

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

Priscila Rodrigues de Jesus

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DE ÁGUA UTILIZADA EM DIÁLISE MÓVEL NO MUNICÍPIO RIO
DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2023

Priscila Rodrigues de Jesus

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
DE ÁGUA UTILIZADA EM DIÁLISE MÓVEL NO MUNICÍPIO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Maysa Beatriz Mandetta
Clementino

Rio de Janeiro

2023

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Jesus, Priscila Rodrigues de

Investigação molecular na avaliação da qualidade microbiológica de água utilizada em diálise móvel no município Rio de Janeiro. / Priscila Rodrigues de Jesus. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2023.

88 f.: il. ; fig. ; graf. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2023.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

1. Diálise. 2. Unidades Móveis de Saúde. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Tipagem de Sequências Multilocus. 5. Qualidade Microbiológica. I. Título.

Molecular investigation in the assessment of the microbiological quality of water used in mobile dialysis in the city of Rio de Janeiro.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001."

Priscila Rodrigues de Jesus

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
DE ÁGUA UTILIZADA EM DIÁLISE MÓVEL NO MUNICÍPIO RIO DE JANEIRO

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 30/08/2023

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr. André Luiz Oliveira da Silva
University of California San Francisco

Dra. Thamara Cherem Peixoto
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

ORIENTADORA

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico a realização deste trabalho aos pacientes em tratamento de hemodiálise, que meus resultados auxiliem na regulação sanitária destinada a este procedimento, cumprindo assim os propósitos da Vigilância sanitária de proteger a saúde da população.

Dedico também a todos os profissionais da área de Vigilância sanitária desde os pesquisadores que atuam nos laboratórios de pesquisa e/ou saúde pública quanto aos fiscais que fiscalizam e orientam os demais profissionais de saúde afim de possibilitar a garantia da prestação de serviços seguros e efetivos a população Brasileira.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me permitir concluir mais esta etapa em minha vida sendo minha força e perseverança no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais José Antonio Felipe de Jesus e Maria do Carmo Rodrigues de Jesus e ao meu irmão Felipe Rodrigues de Jesus por todo incentivo em toda a minha caminhada profissional, principalmente me ensinando o valor da educação na formação de um indivíduo. Ao meu marido Diego Dias dos Santos pelo apoio, incentivo, por sempre torcer por mim e se orgulhar da profissional que me tornei e por entender minhas ausências durante todo o processo. E a todos os familiares e amigos que de alguma forma me ajudaram com apoio, orações e torcida.

Agradeço em especial a Dra. Joana Angélica Barbosa Ferreira pelo acolhimento no INCQS durante minha residência e mestrado, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade, por me apresentar a área de controle de qualidade de produtos e por me tornar uma pesquisadora inquieta no monitoramento de serviços de hemodiálise.

Agradeço as amigas Mariana Sobral, Carolaine Totelote, Letícia Gouveia, Bianca Costa e Ana Carolina Oliveira que fiz durante a vivência do laboratório, que tanto contribuíram no desenvolvimento deste estudo e que levarei para a vida. E a todos que conheci e pelas trocas de experiências compartilhadas nesta trajetória.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Vigilância sanitária do INCQS por todo acolhimento e suporte durante toda a minha trajetória acadêmica, por toda atenção dada pelas secretárias e pelo carinho da coordenadora Dra. Katia Christina Leandro que faz toda diferença para cada um de nós.

Agradeço ao Dr. Kayo Bianco pela disponibilidade e paciência em auxiliar no desenvolvimento das metodologias necessárias ao desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino por conduzir minha orientação e por todo suporte no desenvolvimento deste estudo.

“É no conhecimento que existe uma chance de libertação.”

Leandro Karnal

RESUMO

A água é essencial a realização da diálise móvel, procedimento que ocorre a beira do leito de pacientes com doença renal aguda ou pacientes crônicos internados, utilizando um equipamento de osmose portátil para purificação da água. Para o procedimento de hemodiálise existe a RDC 11/2014 preconizando parâmetros de qualidade da água utilizada no procedimento, no entanto, até o momento não existe legislação para determinar parâmetros da qualidade da água utilizada na diálise móvel. A contaminação microbiológica da água ou de equipamentos é um dos fatores de risco associados ao processo. Dessa forma, a avaliação microbiológica da água é essencial e a utilização de métodos moleculares para o estudo da diversidade de microrganismos têm gerado abundante informação sobre a composição de comunidades microbianas cultiváveis e não cultiváveis. Desta forma o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de águas utilizadas em diálise móvel, utilizando abordagem microbiológica e genômica, em hospitais do município Rio de Janeiro. Foram realizadas pesquisa e identificação microbiológica por meio de metodologia convencional e molecular das amostras coletadas; avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção de fatores de virulência e perfil clonal dos isolados. Do total de amostras analisadas 33,3% (11/24) apresentaram crescimento microbiano, totalizando 121 isolados. Dentre os isolados, 111 foram identificados como *P. aeruginosa*, onde 14,4%, apresentaram resistência a Gentamicina, 4,5 % a Cefepime, 2,7% a Ceftazidima e 0,9% a Imipenem, além de presença de atividade hemolítica (85%), formação de Fosfolipase C (35%), hidrólise da gelatina (89%) e atividade proteolítica (7%). Os 10 isolados identificados como *E. coli*, apresentaram resistência a Cefuroxima (60%), a Aztreonam (40%), Ceftazidima (40%), a Cefepime (40%) e a Gentamicina (23%), além de formação de Fosfolipase C (100%). O perfil clonal de 54 isolados de *P. aeruginosa*, presentes nos 3 pontos de coleta dos hospitais analisados foi estabelecido a partir da análise de *multilocus sequence type* -MLST, onde foram identificados os STs 4296, 2230, 191, 155, 1276 e 3823, onde destaca-se o ST 2230 como o mais identificado nos isolados (30/54), além disso todos os isolados com este

ST apresentaram algum perfil de resistência ou virulência. Os resultados reforçam a necessidade de vigilância ativa e parâmetros microbiológicos específicos para o monitoramento dos procedimentos de diálise móvel a fim de evitar risco a saúde dos pacientes hospitalizados que venham a necessitar deste procedimento. Esses dados poderão contribuir com discussões para a elaboração de legislação sanitária específica, dando subsídio ao monitoramento dos serviços hospitalares pelos profissionais de vigilância sanitária.

Palavras-chave: Diálise Móvel; Investigação Molecular; Reação em Cadeia da Polimerase; Tipagem de Sequências Multilocus; Qualidade Microbiológica.

ABSTRACT

Water is essential for performing mobile dialysis, a procedure that occurs at the bedside of patients with acute kidney disease or hospitalized chronic patients, using portable osmosis equipment for water purification. For the hemodialysis procedure, there is RDC 11/2014 recommending parameters of quality of the water used in the procedure, however, so far there is no legislation to determine parameters of the quality of the water used in mobile dialysis. Microbiological contamination of water or equipment is one of the risk factors associated with the process. Thus, the microbiological evaluation of water is essential and the use of molecular methods to study the diversity of microorganisms has generated abundant information on the composition of cultivable and non-culturable microbial communities. Thus, the objective of this study was to evaluate the microbiological quality of water used in mobile dialysis, using a microbiological and genomic approach, in hospitals in the city of Rio de Janeiro. Research and microbiological identification were carried out through conventional and molecular methodology of the collected samples; evaluation of antimicrobial susceptibility profile and detection of virulence factors and clonal profile of isolates. Of the total samples analyzed, 33.3% (11/24) showed microbial growth, totaling 121 isolates. Among the isolates, 111 were identified as *P. aeruginosa*, where 14.4% showed resistance to Gentamicin, 4.5% to Cefepime, 2.7% to Ceftazidime and 0.9% to Imipenem, in addition to the presence of hemolytic activity (85%), Phospholipase C formation (35%), gelatin hydrolysis (89%) and proteolytic activity (7%). The 10 isolates identified as *E. coli* showed resistance to Cefuroxime (60%), Aztreonam (40%), Ceftazidime (40%), Cefepime (40%) and Gentamicin (23%), in addition to phospholipase formation C (100%). The clonal profile of 54 *P. aeruginosa* isolates, present in the 3 collection points of the analyzed hospitals, was established from the multilocus sequence type -MLST analysis, where STs 4296, 2230, 191, 155, 1276 and 3823 were identified, where ST 2230 stands out as the most identified in the isolates (30/54), in addition, all isolates with this ST showed some resistance or virulence profile. The results reinforce the need for active surveillance and specific microbiological parameters

for monitoring mobile dialysis procedures in order to avoid risk to the health of hospitalized patients who may need this procedure. These data may contribute to discussions for the elaboration of specific health legislation, supporting the monitoring of hospital services by health surveillance professionals.

Key words: Mobile Dialysis; Molecular Research; Polymerase Chain Reaction; Multilocus Sequence Typing; Microbiological Quality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Total estimado de pacientes em tratamento dialítico por ano.....	19
Figura 2 - Taxa de prevalência estimada de pacientes em hemodiálise por região do Brasil.....	19
Figura 3 - Esquema do processo de hemodiálise.....	21
Figura 4 - Sistema de tratamento de água para hemodiálise nos serviços de hemodiálise convencional.....	23
Figura 5 - Placa de ágar Müeller-Hinton para teste de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	45
Figura 6 - Placa de agar egg-yolk positiva para produção de fosfolipase C	46
Figura 7 - Placas de ágar nutriente adicionado de skin milk positiva para atividade proteolítica de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	47
Gráfico 1 - Susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas.....	52
Gráfico 2 - Perfil de resistência a antimicrobianos (RA) das cepas de <i>P. aeruginosa</i>	53
Gráfico 3 - Susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>E. coli</i> isoladas.....	54
Gráfico 4 - Perfil de resistência das cepas de <i>E. coli</i>	55
Gráfico 5 - Fatores de virulência das cepas de <i>P. aeruginosa</i>	57
Gráfico 6 - Perfil de virulência das cepas de <i>P. aeruginosa</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da doença renal crônica de acordo com a taxa de filtração glomerular.....	16
Tabela 2 - Classificação proposta para Lesão Renal Aguda – RIFLE	17
Tabela 3 - Características físicas e organolépticas da água potável.....	25
Tabela 4 - Padrão de qualidade da água para hemodiálise.....	26
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da identidade de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	44
Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados para tipagem de MLST.....	48
Tabela 7 - Resistência a antimicrobianos por cepas de <i>P. aeruginosa</i> analisadas.....	52
Tabela 8 - Resistência a antimicrobianos por cepas de <i>E. coli</i> analisadas.....	54
Tabela 9 - Identificação dos STs por local e ponto de coleta.....	59
Tabela 10 - Perfis de Resistência e Virulência por ST.....	60

LISTA DE SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AAMI - *Association for the Advancement of Medical Instrumentation*

BVNC- Bactérias em estado viável, mas não cultivável

CBP - Coleção de Bactérias Patogênicas

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CPHD – Concentrado polieletrólítico para hemodiálise

DM – Diabetes Mellitus

DRC – Doença renal crônica

EUA – Estado Unidos da América

EU – Unidades de endotoxina

EUCAST - *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EMB – Ágar eosina azul de metileno

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRA – Insuficiência renal aguda

IRC – Insuficiência renal crônica

Ivisa Rio - Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e de Inspeção Agropecuária

MLST - *Multilocus sequence typing*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – Osmose reversa

PA – Presença-Ausência

PA+- Presença-Ausência Positiva

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

Pmp – pacientes por milhão

qPCR – Quantificação da Reação em Cadeia da Polimerase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RIFLE- Risk; Injury; Failure; Loss e End stage renal
SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia
SCr – Creatinina sérica
SD – Solução de diálise
SESA – Secretaria Estadual de Saúde do Paraná
SNG – Sequenciamento de nova geração
SNVS- Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SubVisa - Subsecretaria de Vigilância Sanitária do Município do Rio de Janeiro
SUS – Sistema Único de Saúde
TFG – Taxa de filtração glomerular
TRS – Terapia renal substitutiva
TSA – Ágar tripticaseína soja
TSB – Caldo tripticaseína soja
UFC – Unidade formadora de colônia
USP – Universidade de São Paulo
UTI – Unidade de terapia intensiva
VM – Vermelho de metila
VP – Voges Proskauer

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Doença renal	16
1.2	Procedimento de hemodiálise	20
1.3	Importância da água no processo de hemodiálise	22
1.4	Contaminação microbiológica	29
1.4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.5	Monitoramento da qualidade da água	32
2	RELEVÂNCIA PARA VIGILÂNCIA SANITÁRIA	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos específicos	40
4	Metodologia	41
4.1	Coleta das amostras	41
4.2	Contagem total de bactérias aeróbias	41
4.3	Pesquisa de coliformes totais	42
4.4	Isolamento e identificação fenotípica de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	42
4.5	Identificação molecular de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	433
4.6	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	44
4.7	Detecção de fatores de virulência por métodos fenotípicos	45
4.7.1	Detecção de hemolisina	45
4.7.2	Detecção de fosfolipase	45
4.7.3	Detecção de gelatinase	46
4.7.4	Detecção de atividade de DNase	46
4.7.5	Atividade proteolítica	47
4.8	Relação clonal por MLST	47
5	RESULTADOS	50
5.1	Contagem total de bactérias aeróbias e pesquisa de coliformes totais	50
5.2	Identificação bioquímica de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i>	50

5.3	Confirmação molecular da identidade dos isolados.....	50
5.4	Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	51
5.5	Detecção do Fatores de virulência	56
5.6	Sequenciamento dos isolados <i>P. aeruginosa</i>	59
5.7	Correlação dos perfis de resistência e virulência das cepas de <i>P. aeruginosa</i> com os STs identificados.....	60
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE 1 - ESQUEMA DO ENSAIO PARA CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS.....	77
	APÊNDICE 2 - ESQUEMA DA METODOLOGIA DO ENSAIO DE PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS.....	78
	APÊNDICE 3 - TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>P. AERUGINOSA</i>	79
	APÊNDICE 4 - TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. COLI</i>	80
	APÊNDICE 5 - RESULTADOS CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS	81
	APÊNDICE 6 - IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR PONTO DE COLETA..	83
	APÊNDICE 7 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	85
	APÊNDICE 8 – PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE <i>E. COLI</i>	86
	APÊNDICE 9 – RESULTADOS DOS TESTES DE VIRULÊNCIA POR CEPAS POSITIVAS	87
	APÊNDICE 10 – PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> .	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida classicamente como anormalidades da estrutura ou função dos rins, presentes por mais de três meses e com implicações para a saúde (International Society of Nephrology, 2013). Pode ser classificada em cinco estágios (Tabela 1), de acordo com o grau de redução da filtração glomerular (Draibe, S.A. 2014).

