

JOANA ANGÉLICA BARBOSA FERREIRA

**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**

**MESTRADO PROFISSIONAL
PPGVS/NCQS
FIOCRUZ
2009**

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

Joana Angélica Barbosa Ferreira

Mestrado Profissional

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

2009

**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**

Joana Angélica Barbosa Ferreira

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre

Aprovada:

_____ (UERJ)

Prof. Dra. Ana Luiza Mattos-Guaraldi

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Victor Augustus Marin

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadora: Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Joana Angélica Barbosa

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/ Joana Angélica Barbosa Ferreira. *Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.*

XII, 49 p., il., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientador: Verônica Viana Vieira

1. PFGE 2. Unidades de Terapia Renal Substitutiva 3. Biofilme
4. Resistência aos antimicrobianos. 5. *Pseudomonas aeruginosa*
I. Título

GENETIC DIVERSITY, PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND BIOFILM PRODUCTION OF SAMPLES OF *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATED WATER USED IN UNITS RENAL REPLACEMENT THERAPY

Ao meu marido Carlos Alberto e
Aos meus filhos Rafael, Thiago e Yasmin

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha existência.

Aos meus pais Emiliano Barbosa e Lindaura Figueiredo Barbosa (in memoriam), que desde sempre inculcaram-me os valores e princípios éticos e morais dos quais jamais me afastei.

A Carlos Alberto, companheiro desde a juventude pela compreensão e incentivo em todos os momentos.

Meus filhos Rafael, Thiago e Yasmin, que são motivos de satisfação, orgulho, luz e amor.

A amiga Hilda do Nascimento Nóbrega, pela dedicação, compreensão e companheirismo.

A minha orientadora Dra. Verônica Viana Vieira, que em cada etapa desse trabalho ensinou-me que a busca do conhecimento deve ser contínua.

Ao Programa de pós Graduação do INCQS e seus professores, em especial a Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas por toda dedicação no processo constante de melhoria do Programa e por me fazer ter certeza que fiz a escolha certa.

Apoio financeiro: INCQS/FIOCRUZ

RESUMO

A terapia renal substitutiva ou hemodiálise é um tratamento primordial para pacientes com insuficiência renal crônica. A água é essencial para a terapia de hemodiálise, tanto na produção do fluido como na reutilização dos dialisadores. A contaminação bacteriana dos fluidos de hemodiálise é um grave problema nesta terapia, uma vez que excessivos níveis de bactérias nesta solução são responsáveis por reações pirogênicas. Estudos mostram que a espécie bacteriana

Pseudomonas aeruginosa é a mais isolada como contaminante de fluidos de hemodiálise. Neste estudo avaliamos amostras de *P. aeruginosa* oriundas de três pontos de coleta em seis Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) do Estado do Rio de Janeiro. As UTRS escolhidas apresentaram valores insatisfatórios de contagem de bactérias heterotróficas, sendo isolada a bactéria *P. aeruginosa* em diversos anos consecutivamente. Estas amostras foram avaliadas quanto a produção de biofilme, resistência aos antimicrobianos e a diversidade genética. Na amostragem avaliada nenhuma amostra de *P. aeruginosa* mostrou resistência aos antimicrobianos empregados na prática clínica, tais como os aminoglicosídeos, fluorquinolonas, carbapenemas e β -lactâmicos utilizados para o tratamento de infecções por esta bactéria. Foi verificado também que todas as amostras analisadas eram fortemente produtoras de biofilme. Utilizando a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE foi observado que na maioria das vezes o mesmo clone de *P. aeruginosa* foi encontrado nos três pontos de coleta analisados numa mesma data. Esta metodologia também possibilitou a determinação do tempo de persistência de uma amostra bacteriana no sistema de tratamento de água de hemodiálise. Deste modo, detectamos clones de *P. aeruginosa* ao longo de até três anos nas clínicas analisadas. Um fato interessante foi a detecção do clone I em três clínicas analisadas. Entretanto podemos sugerir que a determinação da diversidade genética das amostras bacterianas oriundas de água de hemodiálise seja um instrumento adicional para avaliar o sistema de purificação de água das clínicas de hemodiálise uma vez que a metodologia empregada pode indicar a persistência de clones, produtores de biofilmes que não estão sendo efetivamente eliminados por procedimentos de desinfecção. Esta metodologia pode contribuir para a melhoria da qualidade dos fluidos de hemodiálise e conseqüentemente a garantia da sobrevivência de pacientes com doenças renais crônicas.

ABSTRACT

The substitutive renal therapy or hemodialysis is a primary treatment for patients suffering from chronic renal failure. The water is essential for hemodialysis and the bacterial contamination of hemodialysis fluids is a serious problem in this therapy, since excessive levels of bacteria are responsible for pyrogenic reactions. Some studies had showed that *Pseudomonas aeruginosa* was the most prevalent bacterial species in all types of water sample for hemodialysis. In this study we evaluated *P. aeruginosa* strains from three water samples for hemodialysis types in six renal replacement therapy units (RRTS) of Rio de Janeiro. The selected clinics showed unsatisfactory values of counts of heterotrophic bacteria, and *P. aeruginosa* strains were isolated in several years consecutively. These samples were analyzed for the production of biofilm, antimicrobial resistance and genetic diversity. None of *P. aeruginosa* strains showed resistance to antimicrobial agents used in clinical practice, such as aminoglycosides, fluoroquinolones, carbapenems and β -lactam used for the treatment of infections by this bacterium. It was found that all samples were strongly biofilm-producing. The characterization of *P. aeruginosa* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) showed that in most cases the same clone was found in three water samples for hemodialysis types analyzed in the same collection date. This approach also allowed the determination of time of persistence of bacteria in a water sample for hemodialysis. Thus, *P. aeruginosa* clones were detected over three years in one clinical study. An interesting fact was the detection of clone I analyzed in three clinics. However, we suggest that determining the genetic diversity of bacterial samples from hemodialysis water is an additional tool to evaluate the system for purification of water for hemodialysis clinics since the methodology used may indicate the persistence of clones, which suggests the presence of biofilms that are not being effectively eliminated by the disinfection procedures. This methodology can contribute to improving the quality of hemodialysis fluids and therefore ensuring the survival of patients with chronic kidney disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMI - Associação para o Avanço de Instrumentos Médicos

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CHEF DR III – Contour clamped homogeneous electric field

DM – Departamento de Microbiologia

DO – densidade ótica

EDTA - Ácido etileno diamino tetra acético

ESP – Tampão EDTA, sarcosina e proteína K

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

NaCl – Cloreto de sódio

ND – Não determinado

no – número

mg - miligrama

mL – mililitro

mM – minimolar

µg – micrograma

µL - microlitro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Phosphate buffer solution

PFGE – Pulsed Field Gel Eletroforese –eletroforese de campo pulsado

POP – Procedimento Operacional Padronizado

rpm – rotações por minuto

TSA – Tryptic Soy Ágar / Ágar tripticaseína soja

TBE – tampão tris borato EDTA

U – unidade

VISA – Vigilância Sanitária

UFC – unidade Formadora de colônia

UTRS – Unidade de Terapia Renal Substitutiva

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA DE HEMODIÁLISE - PROF. FREDERICO CASTELO BRANCO CAVALCANTI – NEFROLOGIA - UFPE.....	2
FIGURA 2. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS A APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	28
FIGURA 3. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS B APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	29
FIGURA 4. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS C APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	30
FIGURA 5. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS D APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	31
FIGURA 6. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS E APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	32
FIGURA 7. PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE AMOSTRAS DE <i>P. aeruginosa</i> PROVENIENTES DA UTRS F APÓS DIGESTÃO COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>SPEI</i>	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. NÚMERO DE AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* ANALISADAS NESTE ESTUDO DE ACORDO COM A ORIGEM E O ANO DA COLETA. 23

TABELA 2. AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* PROVENIENTES DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE: RESULTADOS DA ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS E DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO OBTIDOS PELA SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)..... 24

TABELA 3. RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE BIOFILME DE PERFIS ELETROFORÉTICOS DE AMOSTRAS DE *P. aeruginosa* PROVENIENTES DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE..... 27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA	1
1.2 TRATAMENTO DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE	3
1.3 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA NO TRATAMENTO POR HEMODIÁLISE	4
1.4 LIMITES	6
1.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.6 BIOFILMES	8
1.7 TIPAGEM MOLECULAR	11
1.8 JUSTIFICATIVA	11
2. OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. METODOLOGIA.....	14
3.1 UNIDADES DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA	14
3.2 AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE	14
3.3 ENSAIO DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS.....	15
3.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE	16
3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	16
3.6 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROSSÔMICO OBTIDOS PELA SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE).....	17
3.8 ENSAIO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES	18

4. RESULTADOS	20
4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	20
4.2. ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO OBTIDOS PELA SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE).....	20
4.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	21
4.4 PRODUÇÃO DE BIOFILMES.....	22
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

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, pois 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 ano de 2008, cerca de 87 mil brasileiros foram submetidos a este tratamento. Entre estes, poucos conseguem recuperar o funcionamento dos rins e apenas um pequeno número de pacientes consegue ser submetido a um transplante renal (OLIVEIRA, ROMÃO JR & ZATZ, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2008).

Este tratamento promove a restauração dos eletrólitos e balanço ácido base, além da remoção de substâncias tóxicas e do excesso de líquido acumulado no sangue/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, no qual existe um fluxo contra-paralelo do sangue do paciente e 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 (Figura 1) (HOENICH, RONCO & LEVIN, 2006).

A água é essencial para a terapia de hemodiálise, tanto na produção do fluido de diálise como na reutilização dos dialisadores. O fluido de diálise ou dialisato, que banha o dialisador (membrana semi-permeável), não é uma solução estéril, é composta por uma mistura de água e concentrado polieletrólítico numa proporção de 34:1 (VORBECK-MEISTER *et al.*, 1999). Durante uma sessão de tratamento por

hemodiálise aproximadamente 120 litros de água purificada, misturados em proporções adequadas ao chamado concentrado polieletrólítico para hemodiálise, são utilizados na depuração do sangue, sendo assim, a qualidade da água é fundamental para evitar riscos adicionais à saúde do paciente (BOMMER & JABER, 2006).

