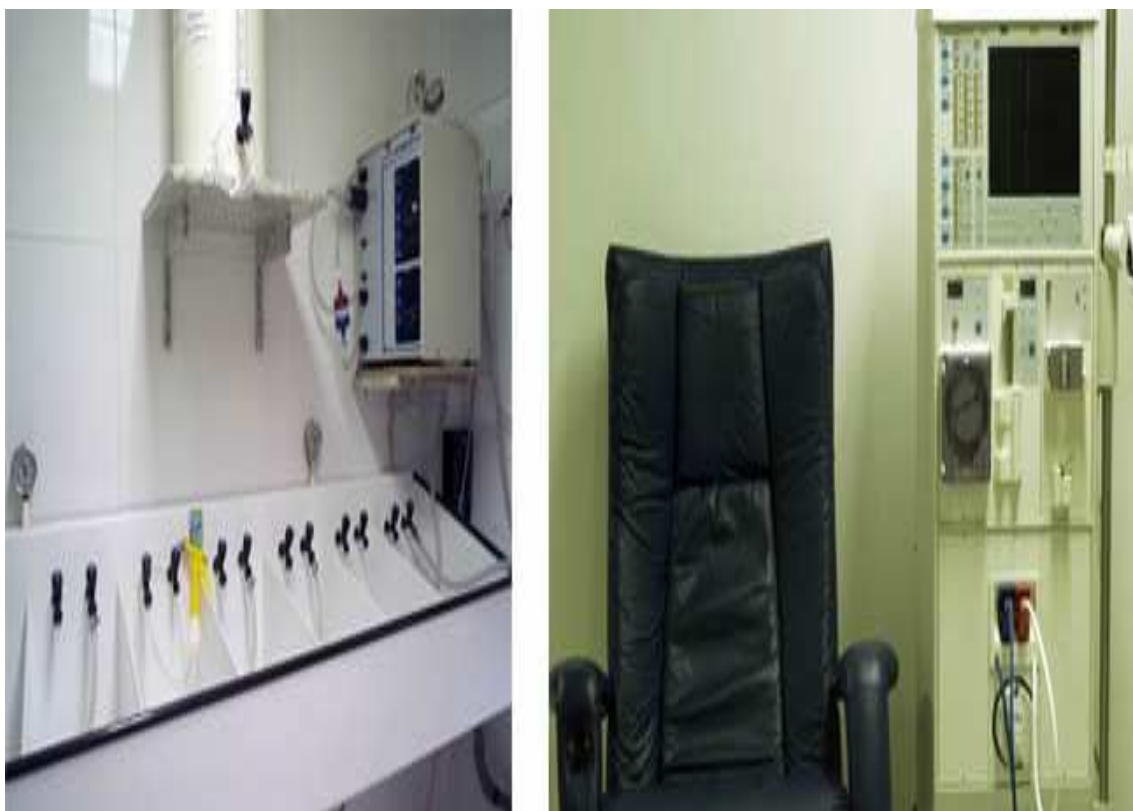
FIGURA 8. SISTEMA DE PÓS-TRATAMENTO DE ÁGUA PARA DIÁLISE.



Fotografia do sistema de pós-tratamento de água para diálise.

Fonte: autorizada pelo Hospital Clínica Grajaú, 2006.

FIGURA 9. SISTEMA DE REUSO E DA MÁQUINA DIÁLISE.



Fotografia do sistema de reuso e da máquina diálise.

Fonte: www.pronephron.com.br/hemodialise.php [acesso em 27 de novembro de 2010)].