Tabela 1 - Classificação da doença renal crônica de acordo com a taxa de filtração glomerular

ESTÁGIO DA DRC (COM LESÃO RENAL PRESENTE)	TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR (ML/MIN)	CONDIÇÃO
1	≥90	Normal/elevada
2	60-89	Discreta redução
3 ^a	45-59	Discreta/moderada
3 ^b	30-44	Moderada/Severa
4	15-29	Insuficiência renal
5	<15	Diálise ou transplante

Fonte: Adaptado de Draibe (2014).

Nos últimos anos, a DRC vem sendo diagnosticada de forma crescente em todos os países, sendo atualmente considerada uma doença epidêmica, o que justifica o incentivo a políticas de prevenção e ações de saúde pública para seu controle. Relaciona-se a altas taxas de mortalidade na população mundial, porém com proporção subnotificada devido a sua correlação com outras doenças crônicas como hipertensão arterial sistêmica (HAS) e Diabetes mellitus (DM) que em sua maioria são classificadas como a causa *mortis* (Draibe, 2014; SBN, 2019)

A injúria ou Insuficiência renal aguda (IRA) é caracterizada por uma rápida queda do ritmo de filtração glomerular, podendo ser acompanhada de retenção de produtos nitrogenados e distúrbios hidroeletrólíticos. É uma síndrome complexa e de etiologias

múltiplas e variáveis, onde o paciente apresenta distúrbios no controle da pressão arterial e prejuízo na produção renal de hormônios, além de resistência à insulina e catabolismo proteico que age diretamente sobre o estado imunológico do paciente. É uma das mais importantes complicações observadas em pacientes que estão hospitalizados, com alta incidência de acordo com o quadro dos pacientes e altas taxas de mortalidade (Ponce *et al.*, 2011; Mello, 2017).

Para classificação da doença é utilizado, desde 2004, o sistema RIFLE, do inglês Risk (risco de disfunção renal); *Injury* (injúria/lesão para o rim); *Failure* (falência da função renal); *Loss* (perda da função renal) e End stage renal disease, desenvolvido pelo grupo de nefrologistas do *Acute Dialysis Quality Initiative* que publicou essa classificação buscando uniformizar a definição da IRA (Tabela 2) (Wahrhaftig; Correia; Souza, 2012).

Tabela 2 - Classificação proposta para Lesão Renal Aguda – RIFLE

Classificação RIFLE	Critério TFG	Critério débito urinário
Risco (Risk)	Aumento SCr x1,5 ou diminuição da TFG > 25%	Diurese < 0,5 ml/Kq/h em 6h
Injúria (Injury)	Aumento SCr x2 ou diminuição da TFG > 50%	Diurese < 0,5 ml/Kq/h em 12h
Falência (Failure)	Aumento SCr x3 ou diminuição da TFG > 75% ou SCr > 4 mg/dl	Diurese < 0,3 ml/Kq/h em 24h ou anúria por 24h
Perda de função renal (Loss)	Perda completa da função renal por > 4 semanas	
Estágio final de doença renal (End – stage kidney disease)	Necessidade de diálise por > 3 meses	

RIFLE: Risk, Injury, Failure, Loss, End; TFG: Taxa de Filtração Glomerular; SCr: Creatinina Sérica.
Fonte: Adaptado de Wahrhaftig; Correia; Souza (2012).

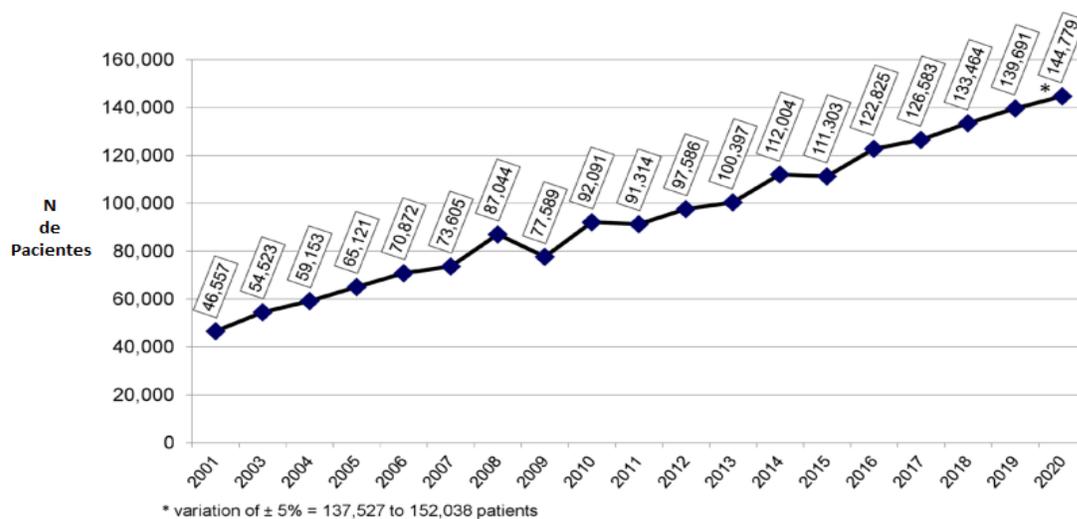
Os casos de IRA podem se desenvolver em indivíduos saudáveis após algum comprometimento sistêmico do organismo, principalmente pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). Nesses casos, há uma alta incidência de mortalidade em pacientes submetidos a diálise móvel (Sivieiro *et al.*, 2014; SBN, 2019).

No mundo, estima-se que atualmente 850 milhões de pessoas sejam acometidas pela doença renal, decorrente de várias causas. A IRA pode levar ao quadro de doença renal crônica, afeta atualmente, mais de 13 milhões de pessoas no mundo, sendo que 85% desses casos ocorrem em países de baixa e média renda e cerca de 1,7 milhões morrem anualmente no mundo. Já a DRC causa pelo menos 2,4 milhões de mortes por ano, com uma taxa crescente de mortalidade (SBN, 2019).

Uma revisão sistemática realizada com o objetivo de identificar a epidemiologia de IRA em escala mundial entre 2010-2015 mostrou que sua frequência é elevada, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, onde as causas mais comuns foram sepse e choque e a mortalidade em pacientes em UTI se mostrou maior em países desenvolvidos (Mello, 2017). No entanto, segundo Draibe (2014) os índices de mortalidade por IRA tendem a ser subnotificados, o que pode explicar a maior taxa nos países desenvolvidos.

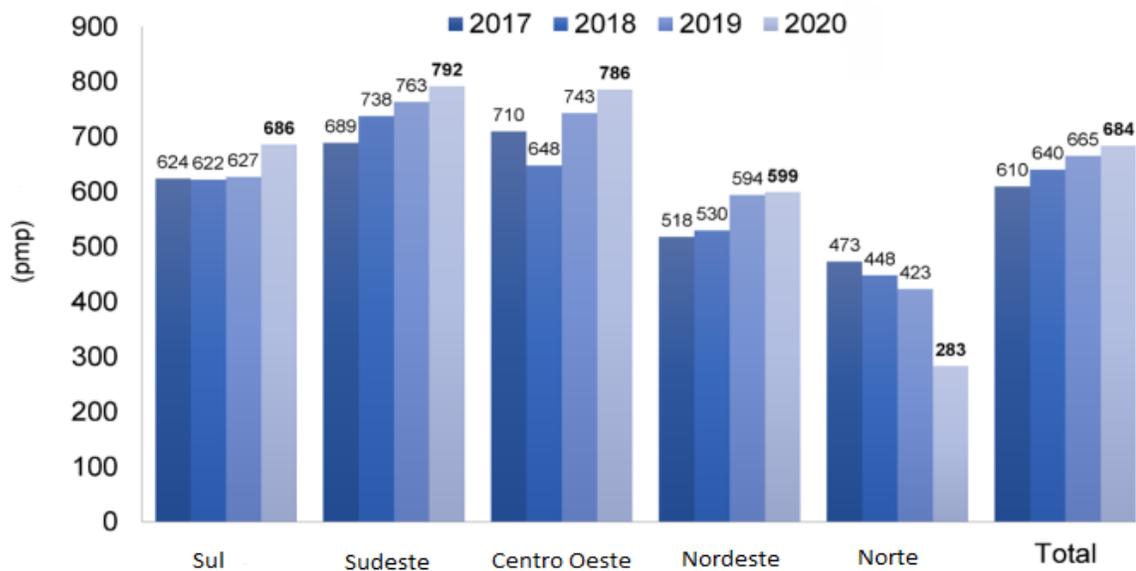
No Brasil, censos realizados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) apontam aumento gradativo do número de pacientes renais crônicos ao longo dos anos (Figura 1). Em 2020, o total estimado de pacientes em tratamento dialítico foi de 144.779, dos quais 44.264 iniciaram o tratamento no ano de 2020, distribuídos em 834 Serviços de Diálise em atividade no país. A taxa de prevalência estimada de pacientes em diálise crônica em 2020 foi de 684 pacientes por milhão de habitantes (pmp), com aumento considerável ao longo dos anos (Figura 2) (Nerbass *et al.*, 2022).

Figura 1 - Total estimado de pacientes em tratamento dialítico por ano



Fonte: Adaptado de NERBASS *et al.* (2022) (Pesquisa Brasileira de Diálise 2020).

Figura 2 - Taxa de prevalência estimada de pacientes em hemodiálise por região do Brasil



Fonte: Adaptado de NERBASS *et al.* (2022) (Pesquisa Brasileira de Diálise 2020).

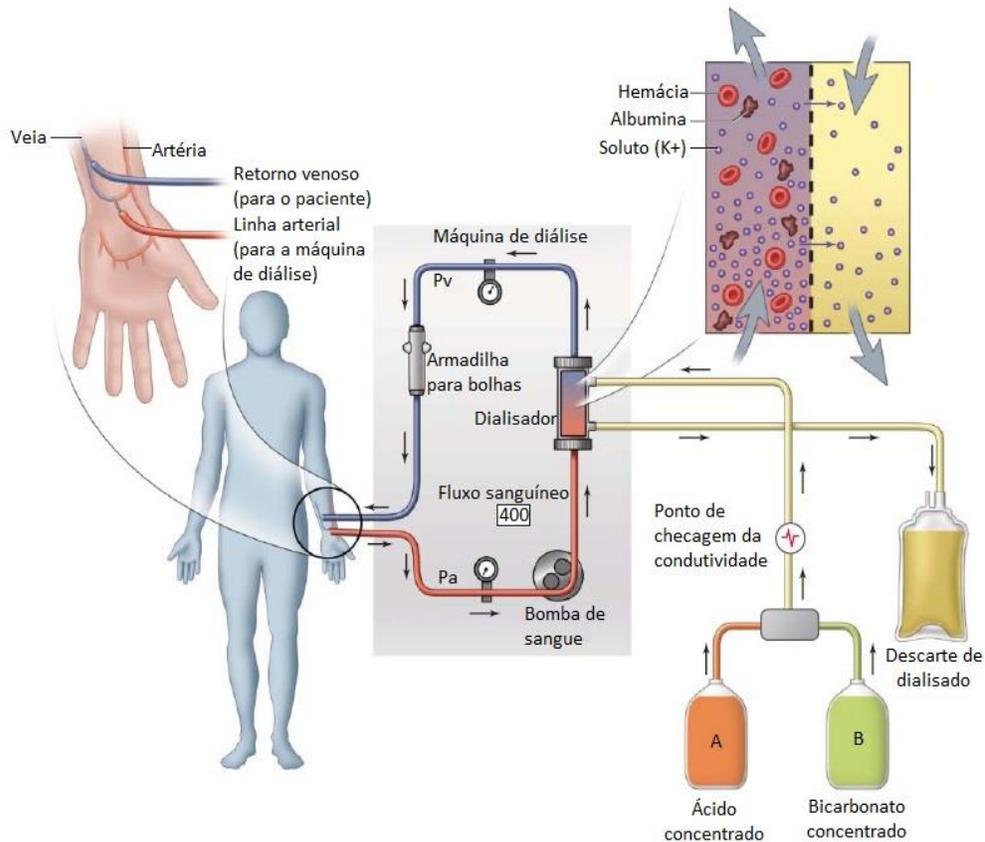
1.2 Procedimento de hemodiálise

A hemodiálise ou terapia renal substitutiva é um tratamento primordial para pacientes com DRC ou IRA, que ocorre quando os rins são incapazes de remover os resíduos provenientes do metabolismo celular ou de realizar as suas funções reguladoras. O aumento no número de casos da doença e dificuldade de obtenção de transplante renal torna este tratamento crucial para a sobrevivência destes pacientes (Sousa *et al.*, 2013; Sivieiro, 2014).

O primeiro procedimento de diálise realizado com sucesso ocorreu no ano de 1945, por Wilhem Kolf, na Holanda, no qual o paciente decorreu com uma sobrevivência de 6 anos, já no Brasil, o tratamento de hemodiálise iniciou em 1949, no Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo (USP), onde uma paciente com Insuficiência renal crônica (IRC) passou pelo processo de hemodiálise garantindo assim uma maior sobrevivência. A partir deste marco, iniciou-se o desenvolvimento dessa técnica no país, com tecnologias que vêm se desenvolvendo até os dias atuais (Kolff, 1945; Almeida, 1949 apud Lugon, Strogoff, Warrak, 2003; Awak, 2017).

No processo de hemodiálise a máquina realiza a função dos rins que se encontram debilitados. A máquina recebe o sangue por um acesso vascular, que pode ser um cateter (tubo) ou uma fístula arteriovenosa, que garantem maior ejeção de fluxo, em seguida é impulsionado por uma bomba até o filtro de diálise (dialisador) onde o sangue é exposto à solução de diálise (dialisato) em fluxo contra paralelo através de uma membrana semipermeável que remove o líquido e as toxinas em excesso por difusão, e devolve o sangue depurado para o paciente pelo acesso vascular venoso, o esquema do processo é apresentado na figura 3 (SBN, 2018). Um paciente em tratamento dialítico realiza de 3 a 4 sessões por semana que tem duração aproximada de 4 horas (Vasconcelos, 2012; Junior, 2015; Jesus *et al.*, 2021).

Figura 3 - Esquema do processo de hemodiálise



Fonte: www.medicinanet.com.br (2022).

Além da remoção de substâncias tóxicas e do excesso de líquido acumulado no sangue/tecidos do corpo, em consequência da falência renal, este tratamento promove também a restauração dos eletrólitos e do equilíbrio ácido-base sanguíneo (Vasconcelos PDS, 2012; Junior, 2015).

Com a maior ocorrência de pacientes renais ao longo dos anos e, principalmente, a ocorrência de IRA em pacientes internados em UTIs, os procedimentos de hemodiálise que antes eram realizados apenas nos centros de diálise, começaram a ser realizados num sistema denominado diálise móvel ou a beira do leito, podendo ser realizados nas enfermarias e nas residências dos pacientes.