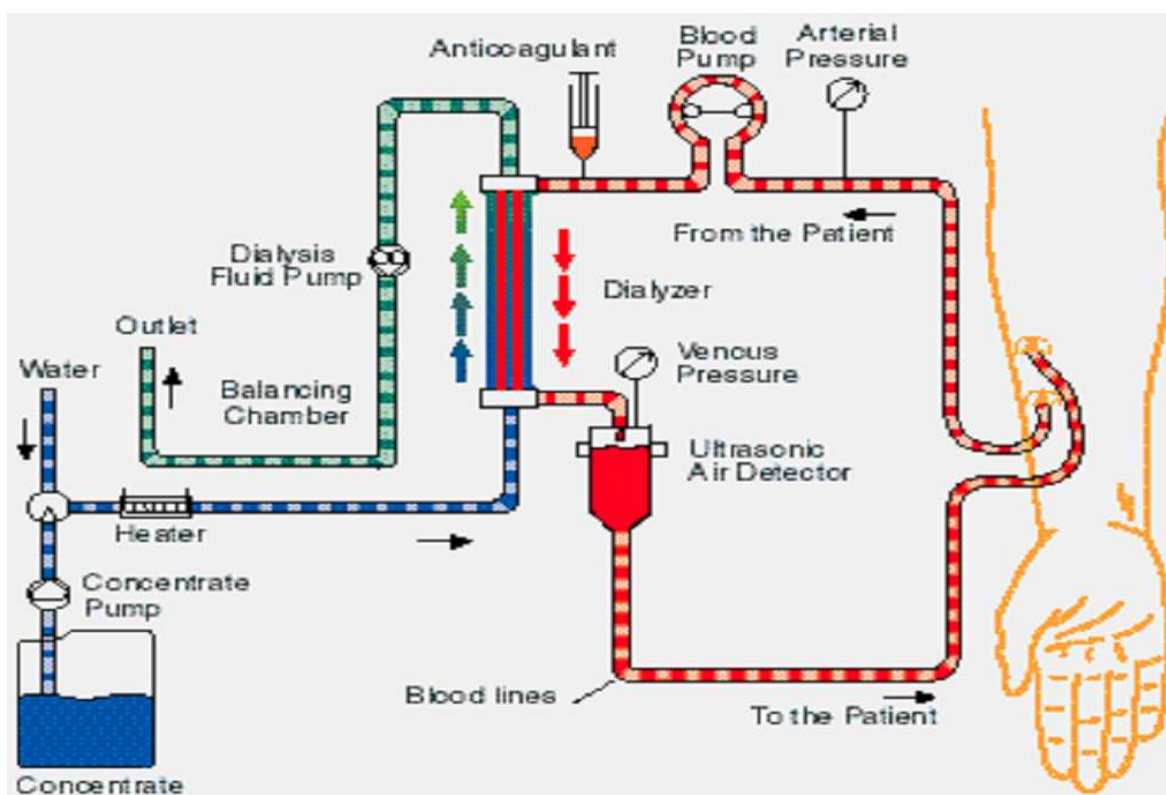


Figura 1: Esquema de Hemodiálise - Prof. Frederico Castelo Branco Cavalcanti – Nefrologia - UFPE

1.2 TRATAMENTO DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

O tratamento da água para hemodiálise é mais rigoroso do que o da água potável, sendo necessário um sistema de purificação adicional onde a água utilizada deve ser potável. Alguns elementos de toxicidade conhecida tais como: alumínio, flúor, mercúrio, cobre entre outros e substâncias como endotoxinas bacterianas e cianotoxinas devem ter concentração controlada na água para hemodiálise (BRASIL, 2006b).

Enquanto o concentrado polieletrólítico é produzido comercialmente numa composição consistente e com qualidade estritamente controlada, a água usada pode variar amplamente na sua composição química e microbiológica e isto irá influenciar diretamente a qualidade do fluido para hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999).

Existem sistemas de purificação de água para hemodiálise compostos de diferentes combinações de tratamento para assegurar a qualidade da água resultante. O pré-tratamento é realizado para retirar substâncias e partículas da água que podem danificar os equipamentos de purificação, diminuindo a sua eficiência. Filtros de areia, abrandadores, filtros de carvão ativado são utilizados para o pré-tratamento. Os sistemas de purificação utilizam a água pré-tratada e diferentes processos de filtração podem ser utilizados tais como: filtração por osmose reversa, por troca iônica e outros, que permitem a remoção de partículas, sais e íons, outros ainda retêm bactérias da fase líquida, antes da água ser entregue as unidades de hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999). Segundo o censo realizado em 2008 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, no Brasil 93,7% das clínicas de hemodiálise utilizam em seus sistemas de tratamento da água, filtração por osmose reversa, 5,6% utilizam a filtração por osmose reversa e deionização e 0,7 % utilizam apenas o processo de deionização (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2008).

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, desinfecção e enxágüe do desinfetante (CALDERARO & BISCHOFBERGER, 1998).

Apesar das múltiplas barreiras presentes no sistema de tratamento que podem remover bactérias da água, existe o risco de contaminação bacteriana caso o sistema ou o método de desinfecção estejam ineficientes (MORIN, 2000; CAPPELLI et al., 2006). A prevenção da contaminação da água requer conhecimento da origem do problema dentro da linha de tratamento e a utilização de procedimentos de desinfecção adequados. A contaminação bacteriana em sistemas de tratamento e distribuição de água pode levar a formação de biofilmes que podem persistir em diferentes pontos do sistema de tratamento e desenvolver maior resistência ao procedimento de desinfecção (SMEETS et al., 2003).

Vários métodos de desinfecção são recomendados e as unidades de hemodiálise devem manter um programa de desinfecção (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; AAMI, 2004). Vários desinfetantes físicos (raios ultravioleta e água aquecida > 80° C) e germicidas químicos (hipocloritos, ácido peracético, formaldeído, ozônio) são disponíveis comercialmente, e a utilização de um destes ou a combinação podem controlar a formação de biofilme no sistema (RUTALA & WEBER, 1997; CAPPELLI et al., 2007).

1.3 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA UTILIZADA NO TRATAMENTO POR HEMODIÁLISE

O aspecto microbiológico do tratamento da água foi levado em conta, quando foi demonstrado que os excessivos níveis de bactérias no dialisato eram responsáveis pelas reações pirogênicas e bacteremia. Estudos demonstraram que, a

endotoxina derivada de bactérias Gram negativas pode penetrar na membrana semipermeável do dialisador, sendo responsável por reações pirogênicas em pacientes em hemodiálise (LONNEMANN, 2000).

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 observaram uma relação direta entre a ocorrência de casos de bacteremia causados por bactérias Gram negativas e o isolamento desses microrganismos a partir da água purificada, possivelmente devido a defeitos na integridade da membrana ou a utilização de água contaminada no reprocessamento das máquinas de diálise (WANG et al., 1999; MAGALHÃES et al., 2003; YAN et al., 2008).

A água purificada contém predominantemente bactérias heterotróficas do ambiente aquático como as espécies da classe *Pseudomonadales*, que podem crescer nos circuitos de água e nas máquinas de hemodiálise, e subsequentemente contaminar o dialisato (BOMMER & JABER, 2006). Alguns estudos sobre identificação dos contaminantes bacterianos da água utilizada para hemodiálise indicam que o gênero bacteriano predominante é *Pseudomonas* (MORIN, 2000). Conseqüentemente tem sido sugerido que as amostras de água para hemodiálise deveriam ser testadas para a presença de bactérias indicadoras definidas, tais como “*Pseudomonas*”, em volumes de pelo menos 100 mL. Na Itália e Alemanha a legislação estabelece o limite de 1 UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* na água para hemodiálise (VORBECH-MEISTER et al., 1999; NYSTRAND, 2008). Atualmente várias discussões tem 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 às contaminações do dialisato (AAMI, 2004; ARIZONO et al., 2004; WARD, 2004; BOMMER & JABER, 2006). Em

alguns países da Europa e no Japão o fluido de diálise ultrapuro está sendo amplamente utilizado (MASAKANE et al., 2008; NYSTRAND, 2008).

1.4 LIMITES

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 (NYSTRAND, 2001; TRAGER, 2002). Existem diversas recomendações oficiais para os parâmetros de qualidade microbiológico da água de hemodiálise publicadas por órgãos governamentais e por organizações internacionais, sendo a mais amplamente utilizada a AAMI RD52 (AAMI, 2004). Uma vez que a falta de pureza do dialisato está relacionada com complicações agudas e crônicas em pacientes em tratamento por hemodiálise os limites de contagem microbiana e de endotoxina tem 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, 2004). Alguns estudos mostraram a importância de manter a contagem bacteriana de 100 UFC/ml no dialisato para prevenir complicações clínicas oriundas da contaminação bacteriana do fluido de diálise (LONNEMANN, 2000; BRUNET & BERLAND, 2000). Em vários países da Europa e no Japão o limite de contagem microbiana foi reduzido para 100 UFC/mL (NYSTRAND, 2008). Atualmente, as Farmacopéias Européia e a Americana também recomendam o valor de 100 UFC/mL para água purificada (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007). Nystrand (2008) alerta que as diferentes recomendações dos parâmetros para a qualidade da água de hemodiálise se referem a diferentes técnicas de cultivo bacteriano o que pode gerar interpretações equivocadas destes limites.

1.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A espécie *P. aeruginosa* é um bacilo Gram negativo aeróbico, não fermentador, pertencente à família bacteriana *Pseudomonadaceae*. Estes microrganismos são aeróbios, não formadores de esporos, nutricionalmente versáteis, móveis devido à presença de um ou mais flagelos polares, possuem metabolismo oxidativo apresentam temperatura ótima de crescimento entre 37° a 42°C, são produtores de pigmentos difusíveis em meios de cultura, incluindo pioverdina, piocinina (verde-azulado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (preto) (MURRAY et al., 2007). Habitantes comuns de solo e água, encontrados em superfícies de plantas, e ocasionalmente, animais. Em humanos comporta-se como patógeno oportunista, formando biofilmes em dispositivos invasivos e permanecendo em tecidos quando há quebra de barreiras naturais ou perda da imunidade, embora possa em algumas ocasiões, fazer parte da flora normal de indivíduos saudáveis (POLLACK, 2000).

Dentre as bactérias causadoras de infecções hospitalares, destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa*, caracterizada por sua resistência intrínseca a muitos antibióticos, seu perfil de ascendente resistência, sua alta prevalência em hospitais, especialmente em unidades de terapia intensiva (LIVERMORE, 2002). Estudos em vários países mostram o encontro de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes a antimicrobianos causando infecções hospitalares (ROSSOLINI & MANTENGOLI, 2008). Descrições de casos de ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em unidades hospitalares, com perfil de resistência cada vez maior culmina com a descrição de isolados resistentes a todos os antimicrobianos testados, exceto polimixina inclusive no Brasil (DEPLANO et al., 2005; CIPRIANO et al., 2007).

Existem poucos relatos sobre a diversidade das espécies bacterianas encontradas como contaminantes de amostras de água de hemodiálise, entretanto estes autores indicam que a espécie *P. aeruginosa* é uma das mais frequentemente encontradas (MORIN, 2000; BORGES et al., 2007; MONTANARI et al., 2009).

1.6 BIOFILMES

O 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 a superfícies inertes ou vivas. Esta matriz é formada fundamentalmente por água e substâncias poliméricas extracelulares (“extracellular polymeric substances”) (WIMPENNY, MANZ & SZEWZYK, 2000; DONLAN, 2002).

Os biofilmes podem ser constituídos por uma única espécie microbiana (por exemplo, alguns biofilmes associados a infecções e biofilmes que crescem em implantes médicos) ou, mais frequentemente, por várias espécies formando consórcio de fungos, algas, bactérias e outros microrganismos (WIMPENNY, MANZ & SZEWZYK, 2000). A natureza variável dos biofilmes foi mostrada utilizando recursos de microscopia eletrônica. Os biofilmes de implantes se mostraram mais simples contendo substâncias poliméricas e apenas uma forma bacteriana. Os biofilmes de sistemas de água são altamente complexos, formados por substâncias químicas diversas, produtos de corrosão e de diferentes espécies bacteriana inclusive formas celulares filamentosas (DONLAN, 2002). No interior dos biofilmes se encontram partículas de matéria orgânica e inorgânica que servem como nutriente aos microrganismos e quanto maior a diversidade destes, maior a diversidade do consórcio (WIMPENNY, MANZ & SZEWZYK, 2000; CAPELLI et al., 2007). O desenvolvimento e persistência dos biofilmes são afetados não somente pelo ambiente circunvizinho, mas também pela variedade de espécies presentes (KOMLOS et al., 2005; SIMÕES, SIMOES & VIEIRA, 2007).