7. MEIOS UTILIZADOS

7.1. Ágar Mac Conkey

| | |
|---|---------|
| Peptona de caseína por digestão pancreática | 17,0 g |
| Peptona de carne por digestão péptica | 3,0 g |
| Lactose | 10,0 g |
| Mistura de sais biliares | 1,5 g |
| Cloreto de sódio | 5,0 g |
| Vermelho neutro | 0,03 g |
| Cristal violeta | 0,001 g |
| Ágar | 13,5 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Suspender a mistura em água purificada estilada. Esterilizarem autoclave usando ciclo validado. Distribuir o volume de 15–20 mL por placa de Petri. pH final: $7,1 \pm 0,2$ a 25°C

7.2. Ágar Citrato de Simmons

| | |
|------------------------------------|--------|
| Fosfato de amônio monobásico | 1,0 g |
| Fosfato de potássio dibásico | 1,0 g |
| Cloreto de sódio | 5,0 g |
| Citrato de sódio | 2,0 g |
| Sulfato de magnésio | 0,2 g |
| Azul de bromotimol | ,08 g |
| Ágar | 13,0 g |
| Água purificada..... | 1000mL |

Suspender a mistura em água purificada. Distribuir o volume de 3 mL em tubos de ensaio 13 X 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Retirar os tubos da autoclave e deixar o meio solidificar em posição inclinada. pH final: $6,8 \pm 0,2$ a 25°C

7.3. Ágar Desoxirribonuclease

| | |
|---------------------------------|---------|
| Triptose | 20,0 g |
| Ácido desoxirribonucleico | 2,0 g |
| Cloreto de sódio | 5,0 g |
| Ágar | 15,0 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Suspender a mistura em água purificada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir o volume de 15 – 20 mL por placa de Petri. pH final: $7,3 \pm 0,2$ a 25°C.

7.4. Caldo Lisina, arginina e ornitina

| | |
|------------------------------|---------|
| Peptona bacteriológica | 5,0 g |
| Extrato de carne..... | 5,0 g |
| Púrpura de bromocresol | 0,1 g |
| Vermelho de cresol..... | 0,005 g |
| Piridoxal..... | 0,005 g |
| D (+) Glicose | 0,5 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Distribuir o meio pronto em quatro porções iguais. Adicionar a três delas os aminoácidos (L-lisina , L-arginina e L-ornitina),na concentração final de 1%,deixando uma porção como controle. Homogeneizar as soluções e distribuir em porções de 3,0 mL em tubos 13 x 100 mm. Autoclavar a 121° C / 10 minutos. pH final: 6,0± 0,2 a 25°C. Estocar em refrigerador (4-10° C)

7.5. Ágar Cetrimide

| | |
|--|---------|
| Peptona de gelatina por digestão pancreática | 20,0 g |
| Cloreto de magnésio | 1,4 g |
| Sulfato de potássio | 10,0 g |
| Brometo de cetil trimetilamônio (cetrimide) | 0,3 g |
| Glicerol | 10,0 mL |
| Ágar | 13,6 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Dissolver os componentes sólidos em água purificada, adicionar o glicerol. Aquecer sob agitação até a fervura, mantendo por 1 minuto, para completa dissolução dos ingredientes. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado. Distribuir o volume de 15 – 20 mL por placa de Petri. pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C.

7.6. Ágar Uréia

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Peptona bacteriológica | 1,0 g |
| D (+) Glicose | 1,0 g |
| Cloreto de sódio | 5,0 g |
| Fosfato de potássio monobásico | 2,0 g |
| Vermelho de fenol | 0,012 g |
| Ágar | 15,0 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Suspender a mistura em água purificada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Resfriar o meio até 48 ± 2°C e adicionar 50 mL de solução de uréia a 40%, esterilizada por filtração. Homogeneizar. Distribuir o volume de 3 mL em tubos de ensaio 13 X 100 mm e deixar o meio solidificar em posição inclinada. pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C.

7.7. Agar Semi Sólido H₂S, Indol e Mobilidade (SIM)

| | |
|---|--------|
| digestão pancreática de caseína..... | 20,0 g |
| Digéstico Péptico de tecido animal(extrato de carne)..... | 6,1 g |
| Sulfato ferroso de amônio..... | 0,2 g |
| Tiosulfato de sódio..... | 0,2 g |
| Agar | 3,5 g |

Reidratar e adicionar 6 ml de meio por tubo de 16 x 125 mm com tampa de rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. pH final, 7,3 ± 0,2.