O procedimento de diálise móvel ou diálise à beira do leito é definido como o procedimento realizado em ambiente intra-hospitalar, para pacientes com diagnóstico de insuficiência renal aguda e indicação médica de tratamento dialítico, ou paciente

com insuficiência renal crônica e necessidade de seguimento do tratamento dialítico durante o período de internação. Em ambos os casos, os pacientes não possuem condições clínicas para remoção ou transporte até os serviços de diálise (SESA, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define este procedimento como serviços de hemodiálise móveis destinados ao atendimento em ambiente intra-hospitalar por curto período, limitados à recuperação de função renal ou alta hospitalar e imediata transferência para programa de assistência crônica em serviços de diálise (Brasil, 2009).

Estas definições não compreendem os procedimentos realizados na residência dos pacientes. O procedimento de diálise móvel ocorre da mesma maneira que a diálise convencional realizada nos centros de hemodiálise, a principal diferença está no tratamento dispensado à água utilizada durante o processo.

1.3 Importância da água no processo de hemodiálise

Até a década de 70 se acreditou que a água potável poderia ser utilizada para os procedimentos de hemodiálise, visto que era própria para o consumo. No entanto, com o advento da hemodiálise houve também o aumento de casos de contaminação e a correlação destes casos com contaminantes presentes na água (Jesus; Almeida, 2016). Além de intercorrências clínicas, como náuseas, vômitos e tonteados, após as sessões de hemodiálise denominadas como “síndrome da água dura”, fenômeno ocasionado pela intoxicação dos pacientes com compostos como alumínio, flúor e cloro, comumente adicionados no tratamento da água potável (Coitinho *et al.*, 2015).

Estanho, arsênio e estrôncio podem estar presentes na água de abastecimento e causar complicações nos pacientes em hemodiálise por acúmulo tecidual (Neto; D’ávila, 2020). Em Minas Gerais no ano de 2000, 16 pacientes sob terapia de hemodiálise apresentaram reações hemolíticas compatíveis a sintomas de intoxicação por cloro e cloramina em água. Os sintomas apresentados foram dor torácica, dor lombar, dor abdominal, diarreia, hemólise, coagulação no capilar, calor e rubor, alguns destes ocorrendo simultaneamente em alguns pacientes. Após análise e avaliação das

dosagens de cloro percebeu-se que no período em que os pacientes apresentaram sintomas a dosagem de cloro estava acima do permitido pela legislação, o que causou essas intoxicações (Calderaro; Heller, 2001).

Nos serviços de hemodiálise convencional o tratamento da água (Figura 4) é realizado de forma rigorosa, com presença de filtros de areia e carvão, além da osmose reversa, com o objetivo de eliminar partículas tóxicas e possíveis microrganismos presentes na água e manter concentrações controladas de metais como alumínio, flúor, mercúrio, cobre, entre outros e, de substâncias contaminantes como endotoxinas bacterianas (Brasil, 2014; Farmacopeia, 2019).

Figura 4 - Sistema de tratamento de água para hemodiálise nos serviços de hemodiálise convencional



Fonte: Adaptado de <https://www.dialitec.com>.

A água de distribuição (entrada da rede) passa por um pré-tratamento, composto por filtros de areia, carvão ativado e resina de troca iônica ou abrandador, importantes

para a remoção de partículas em suspensão, cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas, além de eliminar odores presentes na água. Nos abrandadores, ocorre a remoção de metais como cálcio, magnésio e outros cátions polivalentes, o que é de suma importância não só por controlar a dureza da água, mas também por proteger as membranas do sistema de osmose reversa. Após isso, essa água pré-tratada atravessa as membranas do sistema de osmose reversa que garante retenção de contaminantes químicos na faixa de 95 a 99% e retém grande parte das bactérias, fungos, algas e vírus, além de reter pirogênios e materiais proteicos de alto peso molecular. Após o tratamento a água segue para um tanque hermeticamente fechado que possui fundo cônico, sendo posteriormente distribuída para as máquinas de hemodiálise em sistema fechado de canalização sem zonas mortas e com intensa movimentação para evitar a proliferação bacteriana e formação de biofilmes (Andrade, 2016).

Na diálise móvel utiliza-se a água potável distribuída ao hospital, onde a purificação é realizada por uma máquina de osmose reversa portátil, sendo assim um tratamento menos rigoroso comparado com aquele realizado nos serviços de hemodiálise e em contrapartida um maior risco de contaminação devido a maior gravidade dos pacientes internados. Durante uma sessão de tratamento por hemodiálise, são utilizados aproximadamente 120L de água purificada misturados em proporções adequadas ao concentrado polieletrólítico (CPHD) para obtenção da solução de diálise, utilizada na depuração do sangue. Por isso a importância da qualidade da água é fundamental para se evitar riscos adicionais à saúde do paciente (Neto; D'Avila, 2020).

O CPHD é produzido comercialmente, não é uma solução estéril, porém possui sua composição e qualidade controladas de forma industrial. O fato de não ser uma solução estéril pode condicionar o CPHD a uma possível fonte de contaminação do processo sendo necessário um olhar específico para a qualidade deste componente do processo. O monitoramento da qualidade do CPHD é regulamentado pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) ANVISA nº 8/2001 que aprova o regulamento técnico das boas práticas de fabricação do CPHD (ANVISA, 2001).

A garantia da qualidade da água se faz necessária para a efetividade do processo dialítico. Mundialmente, as normas para monitoramento da água tratada para hemodiálise são as sugeridas pela *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI) e as seguidas pela Comunidade Européia (Andrade, 2016).

No Brasil, os serviços de hemodiálise são monitorados pela RDC nº 11 de 13 de março 2014 que vai dispor sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise. Nesta RDC além das informações a cerca dos procedimentos necessários a terapia de hemodiálise, são apresentadas as características físicas e organolépticas desejáveis da água potável (Tabela 3) a ser utilizada e o padrão de qualidade que a água deve possuir para estar apta a ser utilizada na hemodiálise (Tabela 4) (Brasil, 2014). No entanto, os parâmetros apresentados relacionam-se a água que passa pelo sistema de tratamento dos serviços de hemodiálise como apresentado na figura 4, não contemplando a água utilizada na dialise móvel.

A água de entrada da rede é monitorada pela Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021, que traz como parâmetros ausência de *Escherichia coli* e Coliformes totais em 100 ml de água, além dos parâmetros de metais e características organolépticas da água de abastecimento (Brasil, 2021).

Tabela 3 - Características físicas e organolépticas da água potável

Característica	Parâmetro aceitável	Frequência de verificação
Cor aparente	Incolor	Diária
Turvação	Ausente	Diária
Sabor	Insípido	Diária
Odor	Inodoro	Diária
Cloro residual livre	Água da rede pública: maior que 0,2 mg/L; água de fonte alternativa: maior que 0,5 mg/L	Diária
pH	6,0 a 9,5	Diária

Fonte: Adaptado de Brasil (2014).

Tabela 4 - Padrão de qualidade da água para hemodiálise

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de análise
Coliforme total	Ausência em 100ml	Mensal
Contagem de bactérias heterotróficas	100 UFC/ml	Mensal
Endotoxinas	0,25 EU/ml	Mensal
Alumínio	0,01 mg/L	Semestral
Antimônio	0,006 mg/L	Semestral
Arsênio	0,005 mg/L	Semestral
Bário	0,1 mg/L	Semestral
Berílio	0,0004 mg/L	Semestral
Cádmio	0,001 mg/L	Semestral
Cálcio	2 mg/L	Semestral
Chumbo	0,005 mg/L	Semestral
Cloro total	0,1 mg/L	Semestral
Cobre	0,1 mg/L	Semestral
Cromo	0,014 mg/L	Semestral
Fluoreto	0,2 mg/L	Semestral
Magnésio	4 mg/L	Semestral
Merúrio	0,0002 mg/L	Semestral
Nitrato (N)	2 mg/L	Semestral
Potássio	8 mg/L	Semestral
Prata	0,005 mg/L	Semestral
Selênio	0,09 mg/L	Semestral
Sódio	70 mg/L	Semestral
Sulfato	100 mg/L	Semestral
Tálio	0,002 mg/L	Semestral
Zinco	0,1 mg/L	Semestral

Fonte: Adaptado de Brasil (2014).

A avaliação microbiológica da água tratada teve sua importância quando estudos demonstraram que os altos níveis de bactérias no dialisato eram responsáveis pela ocorrência de reações pirogênicas e bacteremia (Neto, D'Avila, 2020).

Os relatos de surtos em clínicas de hemodiálise relacionam-se tanto à presença de contaminantes químicos quanto microbiológicos em águas para hemodiálise.

Relatos de convulsões devido à presença acima do limite de alumínio na solução de diálise, anemia hemolítica devido a presença do cloro na água durante a terapia de hemodiálise e respostas biológicas a presença de fluoreto em excesso, compostos que em geral são utilizados no tratamento da água e por isso a necessidade de uma purificação desta água antes do processo de diálise (Andrade, 2016).

Na avaliação de eventos adversos, uma análise de 526 notificações de incidentes ocorridos em hemodiálise na Pensilvânia, Estados Unidos (EUA), apontou que erros de medicação foram os mais prevalentes (28,5%), seguido de falha em seguir o protocolo (12,9%), erros de laboratório ou banco de sangue (9,9%), complicação de procedimento (8,6%), desconexão da agulha (6,1%), infiltração da punção (6,1%), quedas (5,9%), falha de equipamentos (4,8%), coagulação do sistema extracorpóreo (4,4%), eventos pós-hemodiálise (3,8%), úlcera por pressão (3,8%), lesão de pele (1,9%) e outros (3,3%) (Sousa *et al.*, 2016).

Além disso, estudos demonstraram que, endotoxinas provenientes de bactérias Gram-negativas podem penetrar na membrana semipermeável do dialisador e entrar em contato com o sangue, sendo responsáveis pelas reações pirogênicas em pacientes em hemodiálise (Jorgensen; Pfaller, 2015). A concentração de endotoxinas e bactérias no dialisato é altamente relacionada à presença de sintomas típicos de reações pirogênicas (endotoxemias), que variam de febre, calafrios, cefaléia, mal-estar, mialgias, náuseas e bocejos nos pacientes em tratamento dialítico. Altas concentrações de endotoxinas no sangue ou líquido cérebro-espinhal podem ser fatais devido às complicações que se desenvolvem no organismo humano (Coitinho *et al.*, 2015).

No Brasil, o caso mais emblemático de contaminação ocorreu em Caruaru no ano de 1996, onde, 123 pacientes renais crônicos, após a hemodiálise, apresentaram um quadro clínico de hepatotoxicidade, não correlacionado com fatores usualmente tidos como causadores deste tipo de intoxicação. Este quadro foi denominado como “Síndrome de Caruaru”, destes 71 vieram a óbito até cinco meses após o início dos sintomas, em 1997 (Coelho, 1998). Os óbitos foram devido à intoxicação por microcistina, toxina sintetizada pelas cianobactérias, presentes na água usada pela clínica no processo de diálise obtidos de carros pipas abastecidos na barragem de

Tabocas–PE (Simões *et al.*, 2005). A ocorrência desta tragédia marcou um avanço no monitoramento e controle da água utilizada na hemodiálise em todo o país, porém a ocorrência de contaminação ainda é um problema recorrente nos dias atuais (Câmara Neto, 2009).

Em 1996, após um surto de bacteremia em um Centro de Hemodiálise de Campinas, amostras de água e de dialisadores foram analisados, assim como foram realizadas as hemoculturas dos pacientes com bacteremia. Nos resultados 80% das amostras foram positivas para *Pseudomonas*, além do isolamento de *Burkholderia cepacia*. Apenas uma cepa de *P. aeruginosa* de água pertencia ao mesmo sorotipo e picinotipo daqueles obtidos dos pacientes, o que sugere que a água e/ou o sistema foi um veículo de contaminação microbiana (Pisani *et al.*, 2000).

Em seu estudo, Bugno (2007) verificou a ocorrência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose em 29,6% das amostras de dialisatos e em 49,5% das amostras de água tratada, provenientes de 97 amostras de água tratada para diálise e 27 amostras de dialisatos entre junho de 2005 e dezembro de 2006. Foram isoladas e identificadas nove sendo a mais freqüente o complexo *Burkholderia cepacia* (59,0%), seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* (13,1%) (Bugno *et al.*, 2007).

Surtos de contaminação ainda são frequentes, o que ressalta a importância do monitoramento da qualidade da água. No ano de 2016, 35 pacientes passaram mal após realizar o procedimento de hemodiálise e um paciente veio a óbito. Investigações mostraram que a contaminação estaria relacionada ao processo de desinfecção realizado no dia anterior, porém muitos pacientes apresentaram contaminação por *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*, microrganismos oportunistas e resistentes a antibióticos comuns (Martins, 2016).

Contaminações microbianas são cada vez menos frequentes devido aos avanços e tecnologias associadas ao tratamento da água utilizado no processo de hemodiálise, as ocorrências associam-se mais a infecção dos acessos (Deus *et al.*, 2015). No entanto como na diálise móvel ainda não há um tratamento específico, esse monitoramento ainda tem grande importância.

1.4 Contaminação microbiológica

No processo de hemodiálise, o sangue do paciente e a solução de diálise são separados apenas por uma membrana semipermeável do dialisador, logo a qualidade microbiológica deste fluido é extremamente importante. A presença de microorganismos na água pode liberar endotoxinas e seus fragmentos, que devido ao seu tamanho, podem passar através da membrana de diálise (SBPC, 2015). A infecção pelo acesso vascular é a causa mais comum de infecções em pacientes em hemodiálise devido a cuidados inadequados do cateter. No entanto, além de reações inflamatórias geradas pela presença dos produtos bacterianos, existe também a possibilidade de ocorrência de bacteremia, que é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes de hemodiálise (Deus *et al.*, 2015).

Alguns estudos observaram uma relação direta entre a ocorrência de casos de bacteremia causadas por bactérias isoladas 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 (Jesus; Almeida, 2016). Nos EUA, cerca de 75.000 pessoas recebem hemodiálise através de uma linha central que apresenta maior risco de infecção do que uma fístula ou enxerto. O CDC estima que 37 mil infecções sanguíneas associadas à linha central podem ter ocorrido em pacientes com hemodiálise nos EUA em 2008 (Hart, 2018).

As membranas do dialisador quando intactas devem impedir a passagem de bactérias a partir do fluido de diálise para a corrente sanguínea do paciente. No entanto defeitos na integridade da membrana, ocasionadas pela reutilização da mesma, ou pelo alto nível de contaminação no dialisato permitindo o crescimento dos microrganismos através da membrana ou ainda nos casos de contaminação extrínseca durante o reprocessamento do dialisador, podem ocasionar essa migração dos microrganismos para a corrente sanguínea do paciente (Andrade, 2016).