Nos ecossistemas terrestres e aquáticos os microrganismos aparecem como células livres (estado planctônico) ou sob forma de biofilmes ligados a suportes sólidos. Na última década, os biofilmes microbianos foram intensamente estudados uma vez que há um grande interesse científico do conhecimento de como bactérias

formam e vivem em comunidades multicelulares (KLAUSEN et al., 2006). A formação e desenvolvimento dos biofilmes ocorrem em etapas iniciando com a adesão das células a superfície, maturação, onde ocorre a produção de polímeros e reprodução celular até o desprendimento, onde pode ocorrer a liberação de células do biofilme, as quais podem voltar ao seu estado planctônico (DONLAN, 2002).

Monds e O'Toole (2009) afirmam que a formação de biofilme é um fenômeno biológico complexo pois vários parâmetros ambientais podem influenciar o padrão de formação de biofilme. Segundo Parsek e Tolker-Nielsen (2008), os padrões em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* são formados através de uma interação complexa entre um número de diferentes fatores incluindo a proliferação e migração celular em resposta aos nutrientes disponíveis e outros sinais ambientais externos, assim como os sinais intracelulares e a produção de uma matrix extracelular. Estes autores afirmam que o padrão de formação de biofilme permite a bactéria se posicionar favoravelmente dentro de gradientes de nutrientes e também possibilita o desenvolvimento e manutenção de subpopulações distintas fisiologicamente, o que facilita a sobrevivência de uma ou mais subpopulações em condições ambientais adversas.

Nos biofilmes as células se comunicam através da elaboração e do reconhecimento de pequenas moléculas, tal mecanismo é conhecido como *quorum sensing* (QS) (SAKURAGI & KOLTER, 2007). Os sistemas QS estão envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos incluindo biossíntese de antibióticos, motilidade, transferência de plasmídeos, produção de biofilme entre outros (JUHAS, EBERL & TUMMLER, 2005). Em *P. aeruginosa* dois sistemas QS, conhecidos como *las* e *rlh*, foram descritos e estes estão envolvidos na produção e regulação da matrix do biofilme desta espécie bacteriana (SAKURAGI e KOLTER, 2007).

Dependendo do ponto de vista, os biofilmes podem ser benéficos ou nocivos. Os biofilmes que se formam nos leitos dos rios, lagos e ambientes marinhos contribuem grandemente para a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos

da água e são considerados benéficos. Os utilizados nas indústrias de fermentação e farmacêutica também são considerados benéficos. Quando os biofilmes estão alojados em locais indesejáveis podem trazer sérios problemas. Nas indústrias o acúmulo de biofilmes nos equipamentos causa impacto negativo a qualidade dos produtos finais por causarem corrosão aos equipamentos, interrupção do processo para limpeza entre outros prejuízos (PEYTON & CHARACKLIS, 1995; SARAVANAN & SREEKRISHNAN, 2006). Estes também são indesejáveis no interior de oleodutos, na aquicultura e nos sistemas de ar condicionado (DONLAN, 2002).

A formação de biofilme é um fator importante no desenvolvimento e persistência de doenças infecciosas. Eles podem ocorrer em cateteres, implantes e lentes de contato causando infecções graves (FUX et al., 2005). Na nefrologia clínica, os biofilmes influenciam no desenvolvimento de cálculos renais e afetam sistemas de diálise, inclusive cateteres peritoneais e venosos, além de ter um papel crítico na persistência de infecções renais e do trato urinário (MARCUS et al., 2008). Foi sugerido que a proximidade das bactérias dentro do biofilme maduro poderia facilitar as trocas horizontais de informações genéticas, incluindo genes de resistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência (JUHAS, EBERL & TUMMLER, 2005).

Os biofilmes são os maiores responsáveis pela contaminação da água potável e em água tratada para utilização em unidades de terapia renal substitutiva (UTRS), com conseqüências em nível de saúde pública e elevados custos associados. Nas UTRS o controle da formação de biofilmes é uma grande preocupação uma vez que o desprendimento destes causa um aumento dos níveis de endotoxinas permeáveis as membranas utilizadas no processo de purificação do sangue dos pacientes que são submetidos a este tratamento causando uma série de quadros clínicos e até a morte destes (MARION et al. 2005). Os biofilmes podem ser controlados através do uso de biocidas, biodispersantes, tecnologia enzimáticas e da minimização do nutriente limitante. As desinfecções realizadas nas UTRS devem ser direcionadas ao controle

de biofilmes para garantir a qualidade adequada do tratamento dialítico (MARION et al., 2005; CAPELLI et al., 2006).

1.7 TIPAGEM MOLECULAR

Dentre os métodos de tipagem molecular que foram usados para estudar a epidemiologia de *P. aeruginosa* e outros patógenos hospitalares, a análise dos perfis de restrição separados por eletroforese de campo pulsado (PFGE) é o método mais amplamente utilizado (SINGH et al. 2006). Essa técnica possibilita a separação efetiva de grandes fragmentos de DNA gerados após digestão do cromossomo bacteriano com enzimas de restrição de sítios pouco frequentes no genoma bacteriano. Os fragmentos obtidos originam um número relativamente pequeno de bandas no gel que facilitam a interpretação do mesmo e permite a comparação dos genomas bacterianos em questão (TENOVER et al. 1995). Este método identifica e determina o espalhamento de clones bacterianos e possui grande reprodutibilidade interlaboratorial (CARRIÇO et al. 2005).

PFGE mostrou ser útil nas investigações de surtos nosocomiais, na identificação de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes e/ou produtoras de β -lactamases, inclusive na detecção da disseminação do clone de *Pseudomonas aeruginosa* produtora de M β la SPM-1 em vários estados brasileiros (GALES et al., 2003; FONSECA et al., 2006; CIPRIANO et al. 2007)

1.8 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 Sanitária 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 obtenção de informações que orientem o desenvolvimento tecnológico do processo e a tomada de medidas de vigilância sanitária visando à minimização dos riscos para os pacientes.

O Programa de Hemodiálise/INCQS tem realizado estudos sobre a qualidade da água utilizada em hemodiálise e esta dissertação será mais uma contribuição para auxiliar as orientações concedidas por este Programa.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA genômico através de Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido amplamente utilizada em investigações de suspeitas de surtos e epidemias de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Sendo assim, esta metodologia será empregada neste estudo para avaliar amostras de *P. aeruginosa* contaminantes, isoladas de água tratada para hemodiálise em unidades de terapia renal substitutiva, com intuito de verificar a diversidade genética e a persistência dos clones detectados em sistemas de tratamento para a água de hemodiálise. Para a vigilância sanitária estes aspectos são importantes, pois poderão auxiliar posteriormente em diversas ações referentes à limpeza do sistema de purificação, equipamentos utilizados neste sistema entre outras.

Devemos mencionar ainda que a legislação atual (BRASIL, 2004a) que estabelece as especificações técnicas para a água utilizada em unidades de hemodiálise apresenta pontos a serem revistos, e que as informações que serão obtidas neste estudo podem permitir que os critérios utilizados pela legislação vigente em nosso país sejam avaliados e que outras revisões possam ser sugeridas.

2. OBJETIVO

Determinar a diversidade clonal e perfis de produção de biofilmes e de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada nas unidades de tratamento por hemodiálise.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a diversidade genética de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água de hemodiálise provenientes de seis Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) durante o período de 2004 a 2008;
- b) Determinar o tempo de persistência dos clones de *P. aeruginosa* no sistema de tratamento de água das UTRS avaliadas;
- c) Determinar o perfil de resistência das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise analisadas neste estudo;
- d) Determinar a produção de biofilme pelas amostras de *P. aeruginosa* avaliadas para correlacionar com a persistência da amostra no sistema de tratamento de água.

3. METODOLOGIA

3.1 UNIDADES DE TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

Foram selecionadas seis Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) para este estudo considerando os seguintes critérios: UTRSs que tiveram resultados insatisfatórios, pela análise microbiológica da água realizada no INCQS/FIOCRUZ segundo os limites da RDC n° 154/2006 (BRASIL, 2006b) e que apresentaram a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* como contaminante das amostras de água para hemodiálise no período de 2004 a 2008. As clínicas analisadas neste estudo foram identificadas com letras maiúsculas diferentes.

As amostras de água de hemodiálise foram coletadas de UTRSs localizadas no estado do Rio de Janeiro em colaboração com a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro e Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro em função da RDC n° 154/2006 (tabela 1).

3.2 AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

Por ocasião das inspeções, foram coletadas amostras de água provenientes de diversos pontos do sistema de tratamento da água:

- 1)** amostras coletadas após o tratamento (pós-osmose reversa);
- 2)** amostras da água utilizada no reprocessamento dos dialisadores (reuso);
- 3)** solução de diálise (dialisato).

As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis (um volume aproximado de 200 mL). As amostras foram mantidas em temperatura inferior a 10°C e processadas no mesmo dia da coleta.

3.3 ENSAIO DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS

O ensaio foi realizado segundo metodologias descritas: no POP INCQS/FIOCRUZ no. 65.3210.010 (MANUAL DA QUALIDADE, 2009a) e POP INCQS/FIOCRUZ no. 65.3210.030 (MANUAL DA QUALIDADE, 2009b).

Foi utilizado o método de contagem em placa de profundidade (em duplicata), utilizando o meio de cultura ágar caseína-soja. A amostra foi diluída em caldo caseína-soja (diluição 1:9) inoculando 1 mL da amostra em 9 mL de caldo caseína-soja. Um mililitro da diluição foi adicionado a 20 mL do meio TSA fundido e resfriado a 45-50° C. Após solidificação, o meio foi incubado a 30-35°C durante 48 ± 3 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada em placas que continham até 300 UFC. Para a obtenção do resultado expresso em UFC/mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$N = \frac{P1 + P2}{2} D$$

Onde:

- N = número de UFC/1 g ou 1 mL
- D = Fator da diluição utilizada
- P1 = Número de colônias observadas na placa 1
- P2 = Número de colônias observadas na placa 2

O limite estabelecido pela legislação é de no máximo 200 UFC/mL para a água purificada e até 2000 UFC/mL para o dialisato (BRASIL, 2006b). Para a solução de diálise o limite é de 100 UFC/mL segundo acordo do INCQS com as VISAS, uma vez que a legislação brasileira, RDC N°. 154/2006 (BRASIL, 2006b) não contempla solução para diálise, deste modo, seguimos as recomendações das Farmacopéias Americana (THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA, 2008) e Européia (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008).