7.8. Caldo Nitrato

| | |
|--------------------------|---------|
| Extrato de carne..... | 3,0 g |
| Peptona..... | 5,0 g |
| Nitrato de potássio..... | 1,0 g |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Ajustar o pH a 7,0 ± 0,2 a 25°C. Distribuir em porções de 5,0 mL em tubo de 16 x 150 mm. Introduzir o tubo de Durham estéril em posição invertida. Autoclavar a 121° C por 15 minutos. Estocar em refrigerador(4-10° C).

7.9. Caldo para Fermentação de Açúcares

| | |
|---------------------------|---------|
| Peptona..... | 10 g |
| Extrato de carne..... | 3,0 g |
| Cloreto de sódio..... | 5,0 g |
| Indicador de Andrade..... | 10 mL |
| Água purificada..... | 1000 mL |

Ajustar o pH para 7,1 ± 0,1. Distribuir em erlenmeyer ou balão o volume desejado.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

7.9.1. Indicador de Andrade

| | |
|----------------------------|--------|
| Fucsina ácida..... | 0,5 g |
| Hidróxido de sódio 1N..... | 16 mL |
| Água purificada..... | 100 mL |

Dissolver a fucsina em água purificada. Adicionar o hidróxido de sódio. Deixar a temperatura ambiente por 24 horas em agitação freqüente.

7.9.2. Solução de Açúcar

Preparar solução a 10% de do açúcar. Esterilizar por filtração. Incorporar a solução de açúcar ao meio básico, de modo a se obter uma concentração final de 1% (para salicina 0,5%). Distribuir asépticamente em porções de 3 mL em tubos 13 x 100 mm e 10 mL em tubos 18 x 170 mm e, neste caso, introduzir um tubo de Durham estéril na posição invertida para visualização da formação de gás. pH final: 7,1 ± 0,2 a 25°C

7.10. Caldo Vermelho de Metila - Voges Proskauer

| | |
|------------------------------------|---------|
| Peptona bacteriológica | 7,0 g |
| D (+) Glicose | 5,0 g |
| Fosfato de potássio dibásico | 5,0 g |
| Água purificada | 1000 mL |

Suspender a mistura em água purificada, homogeneizar até completa dissolução. Distribuir o volume de 3 mL em tubos de ensaio 13 X 100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. pH final: $6,9 \pm 0,2$ a 25°C

8. REAGENTES E SOLUÇÕES

8.1. Reagente de Kovacs ou Ehrlich:

8.1.1. Kovacs

| | |
|--------------------------------------|-------|
| p - Dimetilaminobenzaldeído | 5 g |
| Álcool amílico (normal) | 75 mL |
| Ácido clorídrico (concentrado) | 25 mL |

Dissolver o p-dimetilaminobenzaldeído em álcool amílico normal. Adicionar o ácido clorídrico vagarosamente. Estocar a 4°C.

8.1.2. Ehrlich

| | |
|--------------------------------------|-------|
| p - Dimetilaminobenzaldeído | 5 g |
| Etanol,95% | 95 mL |
| Ácido clorídrico (concentrado) | 25 mL |

8.2. Reagente para o teste de oxidase

| | |
|---|--------|
| N,N - Dimetil - p - fenilenodiamina 2HCL..... | 1 g |
| Água purificada | 100 mL |

Este reagente pode ser usado no período de até 7 dias se for estocado em frasco escuro sob refrigeração.

8.3. Reagente para o teste de vermelho de metila

| | |
|--------------------------|--------|
| Vermelho de metila | 0,10 g |
| Etanol 95% | 300 mL |
| Água purificada..... | 500 mL |

Dissolver o vermelho de metila em 300 mL de etanol. Completar o volume para 500 mL com água purificada.

8.4. Reagentes para o teste de Voges-Proskauer

8.4.1. Solução 1

| | |
|-------------------------|--------|
| Alfa-naftol | 5 g |
| Álcool (absoluto) | 100 mL |

8.4.2. Solução 2

| | |
|-----------------------------|--------|
| Hidróxido de potássio | 40 g |
| Água purificada..... | 100 mL |

8.5. Reagentes para Nitrato (GREISS-ILOSVOY)

8.5.1. Reagente A : α -Naftilamina 0,5% ou Dimetil-L-Naftilamina a 0,6%

| | |
|--------------------------------------|---------|
| α -Naftilamina..... | 5,0 g |
| (ou N,N-Dimetil-L-Naftilamina)..... | 6,0 g |
| Ácido acético (5N) 30%..... | 1000 mL |

Dissolver o reagente em um volume menor que 1000 mL de ácido acético com 5N, aquecendo levemente. Transferir a solução para frasco volumétrico de 1000 mL e acrescentar solução de ácido acético 5N até completar 1000 mL. Filtrar a solução através de algodão absorvente lavado. Estocar em frasco fechado e escuro.