A água purificada pode conter bactérias heterotróficas Gram-negativas, como espécies da classe *Pseudomonadales*, que podem colonizar circuitos de água e máquinas de hemodiálise, e subseqüentemente contaminar o dialisato (Bommer; Jaber,

2006). Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* são altamente prevalentes em ambientes úmidos e capazes de sobreviver na água por um longo período, mesmo sem nutrientes, são potenciais causadoras de infecções hospitalares e de reconhecida resistência intrínseca a antibióticos, com perfil ascendente de resistência tanto a tratamento medicamentoso quanto a estratégias de desinfecção de ambientes e superfícies (Ferreira *et al.*, 2006; Jesus, 2021). Já foram descritos diversos casos de surtos bacterianos, onde as espécies mais encontradas nas amostras de água e dialisato contaminados, pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* (Bugno *et al.*, 2007).

Em uma investigação de contaminação microbiológica da água tratada de nove centros de hemodiálise no Japão, 42,5% apresentaram uma contagem bacteriana superior a 2000 UFC / ml com isolamento e identificação de *Ralstonia pickettii* (27.8%) seguida de *Pseudomonas aeruginosa* (20%). No dialisato presença de *Pasteurella multocida*, *Brevundimonas diminuta* e *Sphingomonas paucimobilis* (Oie *et al.*, 2003).

Em 2014 foram coletadas amostras de água de quatro pontos de coleta em 12 centros de hemodiálise na cidade de Goiânia para serem analisadas, apresentando em um total de 96 amostras, 7,3 % com contaminação por coliformes totais, 1,1 % por coliformes termotolerantes, 18,7 % por bactérias heterotróficas e 10,4 % por *P. aeruginosa*, estando está presente em 6 dos centros de hemodiálise avaliados (Souza, 2015).

A presença de *Escherichia coli* na água utilizada nos processos de hemodiálise é um marcador de falhas no sistema de tratamento e distribuição, pois indica contaminação de origem fecal e, portanto, demonstra que a água está em condições sanitárias insatisfatórias ocasionando risco à saúde humana. As legislações vigentes que tratam da água para hemodiálise preconizam a ausência deste patógeno na alíquota a ser analisada (Glorieux *et al.*, 2012; Brasil, 2014).

Em um monitoramento realizado em 85 centros de hemodiálise localizados na Grécia foram realizadas análises microbiológicas em 255 amostras de água. Foram isoladas e identificadas 141 bactérias Gram-negativas, sendo obtidas da água da

torneira (n=24), água tratada (n= 31) e do dialisato (n= 86). Os isolados mais frequentes foram *P. aeruginosa* (22,7%), *Chryseobacterium meningosepticum* (14,9%), *Stenotrophomonas maltophilia* (13,5%), *Escherichia coli* (12,8%) e *Enterobacter cloacae* (8%). Destes isolados, 19% apresentavam resistência a três ou a mais dos nove antibióticos aos quais foram testados (Arvanitidou *et al.*, 2003).

1.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A família das Pseudomonadaceae compreende o gênero *Pseudomonas* um grupo de patógenos considerado oportunista devido a sua facilidade de colonização em diferentes hospedeiros e ambientes. Encontrada na microbiota normal de plantas, animais e pele humana, dessa forma é difícil apresentar infecções em indivíduos saudáveis. Muito comum em infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos, portadores de fibrose cística e endocardites (Wider, 2020).

Se caracterizam como bacilos Gram negativos, móveis devido a presença de flagelos, não formadores de esporos. Seus mecanismos de resistência relacionam-se a capacidade de produção de biofilme, carrear plasmídeos e genes de resistência e presença de Lipopolissacarídeos (LPS) em sua membrana externa. Produz pigmentos fluorescentes como a piocianina e confere odor característico em suas culturas. (Pessoa, 2013).

Os estudos que analisam a qualidade microbiológica de amostras de água comumente apresentam isolamento de cepas de *P. aeruginosa*, principalmente quando as amostras são de águas usadas em tratamento de hemodiálise, objeto deste estudo, o que torna evidente a necessidade de monitoramento microbiológico com pesquisa deste patógeno, que por seu potencial oportunista pode vir a desencadear infecções aos pacientes submetidos a hemodiálise quando não é realizada a correta desinfecção de cateteres ou em caso de danos a membrana do dialisador acarretando a passagem de bactérias presentes na água ou no circuito do tratamento (Mozena, L.B., 2016; Souza, B.G.A., 2015) .

1.5 Monitoramento da qualidade da água

Nos Estados Unidos o monitoramento dos serviços de hemodiálise é realizado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). No entanto, o controle de qualidade da água utilizada é menos rigoroso daquele realizado no Brasil (AAMI, 2004). Em relação à dialise móvel, diversos estudos vêm buscando desenvolver procedimentos cada vez mais práticos e menos custosos ao sistema de saúde (Awak, 2017).

No ano de 1989, foi publicado um manual de tratamento em água de diálise, pelo FDA, que relacionava os sintomas comumente apresentados nos pacientes com as possíveis causas de contaminação da água, os principais foram: anemia devido contato com alumínio, cloramina, cobre e zinco; doença óssea devido contato com alumínio e flúor; hemólise por contato com cobre, nitratos e cloraminas; hipertensão, devido contato com cálcio e sódio; hipotensão, pela presença de bactérias, endotoxinas e nitratos; degeneração neurológica, por contato com alumínio; náusea e vômito, devido contato com bactérias, cálcio, cobre, endotoxinas, baixo pH, magnésio, nitratos, sulfatos e zinco; morte, devido altas concentrações de alumínio, flúor, endotoxinas, bactérias e cloraminas (Simões; Pires, 2004).

No Brasil, os serviços de fiscalização sanitária realizam inspeções anuais nas unidades de terapia renal, a fim de garantir a qualidade do serviço prestado a população (Jesus *et al.*, 2021). No entanto, esta prática ainda não se aplica a todos os serviços de dialise móvel, o que dificulta a realização de um monitoramento que possibilite a avaliação da real situação destes serviços em nível de risco versus contaminação microbiológica.

Pacientes com uremia, que necessitam de hemodiálise para manter suas atividades normais de vida tem contato com mais de 400 litros de água por semana, o que é quase 30 vezes a quantidade de água utilizada por pessoas saudáveis (Chen *et al.*, 2017). A necessidade da água no processo dialítico justifica a importância de um monitoramento rigoroso na água de diálise, especialmente suas características

microbiológicas, principalmente devido aos relatos de complicações agudas ou crônicas relacionadas por contaminação microbiana (Bommer; Jaber, 2006; CHen *et al.*, 2017).

O Brasil não possui uma legislação específica para os serviços de diálise móvel e utiliza os parâmetros da diálise convencional, onde os limites microbiológicos da água tratada para hemodiálise convencional são ausência de *Escherichia coli* em 100 ml e contagem de bactérias heterotróficas menor que 100 unidades formadoras de colônia (UFC)/ml e quantificação de endotoxinas igual ou menor que 0,25 unidades de endotoxina (EU)/ml (Brasil, 2014). Já a água no ponto de entrada da rede do hospital estabelece ausência de *Escherichia coli* e de coliformes totais em 100 ml de água e contagem de bactérias heterotrófica menor que 500 UFC/ml (Brasil, 2017).

Os parâmetros estabelecidos na legislação vigente só incluem bactérias cultiváveis, não considerando as bactérias viáveis totais das amostras, como as chamadas bactérias em estado viável, mas não cultivável (BVNC), evidenciadas em água de torneira ou ambientes oligotróficos semelhantes (Chen *et al.*, 2017). Desta forma, a ocorrência dessas bactérias nas amostras resultará em um número subestimado do total de bactérias viáveis, o que representa uma ameaça à saúde do paciente.

Desde a década de 1980, métodos moleculares para estudar a diversidade de microrganismos em águas ambientais têm gerado abundante informação sobre a composição das comunidades microbianas sem a necessidade de cultura prévia em laboratório. O desenvolvimento de técnicas moleculares robustas e sensíveis como a amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA total na amostra, e sequenciamento, tem permitido análise de comunidades complexas (Snustad; Simons, 2008).

Sequências de DNA que codificam a subunidade RNA ribossomal 16S (rRNA) é um dos alvos mais utilizados em estudos taxonômicos ambientais, incluindo regiões altamente conservadas e regiões mais variáveis, permitindo assim a identificação de bactérias até o nível de espécies e o estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies e ou gêneros. Além disso, esse gene compõe um dos maiores bancos de dados de sequências, o que possibilita análises taxonômicas altamente confiáveis. De

fato, a disseminação de métodos moleculares levou a uma explosão nos estudos de diversidade microbiana. Atualmente, o sequenciamento de nova geração (SNG) possibilita a construção de bibliotecas do gene 16S rRNA, bem como o sequenciamento massivo do metagenoma para elucidar a estrutura das comunidades microbianas (Pimentel *et al.*, 2011).

Um estudo sobre o perfil de bactérias viáveis totais em um sistema de tratamento de água de hemodiálise convencional pelo SNG demonstrou que a estrutura da comunidade microbiana era muito diferente e a diversidade foi aumentada após a etapa do filtro de carbono (Chen *et al.*, 2017). Embora a diversidade tenha sido minimizada após o tratamento por osmose reversa (OR), patógenos como *Escherichia coli* ainda foram detectados no efluente da OR, em geral, tanto a quantidade de bactérias quanto a complexidade da comunidade microbiana no sistema de tratamento de água de hemodiálise revelada pelas abordagens moleculares foram muito mais altas do que aquelas obtidas pela contagem de bactérias heterotróficas (Chen *et al.*, 2017).

Uma alternativa seria a utilização do Multilocus sequence typing - MLST para análise da variação de grupos de genes em múltiplos isolados, pois permite a identificação de grupos (“clusters”) de isolados com genótipos idênticos ou altamente relacionados, chamados de clones ou complexos clonais a partir da detecção de variações de genes constitutivos chamados “housekeeping genes”. Em estudos de genéticas de populações bacterianas o MLST permite a caracterização de múltiplos loci produzindo uma variedade de dados consistentes e análises mais robustas; geração de sequências de nucleotídeos facilmente analisadas por inúmeros programas para estudos filogenéticos e de genética de populações; alta discriminação para a tipificação bacteriana com lenta evolução por não sofrerem pressões seletivas que poderiam obscurecer possíveis relações genéticas entre diferentes isolados; e fornecimento de dados acessíveis pela internet, que podem ser analisados por bancos de dados virtuais para comparação dos perfis genéticos permitindo o monitoramento da circulação de clones epidêmicos em todo o mundo (Curran *et al.*, 2004; Sabat *et al.*, 2013) .

Considerando que na diálise móvel, a água proveniente do ponto de entrada da rede do hospital é submetida à OR, sem nenhum tratamento prévio, a avaliação mais

aprofundada da qualidade da água pós-osmose poderia minimizar os possíveis riscos aos pacientes submetidos a esse tratamento.

2 RELEVÂNCIA PARA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, conhecida como Lei Orgânica do SUS, aprova o Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como objetivo e atribuição “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas”. Nesta Lei está contida a definição de Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente à saúde. Os serviços de atenção à saúde são assim submetidos às ações de vigilância sanitária (Brasil, 1990).

Os serviços de hemodiálise buscam oferecer aos pacientes serviços com qualidade e minimização dos riscos, visto que este tratamento é primordial a manutenção da vida destes pacientes, seja numa situação crônica onde permanecem no tratamento até que seja possível um transplante renal ou nos quadros agudos, onde em geral são submetidos a diálise móvel até que a saúde renal seja restabelecida (SBN, 2019). O monitoramento da qualidade dos serviços de hemodiálise tem extrema importância para a saúde coletiva em especial aos profissionais da Vigilância Sanitária que têm dentro da saúde pública a missão de minimizar riscos.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz, componente do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária.

Em parceria com o Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e de Inspeção Agropecuária, do Município do Rio de Janeiro (Ivisa Rio) o INCQS realiza desde 1999 o monitoramento anual dos serviços de hemodiálise sendo considerado um padrão ouro para o acompanhamento dos serviços que precisam realizar o monitoramento mensal conforme orienta a RDC 11/2014, no entanto o procedimento de diálise móvel ainda se encontra num limbo legislativo o que dificulta a elaboração de estratégias eficazes de fiscalização e controle.

A partir do ano de 2015, através da Chamada CNPq/ANVISA nº 05/2014 – Pesquisa em Vigilância Sanitária, o INCQS iniciou um estudo de monitoramento de serviços de diálise a beira do leito em unidades intra-hospitalares a fim de subsidiar limites específicos para este procedimento e uma Legislação que o regularize. Este monitoramento foi realizado junto ao Ivisa Rio.

Neste monitoramento foram analisadas águas de 12 serviços de diálise a beira do leito, localizadas no Estado do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que 100% das amostras apresentaram quantificação de endotoxinas acima do preconizado na RDC 11/2014. A contagem de bactérias heterotróficas apresentou valores entre 10^3 - 10^4 UFC/ml nas 3 etapas de monitoramento, demonstrando a limitações no processo de tratamento da água, além de presença de *P. aeruginosa* e outros microrganismos. Esses dados ressaltam a importância do estabelecimento de uma legislação, contendo parâmetros específicos para esse serviço de diálise (Jesus et al, 2017).

É importante ressaltar que a presença de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* (Leclerc; Moreau, 2002; Gomila et al., 2005) *Sphingomonas* (Gomila et al., 2005) e *Aeromonas* (Leclerc; Moreau, 2002) são comumente encontradas em amostras de água de sistemas de tratamento destinadas a hemodiálise.

Especial atenção deve ser dada a *P. aeruginosa*, um patógeno oportunista presente em pacientes hospitalizados, em particular pessoas debilitadas ou imunocomprometidas. Infecções por *Pseudomonas* spp. podem se desenvolver em muitos locais anatômicos, incluindo pele, tecido subcutâneo, ossos, orelhas, olhos, trato urinário, pulmões e válvulas cardíacas, além de sua capacidade de formar biofilmes ao

longo das tubulações do sistema, possibilitando contaminações recorrentes (Reis, 2010).

A pesquisa de *P. aeruginosa* no monitoramento da água tratada para hemodiálise, já é preconizada pela Farmacopeia Americana (The United, 2017). Desta forma, seria importante sua inserção nas normativas da legislação Brasileira vigente, para o controle de qualidade da água utilizada nos serviços de diálise (Ferreira, 2009).

Em 2013, a Secretaria Estadual de Saúde do Paraná publicou a Resolução SESA Nº 437/2013, que dispõe sobre as condições para realização de terapia renal substitutiva à beira do leito, em unidades intra-hospitalares, por meio de serviços de diálise móvel. No entanto, os limites microbiológicos no controle da água para diálise, são os mesmos descritos na RDC 11/2014 (Brasil, 2014). Sendo assim, uma regulamentação, em âmbito nacional, seria de extrema relevância, uma vez que padronizaria os procedimentos e a fiscalização pela Vigilância Sanitária, garantindo maior segurança à saúde dos pacientes.