3.4 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

A identificação bioquímica das amostras bacterianas obtidas nos ensaios de contagem de bactérias heterotróficas foi realizada segundo Murray e colaboradores (2007) e o POP INCQS/FIOCRUZ nº 65.3210.008 (MANUAL DA QUALIDADE, 2008). As bactérias foram identificadas através de testes bioquímicos tais como: Bastonetes Gram negativos, aeróbios, não formadores de esporos, nutricionalmente versáteis, móveis devido à presença de um ou mais flagelos polares, metabolismo oxidativo (glicose, xilose e manitol), temperatura ótima de crescimento a 42°C, produtores de pigmentos difusíveis em meios de cultura, pioverdina, piocinina (verde-azulado), piorrubina (vermelho) e piomelanina (preto), não fermentador, produtor da enzima oxidase, presença da enzima catalase, crescimento em ágar MacConkey, ágar cetrimide, descarboxilação do aminoácido arginina, presença de crescimento em concentração de 6,5 % de NaCl, produção de indol negativa, utiliza citrato como única fonte de carbono, não produz a enzima DNase, produção de H₂S negativa, fenilalanina negativa, produz a enzima lecitinase, não hidrolisa o amido, esculina, hidrolisa a gelatina, utilização da uréia positiva, reduz o nitrato a nitrito com produção de gás, extração da piocianina positiva.

3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo método automatizado VITEK 32 (BioMérieux), utilizando os cartões GNS-655 conforme instruções do fabricante. Os antibióticos utilizados no cartão utilizado foram: amicacina (AN), ampicilina (AM), ampicilina/sulbactam (AMS), aztreonam (AZM), cefepime (FEP), cefotaxime (TAX), ceftazidime (TAZ), cefepime (FEP), cefotaxime (TAX), ceftazidime (TAZ), cephalotina (CF), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GM), imipinem (IMI), meropenem (MEM), piperacilina/tazobactam (TZP), trimetoprim/sulfametaxazole (SXT). As amostras foram repicadas no meio de cultura TSA por 24 horas e o

crescimento bacteriano foi utilizado para preparar uma suspensão em salina 0,85% com turvação equivalente a 0.5 da escala de Mac Farland. Uma quantidade de 250 µl desta suspensão foi diluída em 1,8 ml de salina 0,85%. Esta diluição foi utilizada para preencher os cartões GNS-655. O resultado foi obtido após incubação do cartão no equipamento por aproximadamente 10 a 18 horas.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO OBTIDOS PELA SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso “in situ”, em blocos de agarose, segundo os procedimentos de Teixeira e colaboradores (1997) e Cipriano e colaboradores (2007). Em resumo, uma alíquota de 2 mL do crescimento bacteriano em fase exponencial com concentração compatível com o padrão 2da escala de Mac Farland foi centrifugada a 3000 g por 10 minutos (ependorff modelo 5415 C) e as células obtidas foram suspensas em 250 µL de salina estéril. Foi adicionada a suspensão de células, 250 µL de agarose (low melting, NuSieve, BMA) a 2 % em salina 0,85% a 50°C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4 ml de solução de lise (NaCl 1M; TRIS-HCl 6mM pH 7,6; EDTA 100mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5 %; desoxicolato 0,2 %; sarcosina 0,5 % e lisozima 1 mg/mL) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5M pH 8,0; sarcosina 1 %) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados por 24 horas a 50°C. Os blocos foram lavados 10 vezes com tampão TE (TRIS-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0.1mM pH 8,0) a 37°C e então incubados com 10U da enzima de restrição *SpeI* (Invitrogen) diluída em tampão específico conforme instruções do fabricante por 24 h a 37°C. Os blocos foram fundidos a 68-70°C e aplicados no gel de agarose (NA, Amersham) a 1,0 %

preparado em tampão TBE (TRIS 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1mM pH final 8,3). Um padrão contendo fragmentos de DNA com pesos moleculares conhecidos foi aplicado em um dos orifícios do gel para a avaliação do tamanho dos fragmentos de DNA. Os fragmentos de DNA foram separados em um sistema de eletroforese de campo pulsado, CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, USA), utilizando as seguintes condições: tempo de pulso crescente de 5 a 35 segundos por 24 horas a 6V/cm, na temperatura de 12° C. Após a eletroforese os géis foram corados com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) e os perfis de restrição foram observados e as imagens registradas no equipamento Gel Logic 100 - Imaging System (KODAK). A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico separados em gel de agarose por eletroforese de campo pulsado foi realizada por inspeção visual. As interpretações foram realizadas de acordo com as recomendações de Tenover e colaboradores (1995). As amostras que apresentaram o mesmo perfil eletroforético com diferença de até três bandas foram assinaladas como pertencentes a um único clone e receberam um algarismo romano. As amostras que apresentaram perfis eletroforéticos com mais de sete bandas de diferença foram consideradas clones diferentes e receberam algarismos romanos diferentes e os perfis que apresentaram menos de seis bandas de diferença receberam letras minúsculas para identificá-los.

3.8 ENSAIO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Para a detecção de biofilme foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas de poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nunclon; Nunc InterMed). As amostras bacterianas analisadas foram semeadas por esgotamento em meio TSA (Trypticase Soy Agar) e incubadas por 24 h a 37°C. Foram incluídas também como controles negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente cepas-padrão de *E. coli* DH5A e EAEC 042, além da cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 uma vez que está é cepa é preconizada como controle positivo para ensaios com *P.*

aeruginosa. Após esse período, uma alçada do crescimento de 24h foi repicada para tubos contendo 3 ml de caldo caseína-soja e incubados por uma noite com agitação. Em seguida, foram aplicados 200 µL das culturas bacterianas em cada poço em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas por 4h a 37°C para avaliação da produção rápida de biofilme ou por 24 h a 37°C conforme a metodologia seguida. Após a incubação, os conteúdos da placa foram aspirados e os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de PBS (0,01M, pH 7,2) e a placa foi colocada a temperatura ambiente para secar. Em seguida, 30 µL de solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço por 10 minutos. Após a coloração do biofilme o corante foi aspirado e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS (0,01M, pH 7,2). A placa foi mantida à temperatura ambiente para secar e o corante foi eluído com 200 µL de etanol absoluto por 10 minutos e 150 µL da solução contida em cada um dos poços da placa foram transferidos para outra placa limpa e seca. A densidade ótica do biofilme (DO) foi quantificada utilizando um leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm e as amostras foram classificadas segundo Stepanović e colaboradores. (2000). Foram realizados quatro experimentos independentes. As amostras foram classificadas em quatro categorias de acordo com a média das DOs (densidade ótica) relacionada com os resultados obtidos para as (DO_c - densidade ótica do controle negativo) *E. coli* DH5A. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente (NA), quando a DO ≤ DO_c; fracamente aderente (+) quando a DO_c < DO ≤ 2 x DO_c; moderadamente aderente (++) , quando 2 x DO_c < DO ≤ 4 x DO_c ou fortemente aderente (+++), quando 4x DO_c < DO.

4. RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Neste estudo foram analisadas 56 amostras identificadas como *P. aeruginosa* provenientes da contagem de bactérias heterotróficas de amostras de água para hemodiálise, coletadas em diferentes pontos do sistema de tratamento, como: após o tratamento (pós-osmose reversa), de água utilizada no reprocessamento dos dialisadores (reuso) e da solução de diálise (dialisato). As amostras bacterianas foram isoladas no período de 2004 a 2008 (Tabela 1).

4.2. ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO OBTIDOS PELA SEPARAÇÃO POR ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE).

Um total de 56 amostras de *P. aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise de seis UTRS foi analisado por esta metodologia. Foram observados nove perfis eletroforéticos entre as amostras bacterianas analisadas. Com exceção dos perfis eletroforéticos, II e IIa que apresentaram apenas 2 bandas de diferença, os demais perfis apresentaram mais de sete bandas de diferença sendo considerados não relacionados e portanto clones diferentes. Os perfis II e IIa foram considerados como pertencentes ao mesmo clone.

Neste estudo foi observado que a maioria das amostras de *P. aeruginosa* oriundas de uma coleta no mesmo ano (mesma data) tiveram o mesmo perfil eletroforético independente do ponto de coleta (pós osmose, reuso e solução de diálise). Apenas as UTRS A e D apresentaram mais de um perfil de PFGE na mesma data de coleta. Na UTRS A foi observado que no ano de 2007 (A4/2007, A5/2007, A6/2007) foram encontrados os perfis eletroforéticos II e IIa que pertenciam ao mesmo clone e no ano de 2008 (A7/2008, A8/2008 e A9/2008) foram encontrados

os perfis eletroforéticos IIa e I (Tabela 2, Figura 2). Na UTRS D foi observado que no ano de 2007 (D7/2007, D8/2007 e D9/2007) foram apresentados os perfis eletroforéticos IV e V (Tabela 2 e Figura 5).

O perfil eletroforético I foi encontrado em três UTRS (A, B e C). Na UTRS A foi encontrado no ano de 2005 e novamente em 2008, na UTRS B em 2006 e 2008 e na UTRS C nos anos de 2005, 2006 e 2007 (Tabela 2, Figuras 2, 3 e 4).

Também foi verificada a persistência de outros perfis eletroforéticos nas demais UTRS. O perfil eletroforético III foi encontrado nos anos de 2004 e 2005 na UTRS B, o perfil IV em 2005 e 2006 na UTRS D, os perfis VI e VII em 2005 e 2006 e em 2007 e 2008 respectivamente na UTRS E e o perfil VIII em 2005 e 2006 na UTRS F (Tabela 2, Figuras 3, 5, 6 e 7). Apenas as UTRS C e F apresentaram o mesmo perfil eletroforético em todos os anos analisados (Tabela 2, Figura 4 e 7).

4.3 PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Na análise do perfil de resistência aos antimicrobianos foi observado que todas as 56 amostras de *P. aeruginosa* apresentaram resistência aos seguintes antibióticos: ampicilina (AM), ampicilina/sulbactam (AMS), cefoxitina (FOX), cefotaxime (TAX), cephalotina (CF). Todas as amostras bacterianas apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos: amicacina (AN), aztreonam (AZM), cefepime (FEP), ceftazidime (TAZ), ciprofloxacina (CIP), imipinem (IMI), meropenem (MEM), piperacilina/tazobactam (TZP). Dezesete (30,36%) amostras bacterianas, todas pertencentes aos perfis eletroforéticos II, IIa, III e VIII, apresentaram resistência ao trimetropim/sulfametaxazole (SXT). Observamos também que todas as amostras (8,93%) dos perfis II e IIa apresentaram resistência à gentamicina (GM) além do trimetropim/sulfametaxazole (SXT).

4.4 PRODUÇÃO DE BIOFILMES

Os resultados sobre a expressão de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* oriundas de amostras de água de hemodiálise estão apresentados na tabela 3. A metodologia foi empregada utilizando amostras de *P. aeruginosa* de representantes de todos os perfis eletroforéticos. Foram escolhidas amostras de *P. aeruginosa* representantes de todos os anos analisados em cada UTRS. Todas as amostras provenientes de água de hemodiálise analisadas foram classificadas como fortemente aderentes (+++) quando analisadas quanto a produção de biofilme em 4h e em 24 horas. A amostra de *P. aeruginosa* ATCC 9027 foi utilizada neste estudo e também foi classificada como fortemente aderente. Pouca variação foi observada na DO dos biofilmes de *P. aeruginosa* quando comparamos o período de tempo (Tabela 3).