8.5.2. Reagente B : Ácido Sulfanílico a 0,8%

| | |
|-----------------------------|---------|
| Ácido sulfanílico..... | 8 g |
| Ácido acético (5N) 30%..... | 1000 mL |

Dissolver o ácido sulfanílico em um volume menor que 1000 mL de ácido acético 5N. Transferir a solução para frasco volumétrico de 1000 mL e acrescentar solução de ácido acético 5N até completar 1000 mL. Estocar em frasco fechado e escuro. Solução salina 0,85% - pH 7.2

8.6. Solução de cristal violeta

8.6.1. Solução A

| | |
|---|-------|
| Cristal violeta (conteúdo seco de 90%)..... | 2,0 g |
| Etanol a 95% (vol/vol)..... | 20 mL |

8.6.2. Solução B

| | |
|------------------------|-------|
| Oxalato de amônio..... | 0,8 g |
| Água purificada..... | 80 mL |

Misturar as soluções A e B. Aguardar aproximadamente 24 horas. Filtrar através de papel de filtro.

8.7. Solução de Lugol (Solução de Iodo de Gram)

| | |
|-------------------------|--------|
| Cristais de iodo..... | 1,0 g |
| Iodeto de potássio..... | 2,0 g |
| Água purificada..... | 300 mL |

Triturar o iodo e o iodeto com auxílio de gral e pistilo. Adicionar, separadamente, alíquotas de 1 mL, 5 mL e 10 mL de água purificada. A cada adição de água, homogeneizar a mistura. Lavar o gral e o pistilo com o restante da água. Armazenar o reagente em frasco escuro.

8.8. Solução de safranina

| | |
|-----------------------------|--------|
| Safranina..... | 2,5 g |
| Etanol a 95% (vol/vol)..... | 100 mL |

Misturar 10 mL da solução estoque com 90 mL de água purificada.

8.9. Solução de álcool-acetona.

| | |
|----------------------|-----|
| Álcool Etílico | 60% |
| Acetona | 40% |

REFERÊNCIAS

ALBERTINO, S.R.G. **Água para Hemodiálise no Estado do Rio de Janeiro: Avaliação dos resultados dos ensaios de endotoxina bacteriana (LAL) realizados pelo INCQS no período de 2000 a 2008** (Especialização em Vigilância Sanitária), INCQS/Fiocruz, 2009.

ALMEIDA, M.T.G. et al. Infecções hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspecto clínico-epidemiológico, microbiológico e de resistência antimicrobiana. Artigo de revista, **Arq. Ciência Saúde**, 2005, jul-set; 12(3): 141-45

ARIZONO, K.; NOMURA, K.; MOTOYAMA, T.; TAKESHITA, H.; FUKUI, H. **Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis**. Blood Purification, v. 22, suppl. 2, p. 26-29, 2004.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION, AAMI. **American national standard for hemodialysis systems**, 2nd edition. Arlington Press, Arlington, VA, 1981.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION, AAMI. Water quality for hemodialysis. **American national standard for hemodialysis systems** 2nd edition. Arlington Press, Arlington, VA, 2001.

ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION, AAMI. **American national standard for hemodialysis systems**, ANSI/AAMI no. RD52, 2004.

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

BRASIL. Resolução – RDC/ANVISA 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]**, Brasília, DOU de 17 de junho de 2004, seção 1, p. 65. n.º 115 (republicada em 2006)

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

EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed., v. 6.1. **Strasbourg: Council of Europe 2008**. CD ROM.

FARMACOPÉIA Brasileira. Métodos Biológicos. 4ed. **São Paulo: Ateneu, p.v. 516-v.5.1.7.6. 2002**.