O controle de qualidade da água utilizada no processo de hemodiálise é uma preocupação de saúde pública em escala mundial e por isso é preconizada em todos os países. A Associação Renal Europeia recomenda contagem total de bactérias de 100 UFC/ml e 0,25 UE/ml como limite de quantificação para endotoxina. Já a Sociedade Japonesa para Terapia de Diálise, também recomenda <100 UFC / ml, mas apenas 0,05 EU / ml e nos Estados Unidos, o limite máximo de contagem de bactérias é <100 UFC / ml e <0.25 EU/ml em todos os pontos, exceto para a solução de diálise que o limite aumenta para <0.5 EU/ml (Coulliette; Arduino, 2013).

Nos Estados Unidos a preocupação com a ocorrência de bacteremias nos pacientes associados ao processo de hemodiálise tem estimulado políticas de melhoria de processos com uso de dialisato ultrapuro, onde o controle da água é feito por ultrassom e os limites preconizados são <0.1 UFC/ml para contagem de bactérias. No entanto, o uso deste sistema ainda não é obrigatório, embora muitos estudos tenham comprovado sua eficácia na diminuição da bacteremia e na melhora do estado geral dos pacientes (Coulliette; Arduino, 2013; Arizono *et al.*, 2004; Schiffli *et al.*, 2001; Glorieux *et al.*, 2012).

Em função desta problemática, é de grande relevância a implementação de metodologias acuradas e capazes de fornecer resultados robustos, em relação à composição da microbiota e da caracterização de contaminantes bacterianos, muitas vezes não detectados pela metodologia convencional. Desta forma, reduzir riscos e garantir o sucesso no tratamento dispensado aos portadores de insuficiência renal.

Os resultados obtidos poderão revelar dados ainda não divulgados no Brasil em relação à qualidade microbiológica da água para hemodiálise. Desta forma, contribuir para o aprimoramento das ações da vigilância sanitária no que caracteriza sua extrema relevância para a Saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica de águas utilizadas em diálise móvel, utilizando abordagem microbiológica e genômica, em hospitais do município Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a presença/ausência de coliformes totais e quantificar o número total de bactérias aeróbias;
- Pesquisar e Identificar isolados de *P. aeruginosa* pelas metodologias convencional e molecular;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e estabelecer o perfil gênico de resistência;
- Detectar fatores de virulência através de métodos fenotípicos;
- Determinar o perfil clonal dos isolados de *P. aeruginosa*;

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras

Foram coletadas 24 amostras de água em 11 unidades hospitalares com serviço de diálise móvel localizadas no Município do Rio de Janeiro no ano de 2019 seguindo o cronograma de inspeções das unidades hospitalares com serviço de dialise móvel em colaboração com a Subsecretaria de Vigilância Sanitária do Município do Rio de Janeiro (SubVisa). As amostras foram coletadas em frascos de vidro estéreis com capacidade de 500 ml preparados previamente no INCQS. A coleta foi realizada, quando possível, nos três pontos nos serviços de diálise móvel: pré-osmose, pós-osmose e solução de diálise.

As amostras foram analisadas conforme preconizado na Portaria de Consolidação nº 5, Ministério da Saúde (Brasil, 2017) e na RDC ANVISA nº 11 de 13 de março 2014, (Brasil, 2014), onde os valores de contagem de bactérias acima de 500 UFC/ml para as amostras pré-osmose, 100 UFC/ml para pós osmose e de 200 UFC/ml para solução de diálise são consideradas insatisfatórias.

4.2 Contagem total de bactérias aeróbias

Foi utilizado o método de contagem em plaqueamento por profundidade, *pour plate*, utilizando o meio de ágar caseína-soja (TSA). Foi diluída 1ml da amostra de água em 9 ml de caldo caseína-soja (TSB) com pH $7,3 \pm 0,2$ e mantido a 25°C . Um ml da diluição foi adicionado a placa de Petri e sobre a alíquota adicionados 20 ml do meio TSA fundido à temperatura de 45°C . Após solidificação, as placas foram incubadas a $32,5^{\circ} \text{C} \pm 2,5^{\circ} \text{C}$ durante 48 h, com leitura prévia da contagem com 24 h e a final com 48 h. Para cada amostra são realizadas contagens em duplicata (Apêndice 1).

Nas placas que não apresentam colônias, a contagem é registrada como sendo menor que uma vez a menor diluição, ou seja, menor que 10 UFC/ml (Farmacopeia, 2019).

4.3 Pesquisa de coliformes totais

A pesquisa de presença de coliformes totais na água foi realizada segundo método descrito na Farmacopeia (2019). Foram adicionados 100 ml de cada amostra de água em frasco contendo 50 ml de caldo Presença-Ausência (PA) em tripla concentração. Após homogeneização o frasco foi incubado por 24 h a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Apêndice 2). Na ocorrência de resultado positivo, o caldo apresenta alteração da cor roxa para amarelo (PA+). A partir desta evidência, é transferida uma alíquota da cultura que tenha apresentado crescimento para tubo de *Durhan* contendo 10 ml de caldo verde brilhante bile lactose. Após incubação por até 48h a $30^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, a presença de gás no interior do tubo de *Durhan* confirma a presença de coliformes totais. Cada amostra possui uma análise única para esta metodologia.

4.4 Isolamento e identificação fenotípica de *P. aeruginosa* e *E. coli*

Os isolados a partir do crescimento nas placas de agar caseína soja foram selecionados para semeadura em meios seletivos, agar cetrimide e MacConkey para isolamento de *P. aeruginosa* e *E. coli*, respectivamente e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida foram selecionadas colônias das placas e as características morfo-tintoriais analisadas pela coloração de Gram. Após a coloração de Gram foi realizada triagem bioquímica utilizando oxidase, pigmentação (extração de piocianina) e crescimento a 42°C , para identificação presuntiva de *Pseudomonas aeruginosa* (Apêndice 3) e, para *Escherichia coli* foi utilizado teste de citrato, indol, eosina azul de metileno (EMB), vermelho de metila (VM) e Voges Proskauer (VP) (Apêndice 4) (Whitman *et al.*, 2015).

4.5 Identificação molecular de *P. aeruginosa* e *E. coli*

As culturas identificadas fenotipicamente como *P. aeruginosa* e *E. coli* foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o kit Dnaeasy® Blood&Tissuet (Qiagen GmgH, Hilden, Germany).

A confirmação da identidade dos isolados de *P. aeruginosa* foi realizada através da amplificação dos genes 16S rRNA e O-antígeno acetilase, utilizando-se iniciadores específicos (PA-SS-F e PA-SS-R; PA431C-F e PA431C-R). Para confirmação dos isolados de *E. coli* foi realizada a amplificação do gene *uidA* utilizando os iniciadores UAL-754/UAR-900 (Tabela 5). A mistura da reação de PCR contendo os seguintes reagentes: 50 pmol/μL de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 U de *Taq* DNA polimerase nativa, solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~20ng de DNA genômico e água deionizada estéril q.s.p (INVITROGEN®) (Spilker *et al.*, 2004; Bej *et al.*, 1991).

O DNA das cepas de referência *E. coli* CBP 00033 e *P. aeruginosa* CBP 0099 foram utilizadas como controles positivo e negativo das reações e uma alíquota de água deionizada estéril empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR. O processo de amplificação foi realizado nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura ótima de anelamento 58°C para 16S rRNA, 52° C para *uidA* e 63°C para O-antígeno acetilase e 72°C por 2 min mais um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min (Quadro 5).

Os produtos da PCR foram visualizados num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com GelRed™ 1X (BIOTIUM) e analisado pelo sistema de fotodocumentação L-PIX Touch (LOCCUS).

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados na confirmação da identidade de *P. aeruginosa* e *E. coli*

Micro-organismo / Gene alvo	Iniciador	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>E. coli</i> / <i>uidA</i>	UAL-754	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG	52	156	Bej et al., 1991
	UAR-900	ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG			
<i>P. aeruginosa</i> / <i>16S rRNA</i>	PA-SS-F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	58	956	Spilker et al, 2004
	PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCACCCG			
<i>P. aeruginosa</i> / <i>O-antígeno acetilase</i>	PA431C - F	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGTTATC	63	232	Choi et al, 2013
	PA431C - R	GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC			

Fonte: O autor (2020).

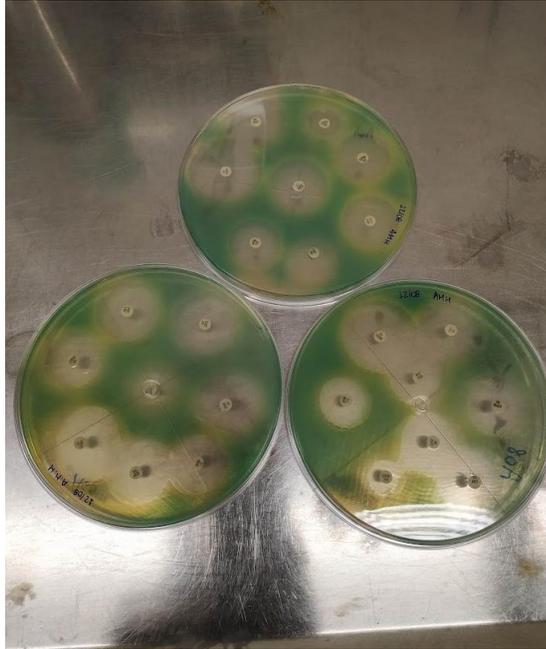
4.6 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer), segundo os critérios estabelecidos pelo EUCAST, 2022. Os isolados foram inicialmente semeados em ágar BHI por 24 h a 37 °C e o crescimento microbiano suspenso em solução salina estéril (NaCl 0,85%) para a obtenção do padrão de turbidez 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi semeada, com o auxílio de um swab, em ágar Müeller-Hinton onde foram depositados os discos de oito antibióticos selecionados. A leitura dos halos de inibição foi efetuada após a incubação a 37°C por 16-18 horas (Figura 5).

Para *P. aeruginosa* - Monobactâmicos: Aztreonam (30 µg); Cefalosporinas: Cefepime (30 µg) e Ceftazidima (30 µg); Fluoroquinolonas: Ciprofloxacina (5 µg); Aminoglicosídeos: Gentamicina (10 µg); Carbapenêmicos: Imipenem (10 µg) e Meropenem (10 µg); e Penicilinas: Piperacillina/Tazobactam (100/10 µg).

Para *E. coli* foram selecionados os antibióticos, Penicilina: piperacillina/tazobactam (100/10 µg); Cefalosporinas: Cefuroxima, Cefepime (30 µg) e Ceftazidima (30 µg); Carbapenêmicos: Imipenem (10 µg) e Meropenem (10 µg); Monobactâmicos: Aztreonam (30 µg); Fluoroquinolona: Ciprofloxacino (5 µg); Aminoglicosídeo: Gentamicina (10 µg); Tetraciclina: tigeciclina.

Figura 5 - Placa de ágar Müeller-Hinton para teste de susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *P. aeruginosa*



Fonte: O autor (2020).

4.7 Detecção de fatores de virulência por métodos fenotípicos

4.7.1 Detecção de hemolisina

Para detecção da atividade hemolítica foram inoculadas placas de ágar sangue de ovelha com as colônias, e depois incubadas a 37°C por 24 h/48 h, em seguida foram verificadas as zonas de hemólise ao redor delas. A formação de halos de α -hemólise ou β -hemólise ao redor das culturas bacterianas indica a ação de atividade hemolítica (Pramodhini *et al.*, 2016).

4.7.2 Detecção de fosfolipase

Para avaliar a produção de fosfolipase C foram inoculadas placas de agar egg-yolk com colônias de cultura de 18 a 24 horas e incubado a 35°C por 24-48. Aparência

de um halo opaco branco leitoso ao redor da colônia foi lida como positiva para produção de fosfolipase C (Pramodhinni *et al.*, 2016).

Figura 6 - Placa de agar egg-yolk positiva para produção de fosfolipase C



Fonte: Do autor (2020).

4.7.3 Detecção de gelatinase

A hidrólise da gelatina foi determinada inoculando o isolado bacteriano em tubos contendo meio nutriente de gelatina (Figura 7). Os tubos foram incubados por 48 horas a 37°C. Tubos não inoculados serão mantidos como controle negativo. No final do período de incubação, a liquefação do meio de cultura, colocando o tubo de cultura a 4°C durante a noite, foi positiva para a produção de gelatinase (Pramodhinni *et al.*, 2016).

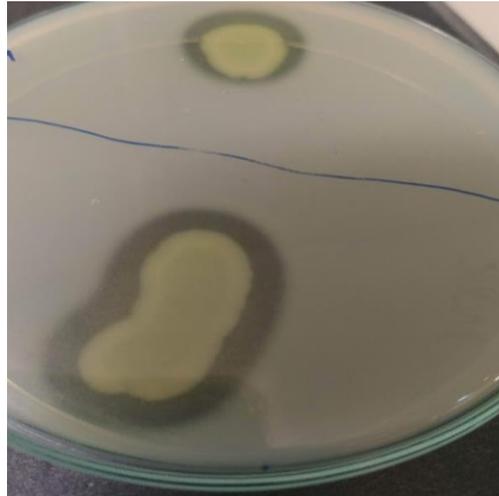
4.7.4 Detecção de atividade de DNase

Colônias bacterianas foram inoculadas pontualmente em placas de agar DNase e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas, após foi injetado HCl 1,0 N. A DNase secretada pelas colônias de bactérias hidrolisa o DNA no meio, resultando em depuração ao redor do crescimento bacteriano e permitindo a observação da atividade de DNase (Pramodhinni *et al.*, 2016).

4.7.5 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada segundo o protocolo descrito por TAKAHASHI *et al.*, 2014, os isolados foram cultivados em caldo nutriente em 37°C durante 24 horas e 2 µl destas culturas foram aplicadas em placas de ágar nutriente contendo 1% de skim milk. Após incubação a 37°C durante 48 horas a formação de halos ao redor das culturas bacterianas indica a ação de atividade proteolítica em caseína (Figura 9).

Figura 7 - Placas de ágar nutriente adicionado de skin milk positiva para atividade proteolítica de cepas de *P. aeruginosa*



Fonte: O autor (2020).

4.8 Relação clonal por MLST

Para avaliação da relação clonal dos isolados de *P. aeruginosa*, foram selecionados isolados de hospitais que apresentaram crescimento nos 3 pontos de coleta. Os sete genes utilizados tanto para amplificação quanto para sequenciamento foram: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*, estabelecidos por Cacci *et al.*, 2016 e suas informações são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados para tipagem de MLST

Gene	Nome do primer	Sequência (5' a 3'')	Tamanho (bp)	Localização do nucleotídeo	Temperatura de anelamento (°C)
<i>acsA</i>	acsA-F	GCCACACCTACATCGTCTAT	520	935-1454bp	53
	acsA-R	ACGAAGCGGTCATGGTC			
<i>aroE</i>	aroE-F	CACTCCGGCAAAGGAACGA	867	127-993bp	55
	aroE-R	CTCAAATGCCGCCTGACAAC			
<i>guaA</i>	guaA-F	CGACAAGGTCACCGAGATGC	652	432-1083bp	57
	guaA-R	GACGTTGTGGTGC GACTTGA			
<i>mutL</i>	mutL-F	GCGACCTGTTCTTCAACAC	530	455-984bp	53
	mutL-R	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT			
<i>nuoD</i>	nuoD-F	TCGATCCCTACTCCCTGTCC	600	521-1120bp	53
	nuoD-R	CCAGCTTGTCCCAGCC			
<i>ppsA</i>	ppsA-F	GGCCAAGCAGGCCAT	578	891-1468bp	50
	ppsA-R	GRTTGCCGACGTTTCATCAT			
<i>trpE</i>	trpE-F	ATCAAGGACTACATCCTGGC	727	697-1423bp	55
	trpE-R	TGATGGTTTCTTCCCCTCC			

Fonte: Adaptado de Cacci *et al.* (2016).