Tabela 1. Número de amostras de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo de acordo com a origem e o ano da coleta.

UTRS ^a	2004 ^b			2005			2006			2007			2008			Total
	PO ^c	R ^d	SD ^e	PO	R	SD	PO	R	SD	PO	R	SD	PO	R	SD	
A	1	1	1							1	1	1	1	1	1	9
B	1	1	1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	12
C				1	1	1	1	1	1	1	1	1				9
D				1	1	1	1	1	1	1	1	1				9
E				1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	11
F				1	1	1	1	1	1							6
TOTAL																56

^a UTRS – Unidade de Terapia Renal Substitutiva

^b As coletas realizadas nos anos indicados foram realizadas na mesma data nos diferentes pontos: pós osmose, reuso, solução de diálise

^c PO – Pós osmose

^d R - Reuso

^e SD- Solução de diálise

Tabela 2. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise: resultados da análise do perfil de resistência aos antimicrobianos e do perfil de fragmentação do DNA cromossômico obtidos pela separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Amostras bacterianas	Origem (Pontos de Coleta)	Perfil eletroforético	Perfil de resistência aos antimicrobianos ^a
A1/2004	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A2/2004	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A3/2004	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A4/2007	Pós osmose	II	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A5/2007	Reuso	II	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A6/2007	Solução de diálise	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A7/2008	Pós osmose	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A8/2008	Reuso	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A9/2008	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B1/2004	Pós osmose	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B2/2004	Reuso	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B3/2004	Solução de diálise	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B4/2005	Pós osmose	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B5/2005	Reuso	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B6/2005	Solução de diálise	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B7/2006	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B8/2006	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B9/2006	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B10/2008	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B11/2008	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B12/2008	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C1/2005	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C2/2005	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C3/2005	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF

^a AM - ampicilina, AMS - ampicilina/sulbactam, FOX - cefoxitina, TAX - cefotaxime, CF - cephalotina, SXT - trimetropim/sulfametaxazole, GM – gentamicina.

Tabela 2. Continuação

Amostras bacterianas	Origem (Pontos de Coleta)	Perfil eletroforético	Perfil de resistência aos antimicrobianos ^a
C4/2006	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C5/2006	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C6/2006	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C7/2007	Pós osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C8/2007	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C9/2007	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D1/2005	Pós osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D2/2005	Reuso	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D3/2005	Solução de diálise	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D4/2006	Pós osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D5/2006	Reuso	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D6/2006	Solução de diálise	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D7/2007	Pós osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D8/2007	Reuso	V	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D9/2007	Solução de diálise	V	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E1/2005	Pós osmose	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E2/2005	Reuso	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E3/2005	Solução de diálise	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E4/2006	Reuso	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E5/2006	Solução de diálise	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E6/2007	Pós osmose	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E7/2007	Reuso	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E8/2007	Solução de diálise	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E9/2008	Pós osmose	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E10/2008	Reuso	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E11/2008	Solução de diálise	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
F1/2005	Pós osmose	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F2/2005	Reuso	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F3/2005	Solução de diálise	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT

^a AM - ampicilina, AMS - ampicilina/sulbactam, FOX - cefoxitina, TAX - cefotaxime, CF - cephalotina, SXT - trimetoprim/sulfametaxazole, GM – gentamicina.

Tabela 2. Continuação

F4/2006	Pós osmose	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F5/2006	Reuso	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F6/2006	Solução de diálise	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT

^a AM - ampicilina, AMS - ampicilina/sulbactam, FOX - cefoxitina, TAX - cefotaxime, CF - cephalotina, SXT - trimetoprim/sulfametaxazole, GM – gentamicina.

Tabela 3. Resultados de produção de biofilme de perfis eletroforéticos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise.

Amostra bacteriana	Classificação	Perfil eletroforético	Produção de biofilme 4 horas (média da DO ^a)	Produção de biofilme 24 horas (média da DO)
<i>E.coli</i> AEAC 042 (CP ^b)	NA ^c	NR ^d	1,415	1,498
<i>E.coli</i> DH5A (CN ^e)	NA	NR	0,138	0,240
<i>P aeruginosa</i> ATCC 9027	+++ ^f	NR	1,921	2,105
A1/2004	+++	I	2,028	2,401
A6/2007	+++	II	2,297	2,712
A7/2008	+++	II a	1,944	2,792
B1/2004	+++	III	2,092	2,612
B4/2005	+++	I	2,065	2,262
B7/2006	+++	I	1,921	2,448
C1/2005	+++	I	1,910	2,324
C4/2006	+++	I	1,940	2,269
C7/2007	+++	I	1,985	2,275
D1/2005	+++	IV	2,219	2,519
D4/2006	+++	IV	1,997	2,421
D7/2007	+++	IV	2,208	2,545
E1/2005	+++	VI	2,201	2,750
E4/2006	+++	VII	2.369	2,663
E8/2007	+++	VII	2,401	2,576
F1/2005	+++	VIII	2,434	2,525
F6/2006	+++	VIII	2,198	2,512

^a DO – Densidade ótica

^b CP – Controle positivo

^c NA – Não se aplica

^d NR – Não realizado

^e CN – Controle negativo

^f +++ - fortemente aderente

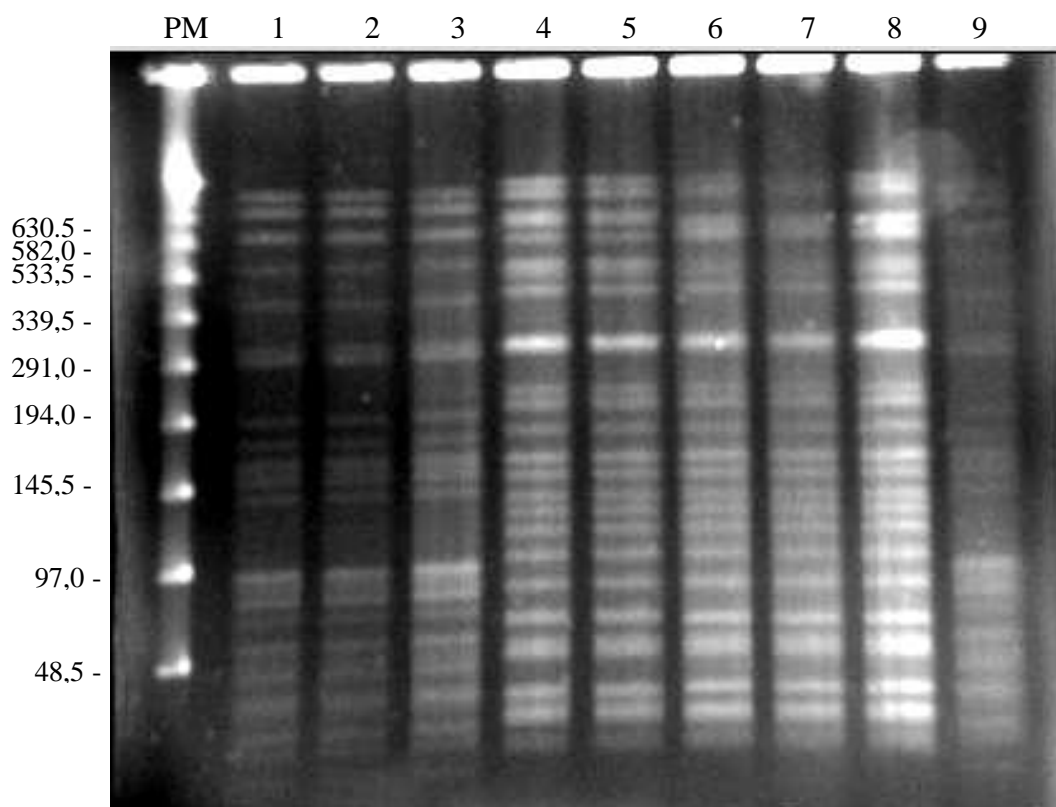


Figura 2. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS A após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – A1/2004 (perfil de PFGE I), 2 – A2/2004 (perfil de PFGE I), 3 – A3/2004 (perfil de PFGE I), 4 – A4/2007 (perfil de PFGE II), 5 – A5/2007 (perfil de PFGE II), 6 – A6/2007 (perfil de PFGE IIa), 7 – A7/2008 (perfil de PFGE IIa), 8 – A8/2008 (perfil de PFGE IIa), 9 – A9/2008 (perfil de PFGE I).

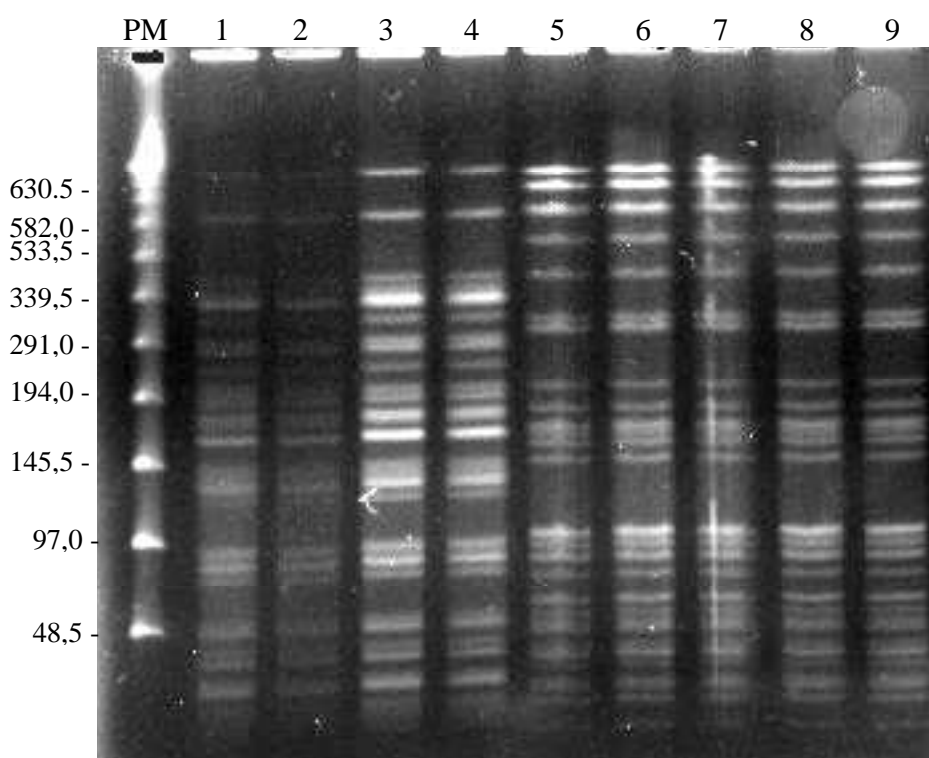


Figura 3. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS B após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – B2/2004 (perfil de PFGE III), 2 – B3/2004 (perfil de PFGE III), 3 – B5/2005 (perfil de PFGE III), 4 – B6/2005 (perfil de PFGE III), 5 – B8/2006 (perfil de PFGE I), 6 – B9/2006 (perfil de PFGE I), 7 – B10/2008 (perfil de PFGE I), 8 – B11/2008 (perfil de PFGE I), 9 – B12/2008 (perfil de PFGE I).