FAVERO, M.S.; ALTER, M.J.; BLAND, L. A.A Dialysis-associated infections and their control. **Hospital Infections**. 3rd ed. Little, Brown and Co., Boston/Toronto/London, publisher, chapter 19, p.375-403. 1992.

FERREIRA, J.A.B. **Avaliação Microbiológica da Água Utilizada na Terapia Renal Substitutiva no Estado do Rio de Janeiro** (Monografia). INCQS/ Fiocruz, 2006.

FERREIRA, J.A.B. **Diversidade Genética e Produção de Biofilme de Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas da Água Utilizada em Unidades de Terapia Renal Substitutiva**. INCQS/ Fiocruz, 2009.

FREITAS, F.T.M. Fatores de risco associados à aquisição de pneumonia por *Stenotrophomonas maltophilia* na Unidade de Terapia Intensiva do Instituto de Infectologia Emílio Ribas no período de março a novembro de 2007: [monografia]. São Paulo: **Instituto de Infectologia Emílio Ribas**; 2008.

HOENICH, N. A; RONCO, Claudio; LEVIN, Robert. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. **Blood purification**, 2006; 24(1): 11-8.

LIMA, J.R.O. et al. Análises microbiológicas da água dos serviços de hemodiálise em São Luís, Maranhão, Brasil. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 2005, vol.36, n.2, pp. 103-108. ISSN 1517-8382. doi: 10.1590/S1517-83822005000200001

LO CASCIO, G., BONORA, M. G., ZORZI, A., MORTANI, E., LUPO, A., FONTANA, R. A napkin-associated outbreak of Burkholderia cenocepacia bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**. V. 64, p. 56-62, 2006.

LONNEMANN, G. Dialysate bacteriological quality and the permeability of dialyzer membranes to pyrogens. **Kidney Int.** v. 43 (suppl 41) p.195-200. 1993.

LONNEMANN, G. The quality of dialysate: an integrated approach. **Kidney International**, v. 76, p. S112-119, 2000.

MAGALHÃES, M., DOHERTY, C., GOVAN, J.R.W., VANDAMME, P. Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients. **Jornal of Hospital Infection**. V. 54 p. 120-123. 2003.

MICROBIAL Limit Tests. In: **THE UNITED STATES PHARMACOPEIA**. 30. ed. Rockville, 2007.p.79-97.

MORIN, P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. **Journal Hospital Infection**. 45: 218-224. 2000.

MURRAY, R.; F. J. BARON, M. A. PFALLER. F. C. TENOVER, AND R. H. YOLKEN (ed.). 2000. **Microbiologia Médica**. 3ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

MURRAY, R.; F. J. BARON, M. A. PFALLER. F. C. TENOVER, AND R. H. YOLKEN (ed.). 2003. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

PESQUISA de Patógenos em Produtos Não Estéreis e Matérias Primas de Uso em sua Fabricação. In: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10, nº 65.3210.008.

RILEY, J.R.L. et al. **Transtornos acidobásicos metabólicos que complicam o curso de tratamento da insuficiência renal crônica.** In: LLACH e VALDERRABANO (Ed.) *Insuficiência Renal Crônica*. I. Ed. :Norma, 1990. p. 75-94.

RUTALA, W.A.A; WEBER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Clin. Microbiol. Rev.** 10: 597-610. 1997.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Censo da SBN.** Número total de pacientes por tratamento. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/Censo/2006/GraficosComparativos.ppt>. Acesso em 28 nov 2010.

TENA, D., CARRANZA, R., BARBERA, J. R., GARRANCHO, J. M., ARRANZ, M., SAEZ-NIETO. J. A. outbreak of long-term intravascular catheter bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. **European Journal Microbiology Infect Disease**. V. 24, p. 727-732. 2005.

WARD, R. A. Ultrapure dialysate. **Seminars in Dialysis**. V. 17 p. 489-497. 2004.

WANG, S.A. An outbreak of Gram-negative bacteremia in haemodialysis patients traced to haemodialysis machine waste drain ports. **Infection Control Hospital Epidemiology** v. 20 p. 746-741. 1999.