Para amplificação e sequenciamento foram utilizados sete pares de iniciadores dos sete genes housekeeping (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*) descritos por Cacci *et al.*, 2016.

Para amplificação, a mistura da reação foi preparada em um volume total de 25 µL contendo GoTaq® Colorless MasterMix (Promega Corporation, Madison, USA), 1 µM de cada iniciador e 1 µL da suspensão bacteriana. A amplificação de cada gene foi realizada em termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler– Applied Biosystems) nas seguintes condições: ciclo inicial de 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de 96°C por 1 min, temperatura de anelamento específica de cada gene por 1 min, 72°C por 1 min, seguido de um último ciclo de 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit Purelink PCR Purification Invitrogen®) e sequenciados em duplicata para cada iniciador, utilizando BigDye (Applied Biosystems, Foster City, CA) em um sequenciador de DNA SeqStudio na plataforma do INCQS/Fiocruz.

As sequências obtidas foram analisadas no banco de dados de MLST para *P. aeruginosa* <http://pubmlst.org/paeruginosa/> a partir da comparação com as sequências existentes a fim de determinar o perfil alélico e, subsequentemente, o tipo sequencial (ST) dos isolados a partir de cinco ou mais alelos idênticos.

5 RESULTADOS

5.1 Contagem total de bactérias aeróbias e pesquisa de coliformes totais

Das amostras coletadas neste estudo (2019) (n=24), 33,3% (n=11) apresentaram crescimento acima dos limites preconizados pela RDC 11/2014. Amostras coletadas em anos anteriores (2017 e 2018) dos 3 pontos, nos mesmos serviços de dialise móvel totalizaram 132 amostras apresentando 69,7% (n=92) de crescimento acima dos limites preconizados pela RDC 11/2014. Todas as amostras foram analisadas neste estudo e os resultados discriminados de encontram na Tabela suplementar 1 (Apêndice 5).

5.2 Identificação bioquímica de *P. aeruginosa* e *E. coli*

Das amostras com contagem acima dos limites da legislação de hemodiálise convencional foram isoladas 111 cepas identificados fenotipicamente como *P. aeruginosa*, provenientes dos 3 pontos de coleta da dialise móvel: Pré filtro (n= 29); Pós osmose (n= 36) e solução de diálise (n= 46). Com relação a *E. coli* foram isoladas 10 cepas nos pontos de coleta pré-filtro (n= 3), Pós-osmose (n= 5) e solução de diálise (n= 2). A identificação das cepas por ponto de coleta é apresentada na tabela suplementar 2 (Apêndice 6).

Estas 111 cepas identificadas bioquimicamente como *P. aeruginosa* apresentaram pigmento verde em ágar cetrimide. Os isolados identificados bioquimicamente como *E. coli* (n= 10) produziram colônias com pigmento róseo em ágar MacConkey e brilho metálico em ágar VRBG.

5.3 Confirmação molecular da identidade dos isolados

A amplificação pela PCR do gene 16S rRNA das cepas de *P. aeruginosa* se mostrou inespecífica e dessa forma, foi selecionado um outro indicador o gene O-antígeno acetilase para detecção espécie-específica de *P. aeruginosa*.

Os 111 isolados presuntivos de *P. aeruginosa* apresentaram um único fragmento de aproximadamente 232 pb, compatível com o fragmento detectado na cepa de referência utilizada como controle positivo da reação. Os isolados de *E. coli* apresentaram um único fragmento de aproximadamente 156 pb, compatível com o fragmento detectado na cepa de *E. coli* de referência.

5.4 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

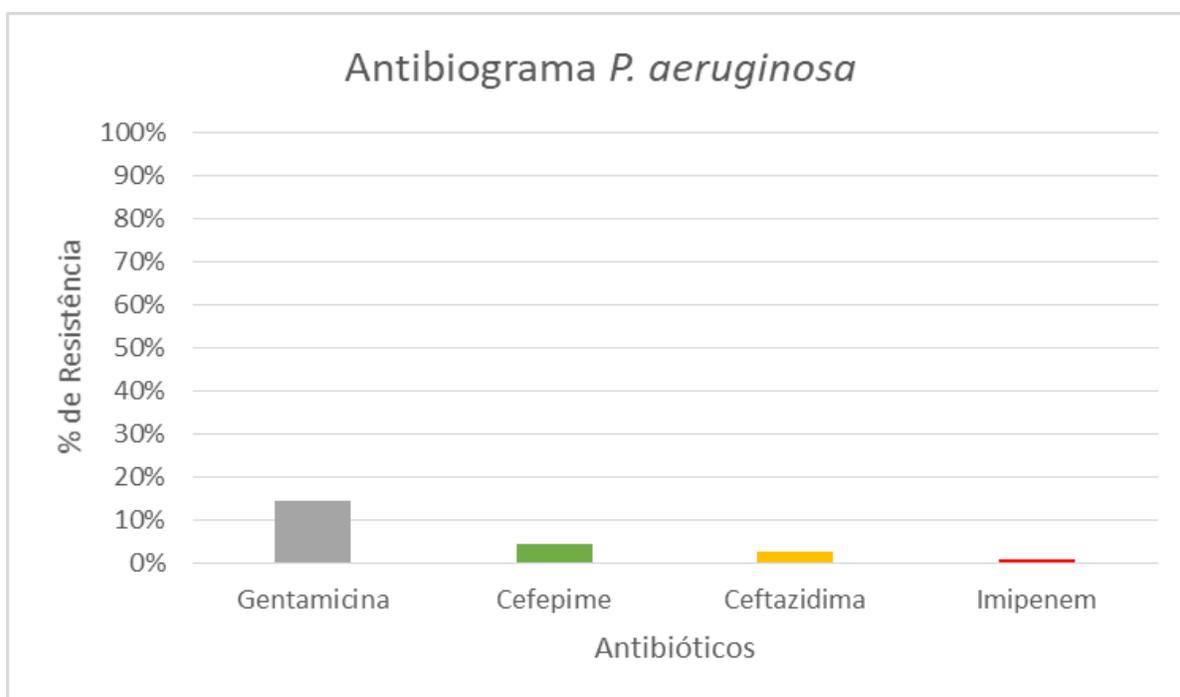
A partir do teste de suscetibilidade dos isolados de *P. aeruginosa* 14,4% (16/111) dos isolados apresentaram resistência a Gentamicina, 4,5% (5/111) apresentaram resistência a Cefepime, 2,7% (3/111) apresentaram resistência a Ceftazidima, e a 0,9% (1/111) apresentou resistência a Imipenem (Gráfico 1). Para os demais antibióticos testados (Meropenem, Aztreonam, Piperaciclina/Tazobactam, Ciprofloxacino) todas as cepas se apresentaram sensíveis. Na tabela 7 são apresentadas as cepas associadas ao antibiótico de resistência.

Foram caracterizados 7 perfis de resistência entre as cepas de *P. aeruginosa* (Gráfico 2), identificados como RA 1 (Gentamicina/Cefepime/Ceftazidima) com 1% (n=1), RA 2 (Gentamicina/Cefepime) com 1% (n=1), RA 3 (Gentamicina/Ceftazidima) com 2% (n=2), RA 4 (Gentamicina) com 10,8% (n=12), RA 5 (Cefepime) com 2,7% (n=3), RA 6 (Imipenem) com 1% (n=1) e RA 7 (Sensível a todos os antibióticos) 82% (n=91) conforme apresentado na tabela suplementar 3 (Apêndice 7), não houveram cepas resistentes a todos os antibióticos testados.

Nos isolados de *E. coli* foi observada resistência a Cefuroxima em 60% (6/10) dos isolados, 40% (4/10) dos isolados apresentaram resistência a Aztreonam, 40% (4/10) das cepas resistência a Ceftazidima, 40% (4/10) resistência a Cefepime e 23% (3/10) com resistência a Gentamicina (Gráfico 3). Todas as cepas de *E. coli* testadas apresentaram sensibilidade aos demais antibióticos testados (Piperaciclina com tazobactam, Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacino, Tigeciclina). Na tabela 8 são apresentadas as cepas associadas ao antibiótico de resistência.

Foram caracterizados 7 perfis de resistência entre as cepas de *E. coli* (Gráfico 4), identificados como R1 (Cefuroxima/Aztreonam/Ceftazidima/Cefepime/Gentamicina) com 20% (n=2), R2 (Cefuroxima/Aztreonam/Cefepime/Gentamicina) com 10% (n=1), R3 (Cefuroxima/Ceftazidima/Cefepime) com 10% (n=1), R4 (Cefuroxima/Aztreonam) com 10% (n=1), R5 (Cefuroxima) com 10% (n=1), R6 (Ceftazidima) com 10% (n=1) e R7 (Sensível a todos os antibióticos) com 30% (n=3) conforme apresentado na tabela suplementar 4 (Apêndice 8).

Gráfico 1 - Susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas

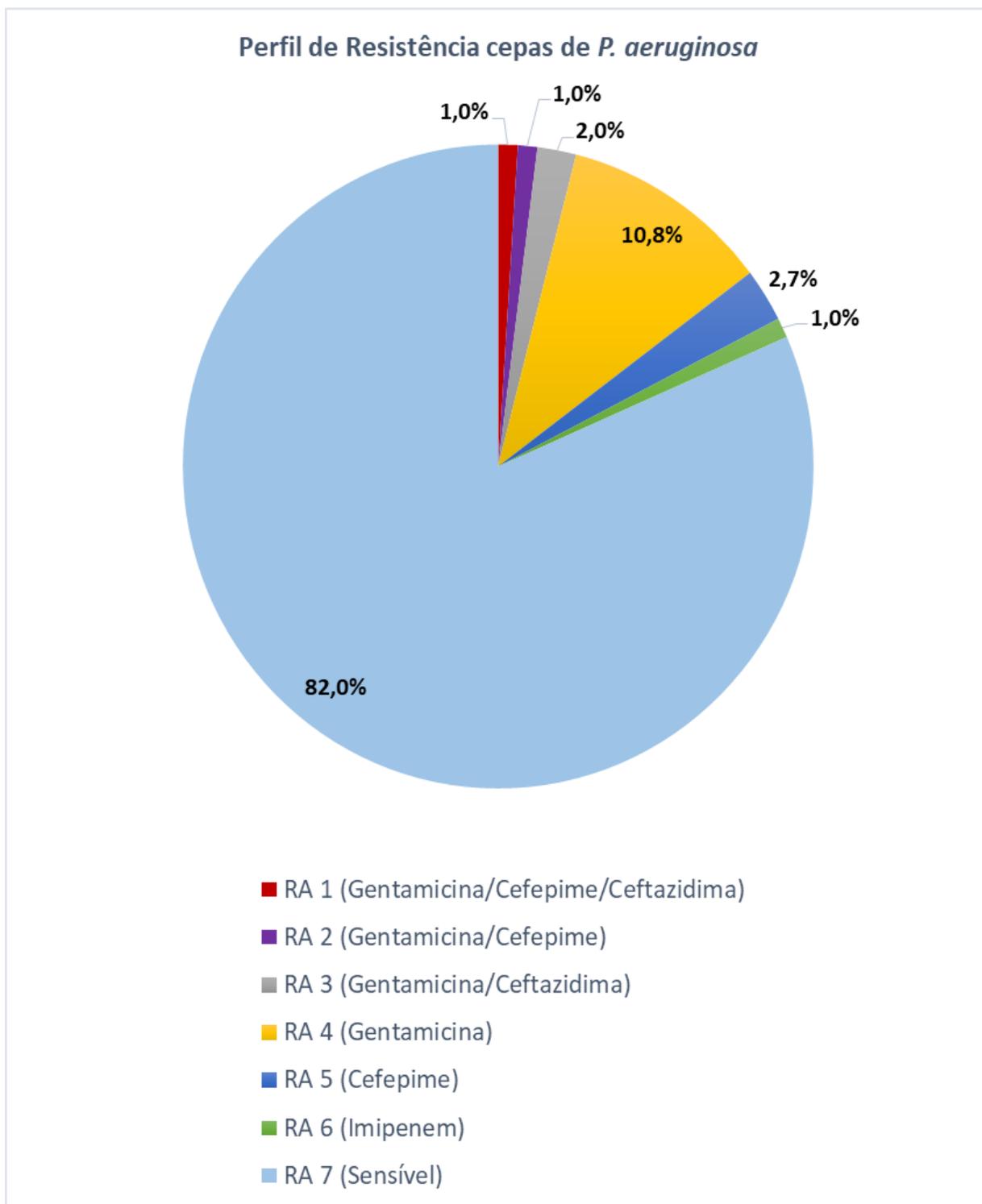


Fonte: O autor (2023).