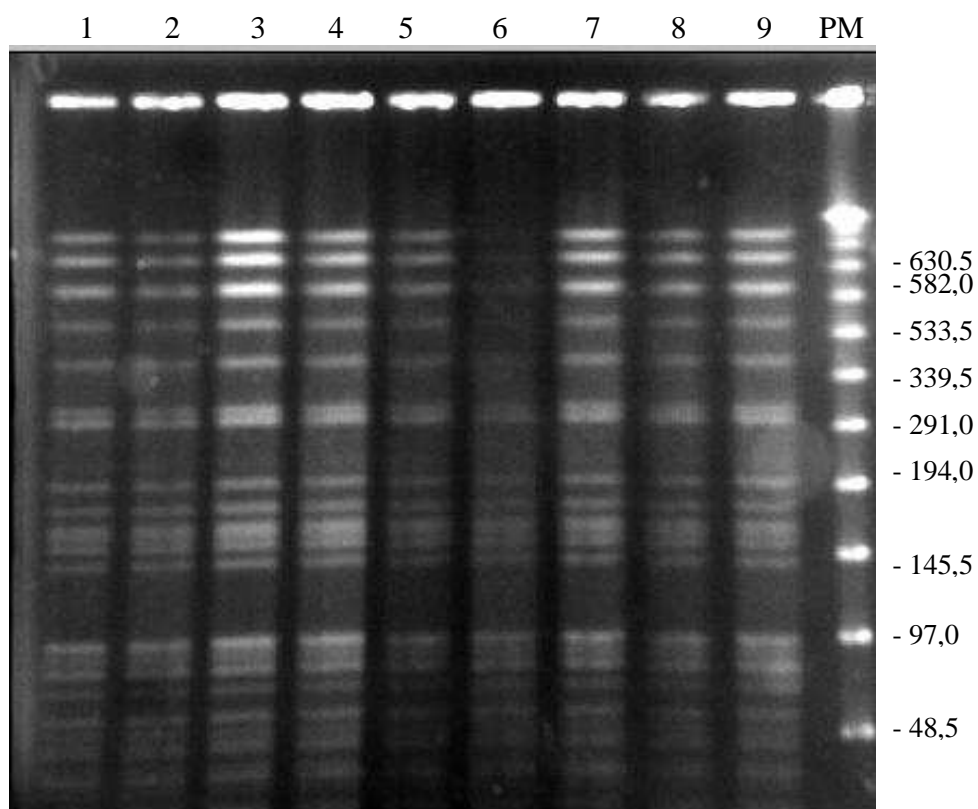


Figura 4. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS C após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. 1 – C1/2005 (perfil de PFGE I), 2 – C2/2005 (perfil de PFGE I), 3 – C3/2005 (perfil de PFGE I), 4 – C4/2006 (perfil de PFGE I), 5 – C5/2006 (perfil de PFGE I), 6 – C6/2006 (perfil de PFGE I), 7 – C7/2007 (perfil de PFGE I), 8 – C8/2007 (perfil de PFGE I), 9 – C9/2007 (perfil de PFGE I), PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs).

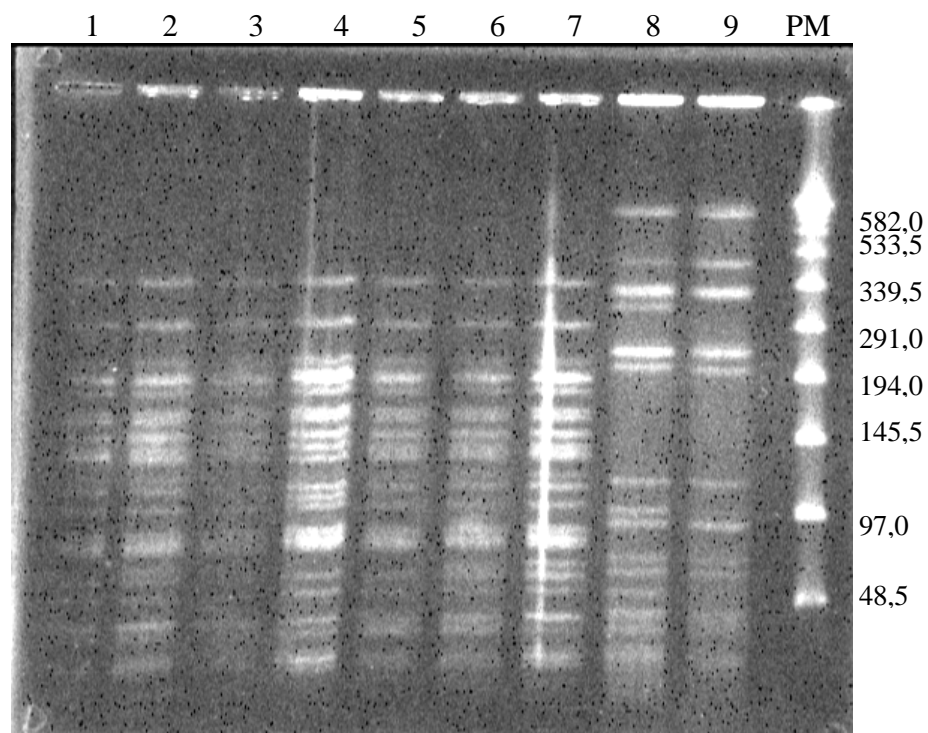


Figura 5. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS D após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. 1 – D1/2005 (perfil de PFGE IV), 2 – D2/2005 (perfil de PFGE IV), 3 – D3/2005 (perfil de PFGE IV), 4 – D4/2006 (perfil de PFGE IV), 5 – D5/2006 (perfil de PFGE IV), 6 – D6/2006 (perfil de PFGE IV), 7 – D7/2007 (perfil de PFGE IV), 8 – D8/2007 (perfil de PFGE V), 9 – D9/2007 (perfil de PFGE V), PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs).

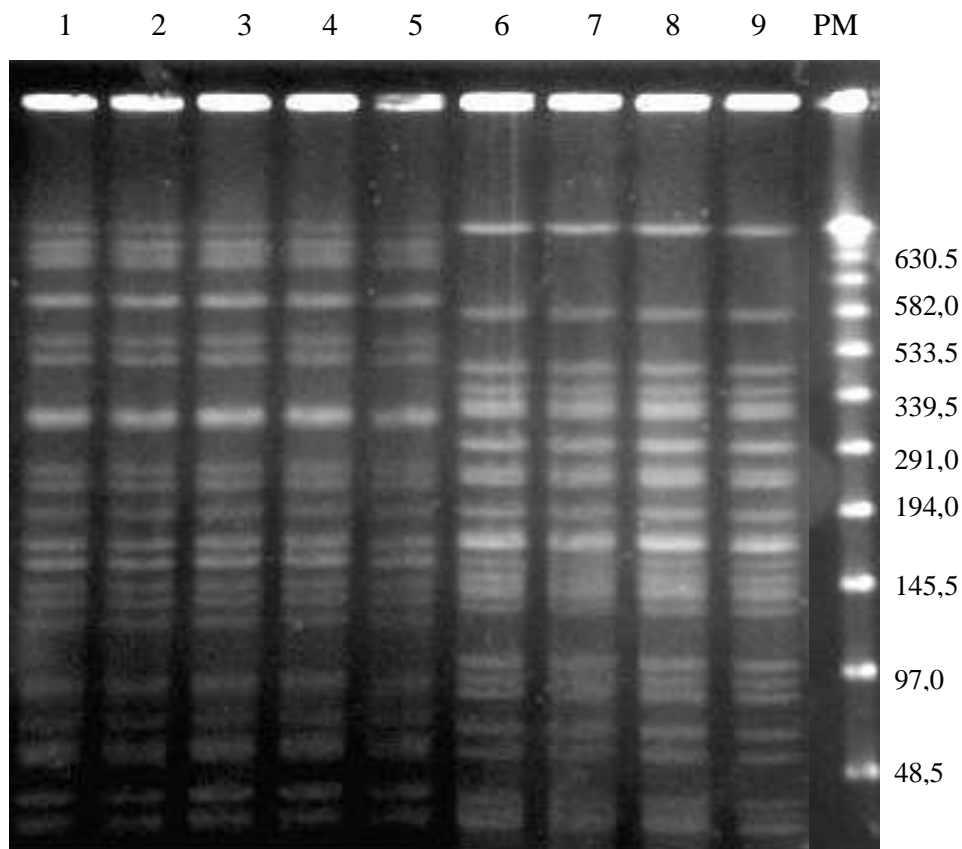


Figura 6. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS E após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. 1 – E1/2005 (perfil de PFGE VI), 2 – E2/2005 (perfil de PFGE VI), 3 – E3/2005 (perfil de PFGE VI), 4 – E4/2006 (perfil de PFGE VI), 5 – E5/2006 (perfil de PFGE VI), 6 – E7/2007 (perfil de PFGE VII), 7 – E8/2007 (perfil de PFGE VII), 8 – E10/2008 (perfil de PFGE VII), 9 – E11/2008 (perfil de PFGE VII), PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs).

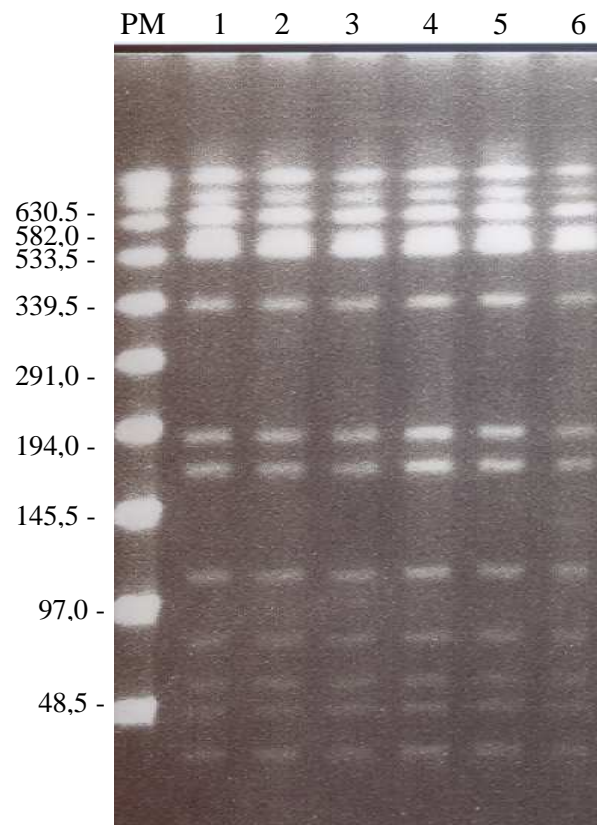


Figura 7. Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da UTRS F após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – F1/2005 (perfil de PFGE VIII), 2 – F2/2005 (perfil de PFGE VIII), 3 – F3/2005 (perfil de PFGE VIII), 4 – F4/2006 (perfil de PFGE VIII), 5 – F5/2006 (perfil de PFGE VIII), 6 – F6/2006 (perfil de PFGE VIII).

5. DISCUSSÃO

Em 1999, o INCQS estabeleceu um programa de avaliação da qualidade da água de hemodiálise em colaboração 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. Este programa originou uma série de estudos e ações que vem sendo realizadas até a presente data. Esta dissertação é parte dos estudos realizados pelo Programa de Hemodiálise.