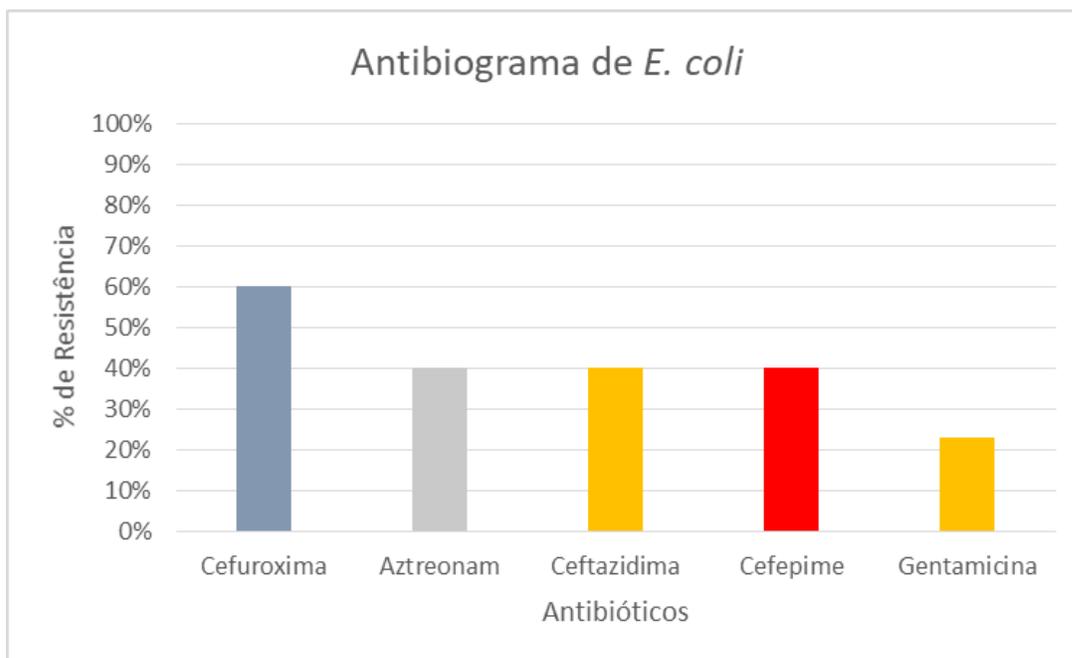
Tabela 7 - Resistência a antimicrobianos por cepas de *P. aeruginosa* analisadas

Antibiótico testado	Cepas resistentes	N
Gentamicina	PA 05, PA 04, PA 08, PA 09, PA 17, PA 33, PA 43, PA 49, PA 50, PA 52, PA 64 PA 65, PA 72, PA 73, PA 83, PA 97	16/111
Cefepime	PA 01, PA 19, PA 30, PA 52, PA 65	5/111
Ceftazidima	PA 33, PA 43, PA 65	3/111
Imipenem	PA 34	1/111

Fonte: O autor (2020).

Gráfico 2 - Perfil de resistência a antimicrobianos (RA) das cepas de *P. aeruginosa*

Fonte: O autor (2020).

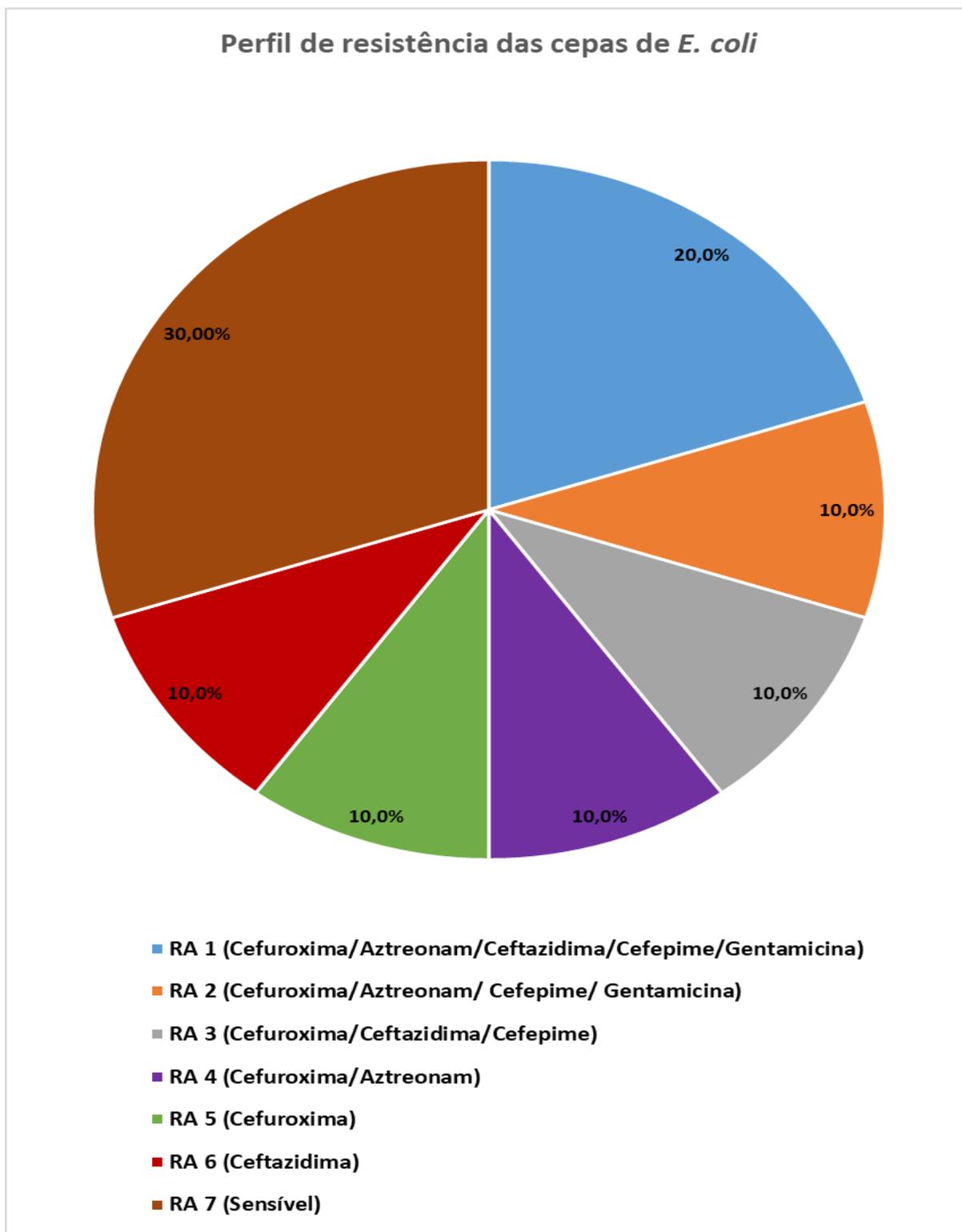
Gráfico 3 - Susceptibilidade aos antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas

Fonte: O autor (2020).

Tabela 8 - Resistência a antimicrobianos por cepas de *E. coli* analisadas

Antibiótico	Cepas	N
Cefuroxima	EC 01, EC 02, EC 03, EC 04, EC 06, EC 07	6/10
Aztreonam	EC 02, EC 03, EC 04, EC 06	4/10
Ceftazidima	EC 02, EC 03, EC 07, EC 08	4/10
Cefepime	EC 02, EC 03, EC 04, EC 07	4/10
Gentamicina	EC 02, EC 03, EC 04	3/30

Fonte: O autor (2020).

Gráfico 4 - Perfil de resistência das cepas de *E. coli*

Fonte: O autor (2020).

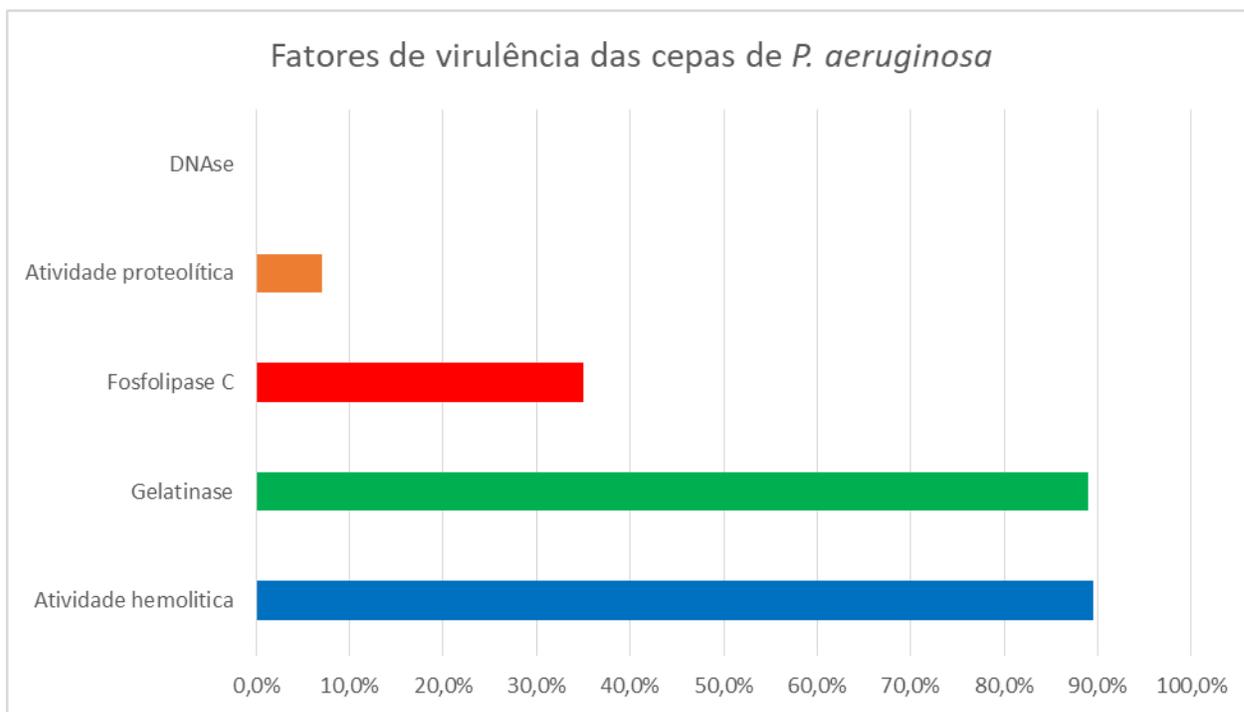
5.5 Detecção do Fatores de virulência

Na detecção de atividade hemolítica, após a incubação das amostras de *P. aeruginosa* foi observada a formação de halo ao redor de 99 dos isolados analisados, sendo 85% (n= 94) halos de α -hemólise (hemólise parcial) e 4,5% (n= 5) de β -hemólise (hemólise total), 10,5% (n= 12) não apresentou atividade hemolítica caracterizada como γ -hemólise (ausência de atividade hemolítica). Já nas amostras de *E. coli* todas apresentaram ausência de atividade hemolítica, caracterizada por γ -hemólise.

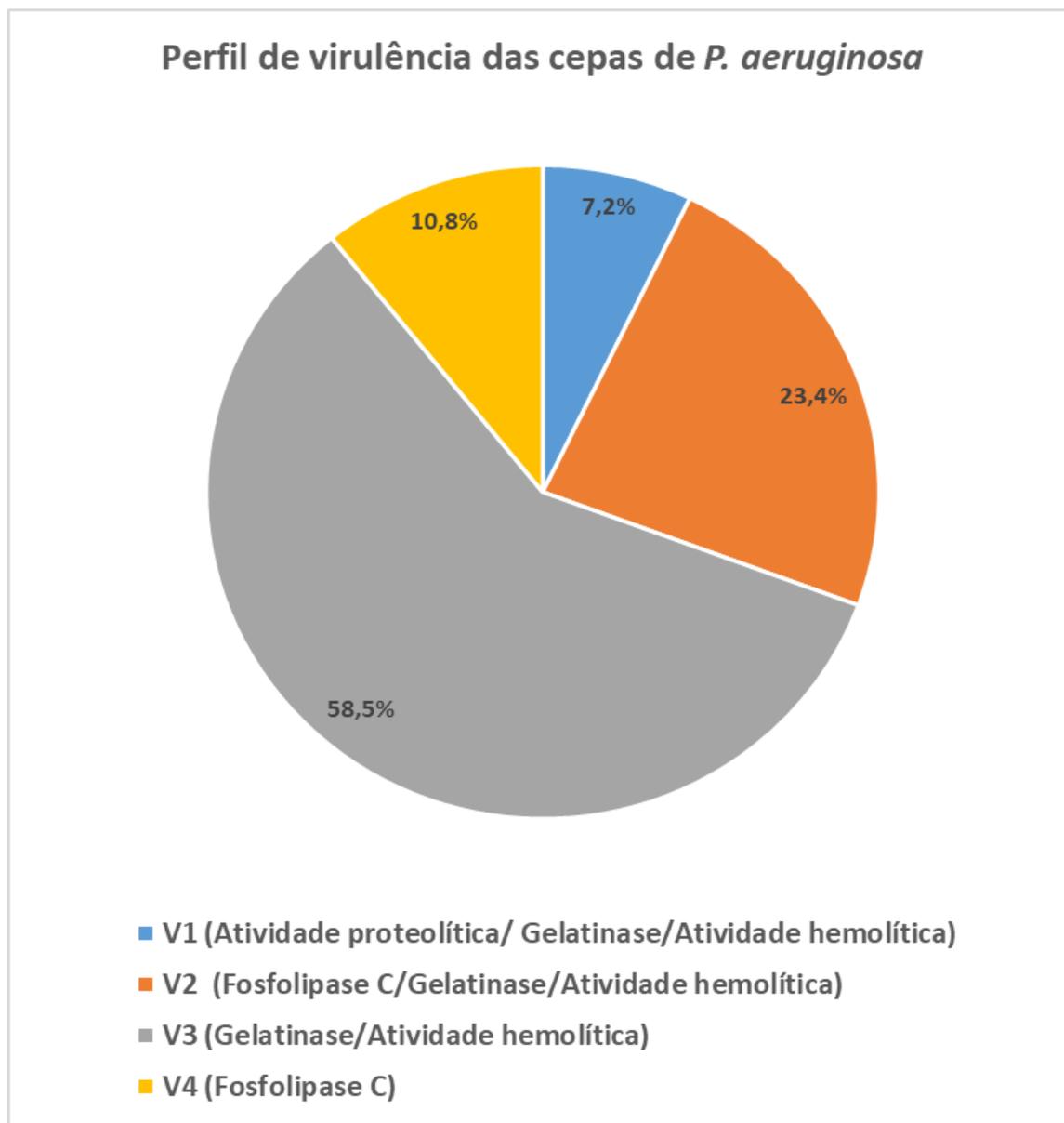
Quando avaliada a formação de Fosfolipase C, nas amostras de *P. aeruginosa* avaliadas 35% (n=39) apresentaram um halo opaco branco leitoso ao redor da colônia, lida como positiva. Nas amostras de *E. coli* 100% (n=10) das amostras analisadas foram positivas para produção de fosfolipase C. A hidrólise da gelatina foi positiva em 89% (n=99) das amostras de *P. aeruginosa* analisadas, indicando produção de gelatinase. Nas amostras de *E. coli* todas foram negativas para este teste.

A detecção de atividade de desoxirribonucleases em todos os isolados de *P. aeruginosa* e *E.coli* foi negativa. Na avaliação de atividade proteolítica 7% (n= 8) dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram atividade proteolítica e caseína enquanto nenhuma das amostras de *E. coli* apresentou esta atividade. Resultados do perfil de virulência dos isolados de *P. aeruginosa* apresentado no gráfico 5. Na tabela suplementar 5 são identificadas as cepas por fator de virulência identificado (Apêndice 9).

Foram caracterizados 4 perfis de virulência entre as cepas de *P. aeruginosa* (Gráfico 6), identificados como V1 (Atividade proteolítica/Gelatinase/Atividade hemolítica) com 28,6 % (n=2), V2 (Fosfolipase C/Gelatinase/Atividade hemolítica) com 14,3 % (n=1), V3 (Gelatinase/Atividade hemolítica) com 14,3 % (n=1) e V4 (Fosfolipase) com 14,3 % (n=1) conforme apresentado na tabela suplementar 6 (Apêndice 10). Todas as cepas de *P. aeruginosa* analisadas apresentaram algum fator de virulência.