Os resultados obtidos no INCQS durante o período de 1999 a 2003 mostravam um quadro preocupante, onde o número de análises microbiológicas insatisfatórias da água de hemodiálise estavam acima de 69,77%. Neste período várias orientações sobre aperfeiçoamento do tratamento da água, desinfecção apropriada do sistema das máquinas, observação dos protocolos de reprocessamento dos dialisadores, monitoramento e controle de qualidade em todo sistema foram dadas pelo programa de hemodiálise visando à melhoria contínua para saúde dos pacientes. Os dados relacionados à avaliação microbiológica realizada pelo Programa de Hemodiálise/INCQS também alertaram para a necessidade de determinar um nível de ação que foi sugerido pelo INCQS numa consulta pública. O nível de ação de 50 UFC/mL referente à contagem de bactérias heterotróficas foi incluído na resolução (BRASIL, 2006a) que substituiu a Portaria nº. 82/2000 (BRASIL, 2000c). O nível de ação de 50 UFC/mL foi estabelecido pela AAMI e é atualmente recomendado (AAMI, 2001, 2004).

O estabelecimento do nível de ação causou mudanças nos procedimentos do tratamento da água utilizada no sistema de hemodiálise e foi observado o impacto desta medida na avaliação microbiológica realizada pelo Programa de Hemodiálise/INCQS. O cumprimento deste limite pelas clínicas de hemodiálise e o monitoramento constante das clínicas de hemodiálise resultaram numa profunda melhoria na qualidade da água de hemodiálise, o que pode ser facilmente constatado com a análise comparativa dos resultados obtidos a partir do ano de 2004, já que o

número de análises insatisfatórias foi consideravelmente reduzido (6,99% de resultados insatisfatórios em 2006) (FERREIRA, 2006).

Ferreira (2006) verificou também que a principal espécie bacteriana isolada de amostras de água purificada e dialisato nas clínicas do Estado do Rio de Janeiro era a *P. aeruginosa*, como também relatado em outros estudos (ZUNINO et al., 2002; ARVANITIDOU et al., 2003; BOMMER & JABER, 2006; MONTANARI et al., 2009). Sendo assim, nesta dissertação esta espécie bacteriana foi escolhida como objeto de estudo e avaliamos amostras oriundas de três pontos de coleta em seis clínicas de hemodiálise do Rio de Janeiro. Estas clínicas apresentaram valores insatisfatórios de contagem de bactérias heterotróficas sendo isolada a bactéria *P. aeruginosa* em diversos anos consecutivamente. Estas amostras foram avaliadas quanto à produção de biofilme, à resistência aos antimicrobianos e a diversidade genética.

A espécie *P. aeruginosa* de origem clínica apresenta altas taxas de resistência aos antimicrobianos, e geralmente apresentam multiresistência incluindo importantes antimicrobianos como β -lactâmicos e fluorquinolonas (ROSSOLINI & MANTENGOLI, 2008). Entretanto, ao testar a susceptibilidade das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de água de hemodiálise deste estudo frente aos antimicrobianos utilizados no cartão GNS-655 (VITEK/BioMerieux), observamos que as amostra apresentaram pouca resistência aos antimicrobianos empregados na prática clínica, tais como os aminoglicosídeos, fluorquinolonas, carbapenemas e β -lactâmicos utilizados para o tratamento de infecções por *Pseudomonas*. Observamos em todas as amostras analisadas apenas a resistência aos antimicrobianos aos quais a espécie bacteriana em questão apresenta resistência intrínseca. Apenas três perfis eletroforéticos (II, III e VIII) apresentaram resistência a gentamicina e/ou ao sulfametaxazole-trimetropim mostrando que as amostras de *P. aeruginosa* analisadas apresentaram pouca resistência aos antimicrobianos. Arvanitidou e colaboradores (2003) observaram que todas as amostras de *P. aeruginosa* isoladas de água de hemodiálise apresentaram resistência ao

trimetropim-sulfametaxazole e a tetraciclina e houve detecção de cepas resistentes a alguns antimicrobianos utilizados na clínica como: cefepime (3/32), ceftazidime (4/32), ciprofloxacina (5/32), ticarcilina (11/32). Recentemente, um estudo, realizado em uma unidade de terapia substitutiva em um hospital do Brasil, no Paraná, verificou que as amostras de *P. aeruginosa* isoladas de água de hemodiálise apresentaram alta resistência ao cloranfenicol (12/15 amostras) e algumas amostras apresentaram resistência aos antimicrobianos: cefepime (6/15), ceftazidime (3/15), gentamicina (5/15), imipinem (6/15) (BORGES et al., 2007). Comparando o aspecto amostragem, os estudos de Borges e colaboradores (2007) e Arvanitidou e colaboradores (2003) analisaram principalmente amostras provenientes de dialisato e em nosso estudo foram analisadas amostras bacterianas de outros pontos do sistema de tratamento de água para hemodiálise. Neste estudo a resistência apresentada pelas amostras de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos não foi tão alta quanto naquelas encontradas em hospitais. Este fato pode ser explicado devido a origem das amostras de *P. aeruginosa* analisadas que, possivelmente estão presentes no meio ambiente e têm acesso ao sistema de purificação da água onde não há pressão seletiva das drogas antimicrobianas, como acontece com as amostras oriundas de pacientes hospitalizados.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE possibilitou a determinação do relacionamento das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise de seis UTRS analisadas neste estudo. Inicialmente utilizamos esta metodologia para determinar o relacionamento das amostras da mesma espécie isoladas de água coletadas em diferentes pontos do sistema de tratamento e distribuição numa mesma data de coleta. Verificamos então que havia um relacionamento estreito na maioria das vezes, isto é, detectamos o mesmo clone nos três pontos de coleta analisados numa mesma data (Tabela 2). Ao longo do estudo observamos que em algumas coletas as amostras não eram relacionadas. Na UTRS A, na coleta do ano de 2008, observamos que dois pontos possuíam amostras de *P. aeruginosa* do mesmo clone e o terceiro ponto uma

amostra pertencente a um clone detectado no ano de 2005. Na UTRS D observamos no ano de 2007, caso semelhante ao anteriormente citado, dois clones detectados na mesma coleta. Este fato nos leva a pensar que no caso de contaminações persistentes a colonização do sistema de tratamento de água pode ocorrer por mais de um clone da mesma espécie. No caso da formação de biofilmes devido à contaminação do sistema de água, a composição de espécies microbianas pode ser variável como ocorre em vários ambientes na natureza (ANDERSSON et al, 2008).

Esta metodologia também foi utilizada para responder outra questão: qual seria o tempo de persistência de uma amostra bacteriana em um sistema de tratamento de água de hemodiálise? Deste modo analisamos amostras coletadas em diferentes datas e observamos que foram detectados clones ao longo de até três anos como o caso do clone I na UTRS C. Um fato interessante foi a detecção do clone I em três UTRS analisadas. Este clone foi detectado na UTRS A em 2005 e em 2008, na UTRS B em 2006 e 2008 e na UTRS C ao longo dos três anos analisados (2005, 2006 e 2007) (Tabela 2). Este clone não apresentou resistência aos antimicrobianos utilizados na UTRS, sugerindo uma origem ambiental e foi classificado como produtor forte de biofilme, apresentando valores de densidade ótica (DO) semelhantes as amostras pertencentes a outros clones. Nossos resultados sugerem que este clone possui características que possibilitaram sua adaptação ao sistema de tratamento da água para hemodiálise.

A contaminação bacteriana no sistema de tratamento e distribuição de água de hemodiálise pode levar a formação de biofilmes, e a presença destes representa um grande risco para a qualidade da água para hemodiálise devido à persistência do microrganismo em diferentes pontos do sistema, à contínua liberação de bactérias e de seus componentes celulares e ao desenvolvimento de resistência aos procedimentos de desinfecção (SMEETS et al., 2003; CAPPELLI et al., 2005). Vários estudos mostram a formação destas estruturas no sistema de tratamento de água para hemodiálise (MAN et al., 1998; CAPPELLI et al., 2003).

A produção de biofilme “in vitro” utilizando placas de poliestireno foi realizada neste trabalho de dissertação para avaliar amostras de *P. aeruginosa* de diferentes clones detectados por metodologia molecular. Foi verificado que todas as amostras analisadas eram fortemente produtoras de biofilme, segundo a metodologia utilizada (Tabela 3). No estudo de Borges e colaboradores (2007), que utilizou a mesma metodologia de detecção de biofilme em amostras de *P. aeruginosa* oriundas de água de hemodiálise e de “dialisato”, foram verificadas amostras classificadas como produtoras fortes, moderadas ou fracas. Bernardo (2009) utilizou a mesma metodologia para avaliar a produção de biofilme de *P. aeruginosa* isoladas de água mineral e encontrou 52,9% de amostras produtoras forte, 41,2% de amostras produtoras moderadas e 5,9 % de amostras produtoras fracas. Outros estudos realizados com *P. aeruginosa* de origem clínica também mostraram esta variação na classificação, entretanto diferem nas metodologias de detecção (FONSECA et al., 2004; FONSECA et al., 2007). As metodologias diferem principalmente nos meios de cultura utilizados, no tempo de formação do biofilme, no corante, no tempo de coloração e na interpretação dos resultados. No nosso estudo verificamos que as amostras de *P. aeruginosa* analisadas não apresentaram variações significativas na leitura da DO quando o tempo de incubação para a formação de biofilme foi variado (Tabela 3). Entretanto não há outros estudos sobre a detecção de biofilme nesta espécie bacteriana, provenientes de água e não há uma metodologia padronizada para a detecção da produção de biofilme em placas de poliestireno. Recentemente, um estudo (PEETERS, NELIS & COENYE, 2008) foi realizado comparando os métodos de quantificação da produção de biofilme utilizando placas de poliestireno, onde

estes autores realizaram uma padronização desta metodologia para algumas espécies bacterianas, inclusive para *P. aeruginosa*, entretanto os estudos que avaliam a produção de biofilme em *P. aeruginosa* realizados até a presente data, não seguem as recomendações sugeridas.

Cappelli e colaboradores (2005) afirmaram que não há como avaliar a extensão e incidência da formação de biofilmes num sistema de tratamento de água para hemodiálise, uma vez que não há um método de detecção “in vivo” que verifique a sua erradicação, além disso, as condições experimentais “in vitro” não representam as condições do sistema. Estes autores afirmam também que uma vez que o biofilme esteja formado, este passa a ser mais resistente aos métodos convencionais de desinfecção e que todos os esforços devem ser feitos para impedir a contaminação bacteriana e a colonização a fim de impedir e tratar complicações inflamatórias em pacientes de hemodiálise. Nosso estudo sugere que as amostras oriundas de água de hemodiálise apresentam um grande potencial de produção de biofilme nas condições em que foram realizados os experimentos “in vitro”. Entretanto, podemos sugerir que a determinação da diversidade genética das amostras bacterianas oriundas de água de hemodiálise seja um instrumento adicional para avaliar a qualidade microbiológica do sistema de purificação de água das clínicas de hemodiálise, uma vez que a metodologia empregada pode indicar a persistência de clones que poderiam estar associados à presença de biofilmes, que não estariam sendo efetivamente eliminados por procedimentos de desinfecção. Além da aplicação citada acima, esta metodologia pode ser empregada pelo Programa de Hemodiálise/INCQS também para avaliar se os surtos de bacteremia em clínicas de hemodiálise tem como fonte os fluidos de hemodiálise com intuito de orientar o monitoramento das clínicas.

Vários estudos mostram a importância dos procedimentos de desinfecção e existem vários guias e protocolos internacionais que preconizam o estabelecimento de protocolos a serem utilizados por clínicas de hemodiálise (AAMI, 2004; CAPPELLI et al., 2006; EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). 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 (ARVANITIDOU et al., 1998; ZUNINO et al., 2002).

No Japão, a Sociedade Japonesa de Terapia para Diálise estabeleceu padrões de qualidade da água para hemodiálise, mais restritos que os estabelecidos internacionalmente. Naquele país são utilizados dializadores de alta performance e é recomendada a utilização de fluido de diálise ultrapuro em todas as modalidades de diálise (KAWANISHI et al., 2009). Masakane e colaboradores (2008) realizaram um estudo para avaliar a qualidade microbiológica do fluido para hemodiálise em várias clínicas no Japão e verificaram que a qualidade deste é extremamente alta e associaram este fato a uma alta taxa de sobrevivência de pacientes que realizam hemodiálise. Evidentemente, estas medidas só podem ser adotadas em países desenvolvidos, mas exemplifica a importância de manter a qualidade microbiológica da água para hemodiálise. O trabalho realizado por Ferreira (2006) junto ao Programa de Hemodiálise do INCQS mostrou também a importância do monitoramento constante das UTRS e da avaliação microbiológica da qualidade da água utilizada.

Nystrand (2009) alerta para a necessidade de padronização das recomendações oficiais para a qualidade dos fluidos de diálise, visando a harmonização e uma referência mundial de qualidade que facilitará a interpretação de estudos internacionais e conseqüentemente a garantia da sobrevivência de pacientes com doenças renais crônicas.

6. CONCLUSÕES

Com relação ao perfil de resistência das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de água de hemodiálise, foi observado que as amostras bacterianas apresentaram pouca resistência aos antimicrobianos empregados na prática clínica. Apenas três perfis eletroforéticos (II, III e VIII) apresentaram resistência a gentamicina e/ou ao sulfametaxazole-trimetoprim além dos outros (Tabela 2), mostrando que as amostras de *P. aeruginosa* analisadas apresentaram pouca resistência aos antimicrobianos em comparação com amostras de *P. aeruginosa* de origem hospitalar.

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE possibilitou a determinação do relacionamento das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise e mostrou:

- A) um relacionamento estreito entre as amostras de *P. aeruginosa* nos três pontos de coleta analisados numa mesma data, isto é, foi detectado o mesmo clone nos pontos de coleta analisados na maioria das UTRS;
- B) a presença de clones diferentes na mesma coleta nas UTRS A e D. Este fato nos leva a pensar que no caso de contaminações persistentes a colonização do sistema de tratamento de água pode ocorrer por mais de um clone da mesma espécie;
- C) a persistência de clones ao longo de até três anos como o caso do clone I na UTRS C;
- D) a detecção do clone I em três UTRS (A, B e C) analisadas.

A detecção da produção de biofilme “in vitro” utilizando placas de poliestireno foi utilizada para avaliar amostras de *P. aeruginosa* de diferentes clones detectados

por metodologia molecular e foi verificado que todas as amostras foram fortemente produtoras de biofilme.

Este estudo mostra que a determinação da diversidade genética das amostras bacterianas oriundas de água de hemodiálise pode ser um instrumento adicional para avaliar a qualidade microbiológica do sistema de purificação de água das UTRS, uma vez que a metodologia de PFGE que foi avaliada neste estudo pode indicar a persistência de clones que poderiam estar associados à presença de biofilmes, que não estariam sendo efetivamente eliminados por procedimentos de desinfecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, S. *et al.* Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. **FEMS Microbiology Letters**, v. 283, n. 1, p. 83-90, 2008.

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. Water quality for hemodialysis. **American national standard for hemodialysis systems**, 2. ed.. Arlington Press, Arlington, VA, 2001.

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

ARVANITIDOU, M. *et al.* Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centers of Greece. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, p. 949-954, 1998.

BERNARDO, Samara Pinto Custódio. Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. 2009.

BORGES, C. R. *et al.* Microbiological quality of water and dialysate in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. **Journal Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1791-7, 2007.

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

BRASIL a. 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**], Brasília, DF, 08 fev. 2000.

BRASIL b. Resolução-RDC/ANVISA n.º154, de 31 de maio de 2004. 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)

BRUNET, P.; BERLAND, Y. Water quality and complications of haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, p. 578-80, 2000.

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

CARRIÇO, J. A. *et al.* Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5483-90, 2005.

CAPPELLI, G. *et al.* Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 10, p. 2105-2111, 2003.

CAPPELLI G. *et al.* Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, 2, p. 266-70, 2005.

CAPPELLI, G *et al.* Water treatment and monitor disinfection. **Hemodialysis International**, n. 10, suppl 1, p. S13-18, 2006.

CAPPELLI, G *et al.* Biofilm on artificial surfaces. **Contributions for Nephrology**, v. 154, p. 61-71. 2007.

CANAUD, B *et al.* Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. **Blood Purif**, v. 18, p. 200-213, 2000.

CIPRIANO, R. *et al.*, Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospital. **Microbiology Drug Resistance**, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.

DEPLANO A, *et al.* Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1198-1204, 2005.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infect Disease**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2005.

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.

FERREIRA, Joana Angélica Barbosa. **Avaliação microbiológica da água utilizada nas unidades de terapia renal substitutiva no estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro. Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2006.

FONSECA, A. P. *et al.* Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, Pt 9, p. 903-10, 2004.

FONSECA, E. L. *et al.* Emergence of dhfrXVb and blaCARB-4 gene cassettes in class 1 integrons from clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Amazon region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 81-4, 2006.

FONSECA, A. P. *et al.* Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 505-16, 2007.

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

GALES, A. C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

HOENICH, N. A., RONCO, C., LEVIN, R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. **Blood Purification**, v. 24, p.11-18, 2006.

JUHAS M, EBERL L, TÜMMLER B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 459-71, 2005.

KAWANISHI, H, *et al.* The new standard of fluids for hemodialysis in Japan. **Blood Purification**, v. 27, Suppl 1, p. 5-10, 2009.

KLAUSEN, M. *et al.* Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, n. 1, p. 1-11, 2006.

KOMLOS, J. *et al.* Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. **Microbiol Ecology**, v. 49, n. 1, p. 114–125, 2005.

LO CASCIO, G. *et al.* A napkin-associated outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**. v. 64, p. 56-62, 2006.

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

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

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* our worst nightmare? **Clinical Infect Disease**, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.

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

MAN, N. K. *et al.* Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system. **Artificial Organs**, v. 22, n. 7, p. 596-600, 1998.

MANUAL DA QUALIDADE. Pesquisa de Patógenos em Produtos Não Estéreis. rev. 09. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. Seção 10. (65.3210.008)

MANUAL DA QUALIDADE. Contagem Total de Bactérias Aeróbias. rev. 11. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: **INCQS/FIOCRUZ**, 2009a. Seção 10. 5p. (65.3210.010)

MANUAL DA QUALIDADE. Contagem de bactérias heterotróficas. rev. 09. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: **INCQS/FIOCRUZ**, 2009b. Seção 10. 5p. (65.3210.030).

MARCUS, R. J. *et al.* Biofilms in nephrology. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, p.1156-1166, 2008.

MARION, K. *et al.* A new procedure allowing the complete removal and prevention of hemodialysis biofilms. **Blood Purification**, v. 23, n. 5, p. 339-48, 2005.

MASAKANE *et al.*, Bacteriological water quality in the central dialysis fluid delivery system from the survey of the Japanese Society for Dialysis Therapy. **Blood Purification**, v. 27, suppl 1, p. 11-6, 2008.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.

MONTANARI, L. B. *et al.* Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2009.

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

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

NYSTRAND, R. Dialysis fluid contamination of pathways and life of microbes. **Edna Erca Journal**, v. 27, n. 3, p. 35-139, 2001.

NYSTRAND, R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 71, n. 5, p. 223-229, 2008.

NYSTRAND, R. Official recommendations for quality of fluids in dialysis -the need for standardisation. **Journal Renal Care**, v. 35, n. 2, p. 74-81, 2009.

OLIVEIRA, M. B.; ROMÃO JR, J. E., ZATZ, R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. **Kidney International Supplement**, v. 97, p. S82-6, 2005.

PARSEK, M. R., TOLKER-NIELSEN, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 560-6, 2008.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiology Methods**, v. 72, n. 2, p. 157-65, 2008.

PEYTON, B. M., CHARACKLIS, W. G. Microbial biofilms and biofilm reactors. **Bioprocess in Technology**, v. 20, p. 187-231, 1995.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, Douglas; BENNETT. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 5. ed., v. 2, New York NY: Churchill Livingstone, 2000, p. 2310-2334.

ROSSOLINI, G. M., MANTENGOLI, E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. **Clinical Microbiology Infect**, v. 14, Suppl 6, p. 2-8, 2008.

RUTALA, W. A. A.; WEBER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, p. 597-610, 1997.

SAKURAGI; Y.; KOLTER, R. J. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5383-6, 2007.

SARAVANAN, V.; SREEKRISHNAN, T. R. Modelling anaerobic biofilm reactors-a review. **Journal of Environmental Management**, v. 81, n. 1, p. 1-18, 2006.

SIMÕES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 6192-6200, 2007

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **American Society for Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SMEETS, E. *et al.* Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. **Kidney International**, v. 63, n. 4, p. 1574-6, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo da SBN**. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Censo/2008/censoSBN2008.pdf>>. Acesso em: 28 ago. de 2009.

STEPANOVIC, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

TEIXEIRA, L. M. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strain isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n.11 p. 2778-2781, 1997.

TENA, D. *et al.* Outbreak of long-term intravascular catheter bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. **European Journal Microbiology Infection Disease**, v. 24, p. 727-732. 2005.

TENOVER, F.C. *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, 1995.

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA. **Microbial Limit Tests**, 30. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Conventional, 2007. p. 79-97.

THE UNITED STATE PHARMACOPOEIA. Microbial Limit: The total viable count does not exceed 100 cfu per mL. Water for Hemodialysis. **Pharmacopeial Forum** 31. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Conventional, 2008. p. 3525.

TRAGER, H. The influence of bacteria in dialysis water on its endotoxin level. **EDTNA ERCA Journal**, v. 28, p. 121-124, 2002.

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

WANG, S. A. *et al.* An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. **Infection Control Hospital Epidemiol**, v. 20, n. 11, p. 746-751, 1999.

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

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, n. 5, p. 661-71, 2000.

YAN, H. *et al.* Usefulness of Sau-PCR for molecular epidemiology of nosocomial outbreaks due to *Burkholderia cepacia* which occurred in a local hospital in Guangzhou, China. **Microbiology Immunology**, v. 52, p. 283–286, 2008.

ZUNINO, P. *et al.* Microbiological quality of hemodiálisis water in a three-year multicenter study in Uruguay. **Journal of Nephrology**, v. 15 p. 374-379. 2002.