Gráfico 5 - Fatores de virulência das cepas de *P. aeruginosa*

Fonte: O autor (2023).

Gráfico 6 - Perfil de virulência das cepas de *P. aeruginosa*

Fonte: O autor (2023).

Após análise dos resultados de testes fenotípicos e de susceptibilidade a antimicrobianos, destaca-se que as cepas isoladas dos Hospitais 5 (2017;2018), Hospital 7 (2017;2018;2019), Hospital 11 (2019), Hospital 13 (2017;2018), Hospital 14 (2017;2018), Hospital 15 (2017;2018), Hospital 16 (2017,2018), Hospital 19 (2017; 2018) e Hospital 21 (2017;2018) além de apresentarem resultados positivo nos testes de resistência e virulência, foram isoladas dos 3 pontos de coleta (pré-osmose, pós

osmose e solução de diálise) respectivamente o que se mostrou mais relevante para seguimento das análises, desta forma estas cepas foram selecionadas para realização do sequenciamento.

5.6 Sequenciamento dos isolados *P. aeruginosa*

A partir da análise das sequências obtidas dos isolados de *P. aeruginosa* foram identificados os STs 4296, 2230, 191, 155, 3823 e 1276, sendo o 2230 o mais comum entre os isolados. Em um dos locais analisados (Hospital 7) o mesmo ST foi identificado nos 3 pontos de coleta nos 3 anos consecutivos (2017, 2018, 2019), o que pode identificar uma contaminação in loco de uma cepa característica. Na tabela 9 são apresentadas as informações obtidas na identificação dos ST e os pontos de coleta onde foram encontrados.

Tabela 9 - Identificação dos STs por local e ponto de coleta

Local da Coleta	Ano coleta	Pré-osmose	Pós osmose	Solução de diálise
Hospital 5	2017	4296	4296	4296
	2018	4296	4296	4296
Hospital 7	2017	2230	2230	2230
	2018	2230	2230	2230
	2019	2230	2230	2230
Hospital 11	2019	2230	2230	2230
Hospital 13	2017	4296	4296	4296
	2018	2230	2230	2230
Hospital 14	2017	2230	2230	2230
	2018	2230	2230	2230
Hospital 15	2017	191	191	191
	2018	155	155	155
Hospital 16	2017	2230	2230	2230
	2018	2230	2230	2230
Hospital 19	2017	2230	2230	2230
	2018	3823	3823	3823
Hospital 21	2017	1276	1276	1276
	2018	2230	2230	2230

Fonte: O autor (2023).

5.7 Correlação dos perfis de resistência e virulência das cepas de *P. aeruginosa* com os STs identificados

Após a caracterização dos perfis de resistência e virulência dos isolados de *P. aeruginosa* foi possível estabelecer uma correlação com os STs encontrados. Todas as cepas apresentaram fatores de resistência, virulência ou a correlação entre ambos resistência/virulência.

Dentre as cepas com ST 4296 (n=9), em 44,4% houve resistência e virulência, RA4/V2 - 11,1% (1/9), RA4/V3 - 11,1 % (1/9), RA5/V2 -11,1% (1/9) e RA5/V3 – 11,1% (1/9). Nas cepas com ST 2230 (n=30) a correlação dos perfis analisados foi observada em concomitância em 13,3% das cepas, RA2/V3 – 3,3% (1/30), RA5/V3 – 6,7% (2/30), RA5/V4- 3,3% (1/30). Nas cepas com ST 155 (n=3) foi observada resistência/virulência em 33,3% (1/3) entre os perfis RA6/V4. Nas cepas com ST 1276 (n=3) 66,6% apresentaram a correlação resistência/virulência, RA4/V3- 33,3% (1/3) e RA4/V1 – 33,3% (1/3). Nas cepas com ST 191 e 3823 não foi observada correlação pois só apresentaram fatores de virulência. Os resultados detalhados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Perfis de Resistência e Virulência por ST

ST	Perfis de Resistência x Virulência						
	RA4/V2	RA4/V3	RA5/V2	RA5/V3	V2	V3	--
4296 (9)	1	1	1	1	2	3	--
2230 (30)	RA2/V3	RA5/V3	RA5/V4	V1	V2	V3	V4
	1	2	1	2	11	7	6
191 (3)	V2	V3	--	--	--	--	--
	2	1	--	--	--	--	--
155 (3)	RA6/V4	V4	--	--	--	--	--
	1	2	--	--	--	--	--
3823 (3)	V1	V3	--	--	--	--	--
	2	1	--	--	--	--	--
1276 (3)	RA4/V3	R4/V1	V1	--	--	--	--
	1	1	1	--	--	--	--

Fonte: O autor (2023).

6 DISCUSSÃO

As clínicas e hospitais que oferecem serviços de hemodiálise são monitorados e fiscalizados segundo a RDC 11/2014 que além de apresentar os requisitos necessários a oferta deste serviço e seu funcionamento, especificidades dos insumos e equipamentos apresenta os parâmetros exigidos de características físicas e organolépticas da água potável a ser utilizada, além dos parâmetros químicos e microbiológicos que avaliam a qualidade desta água, garantindo a segurança sanitária do procedimento e com isso a minimização dos riscos associados ao procedimento (Brasil, 2014). Desta forma, existem programas de monitoramento destes serviços que subsidiam a fiscalização sanitária a partir da concordância com a legislação e necessidade de monitoramento contínuo dos serviços, que obrigatoriamente devem apresentar um sistema de tratamento específico que prepara a água de distribuição (pré-osmose) para o procedimento, tornando-a livre de sujidades, partículas e possíveis contaminantes através dos processos de filtração e osmose (pós osmose).

O procedimento de diálise móvel possui características semelhantes a hemodiálise convencional, no entanto o ponto crucial é que por ser realizada a beira do leito e precisar contar com um equipamento de osmose portátil, torna o procedimento menos seguro, além de exigir monitoramento do equipamento portátil que funciona como única barreira entre a água de distribuição e a membrana do dialisador podendo aumentar o risco de contaminação (Jesus, PR, 2021). Ao vislumbrarmos este procedimento acerca da segurança do paciente, ele por si só já apresenta riscos de eventos adversos relacionados ao uso de tecnologias que devem ser seguras, e, grande quantidade de medicamentos e substâncias, além de erros na manipulação dos mesmos, havendo a necessidade de profissionais treinados e capacitados (Lima, MMS, 2021). A nota técnica da ANVISA (Brasil, 2009) vai estabelecer que o procedimento utilize água previamente tratada por sistema de distribuição e saneamento e que quando em uso de osmose portátil o equipamento apresente registro na ANVISA e manutenção periódica, porém sem trazer especificações ou parâmetros químicos ou microbiológicos de qualidade desta água.

Na tabela suplementar 1 são destacadas as contagens totais de bactérias nos pontos de coleta analisados e a avaliação das mesmas segundo os critérios da RDC 11 (Brasil, 2014), no entanto como já destacado o tratamento ofertado a água é diferente, e nestas amostras que passam por menos etapas de tratamento ainda foram observadas contaminação microbiológica com isolamento de cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* como apresentado na tabela suplementar 2 (Apêndice 6).

A água é um item essencial deste processo, visto a necessidade de grande quantidade para diluição da solução de diálise que terá contato com o dialisador para filtragem do sangue do paciente. Estudos que analisam a qualidade da água distribuída aos hospitais segundo os parâmetros da portaria de Consolidação nº 5/2017 (Brasil, 2017) mostram que ainda são encontradas não conformidades seja no excesso de resíduo de compostos químicos provenientes do tratamento desta água, seja na contagem de bactérias acima dos limites preconizados, reforçando a importância do monitoramento contínuo destes ambientes e estratégias de conscientização quanto a garantia da qualidade da oferta de água potável (Paixão *et al.*, 2022).

Estratégias para amenizar os riscos deste procedimento seriam o uso de solução de diálise ultrapura com tratamento por ultrassom, eliminando potenciais patógenos presentes, já utilizada em países desenvolvidos (Coulliette; Arduino, 2013). Alguns laboratórios vêm trabalhando no desenvolvimento da solução de diálise estéril e pronta para utilização não necessitando da diluição comumente realizada com a água tratada na osmose portátil como forma de amenizar o risco de presença de contaminantes químicos e/ou microbiológicos. O laboratório Eurofarma® vem comercializando o Hemolenta® uma solução estéril (cloreto de sódio 0,6140% e sulfato de magnésio heptaidratado 0,018596%) apresentado em bolsa plástica de polipropileno transparente em sistema fechado, pronta para o uso no equipamento de diálise (Eurofarma, 2023).

Os resultados de contaminação microbiológica e a necessidade de melhorar a fiscalização dos serviços hospitalares e do modelo de monitoramento dos equipamentos e realização do procedimento reforça a necessidade de uma legislação nacional que oriente os profissionais de saúde que atuam na realização do procedimento e os que atuam nas inspeções das unidades hospitalares.

A espécie *P. aeruginosa*, considerada um microrganismo oportunista devido a sua afinidade por infecções hospitalares e relacionadas a pacientes imunocomprometidos, apresenta resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos devido a baixa permeabilidade de sua membrana externa, quando comparada a outros microrganismos como *E. coli* por exemplo. Sua capacidade adaptativa, que o torna tão facilmente cultivável, também está relacionado ao seu potencial de resistência onde estudos relacionaram uma resistência adaptativa associada ao uso de antimicrobianos (Pachori; Gothwal; Gandhi, 2019).

Outro mecanismo adaptativo relacionado a resistência antimicrobiana seria a produção de enzimas codificadas em elementos genéticos móveis que tem ação de inativar classes específicas de antimicrobianos. Um estudo realizado no Texas identificou 36 pacientes com *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos produtora de metalo-beta-lactamase codificada por Verona integron (VIM- CRPA), quando realizada coleta de amostras no hospital onde esses pacientes são atendidos, 3 pontos de coleta apresentaram cepas *P. aeruginosa* VIM-CRPA, ou seja, com a mesma característica das cepas isoladas dos pacientes, sendo um dos pontos a torneira da fonte de água da osmose reversa, o que explicaria a presença da bactéria nos pacientes e com isso a resistência adquirida aos antimicrobianos nas cepas isoladas (Prestel *et al.*, 2022).

Algumas características encontradas no gênero *Pseudomonas* contribuem com sua patogenicidade. Podemos destacar a motilidade devido a presença de estruturas de superfície que contribuem na produção de biofilmes que permitem a sua permanência em sistemas de tratamento de água e em reservatórios como torneiras por exemplo facilitando sua disseminação. A formação de proteases e DNase que auxilia na quebra das defesas físicas do hospedeiro contribuindo para a sua multiplicação e contaminação de ambientes e pacientes (Saeki *et al.*, 2020).

O estudo de Shahri F. N. et al (2022) submeteu 97 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras clínicas a testes de susceptibilidade a antimicrobianos e fatores de virulência, destas destaca-se que 25,77% apresentaram resistência a imipenem, 16,49% a gentamicina, 20,61% a ceftazidima, semelhante ao resultado obtido neste estudo onde 14,4% dos isolados apresentaram resistência a Gentamicina,

4,5% resistência a Cefepime, 2,7% resistência a Ceftazidima, e 0,9% resistência a Imipenem. Nos isolados do estudo de Shahri F. N. et al (2022) também foi detectada resistência a meropenem (15,46%), tobramicina (15,46%), amicacina (16,49%), ciprofloxacina (20,61%), levofloxacina (24,74%), piperacilina (15,46%), piperacilina/tazobactam (12,37%), colistina (9,27%) e polimixina B (11,34%). Com relação aos fatores de virulência analisados 87,62% dos isolados, possuíam atividade β -hemolítica, 37,11% atividade de DNase, 78,35% produção de lecitinase, 59,8% elastase, e 28,86% motilidade espasmódica. Nas cepas do presente estudo apenas a atividade β -hemolítica se mostrou semelhante com 4,5% (5/111) dos isolados apresentando β -hemólise. A detecção de cepas de *P. aeruginosa* com resistência antimicrobiana e positivas a diferentes fatores de virulência reforça seu potencial patogênico.

Um estudo que analisou amostras de água em serviços de hemodiálise do Rio Grande do Sul, além da contagem de coliformes totais e bactérias heterotróficas (preconizado na legislação), realizou pesquisa de *P. aeruginosa* e fungos e mostrou que estes foram encontrados em abundância, ressaltando a importância destas análises vistos que estão associados a infecção principalmente em pacientes imunocomprometidos (Figel; Dalzoto; Pimentel, 2015).

O estudo de Araújo Souza (2015) que buscou caracterizar as bactérias patogênicas encontradas em água utilizada em serviços de hemodiálise isolou cepas de *P. aeruginosa* resistentes a cefepime, aztreonam e piperaciclina-tazobactam, além de análise genômica que apresentou persistência de clones de uma mesma bactéria em momentos de coleta diferentes enfatizando a persistência da contaminação associada a capacidade de aderência e persistência desta espécie bacteriana.

A pesquisa de *P. aeruginosa* não é preconizada no monitoramento de água tratada (Brasil, 2017) e nem na água para procedimentos como a hemodiálise (Brasil, 2014), visto a ocorrência deste microrganismo neste ambiente ressalta-se a necessidade de revisão das legislações e inserção da pesquisa deste patógeno a fim de garantir segurança aos usuários e pacientes.

Neste estudo 54 isolados de *P. aeruginosa* foram submetidos a análise do perfil clonal a partir da análise de MLST. Para esta análise foram selecionados os isolados

presentes nos 3 pontos de coleta de um mesmo hospital, o que tornaria mais relevante a avaliação de seu perfil. A partir do MLST foram identificados os STs 4296, 2230, 191, 155, 1276 e 3823, sendo o 2230 o mais encontrado inclusive em anos diferentes em um mesmo hospital.

Um estudo realizado em Singapura analisando 222 isolados de *P. aeruginosa* identificou 69 STs sendo 11 ainda não identificados, os mais frequentes foram ST235, ST308, ST244, ST179 e ST357 representando 60% dos isolados, além da identificação de sete clones de alto risco de infecção nesta espécie bacteriana ST111, 233, 235, 244, 298, 357 e 308 (Qi-Min Teo *et al.*, 2021).

Dentre os STs identificados neste estudo, o ST191 também foi descrito no estudo de Kim *et al.* (2020) em isolados de *P. aeruginosa* com resistência a carbapenêmicos obtidos de culturas de referência (ATCC) em um estudo de atividade antimicrobiana realizado na Coreia do Sul. Bem como, o ST155 encontrado no hospital 15, que foi identificado no estudo de Hong *et al.* (2020) que analisou isolados de *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases identificados em amostras obtidas de instituições de longa permanência de idosos na Coreia do Sul e também no estudo de Ruiiz-Roldan *et al.* (2021) que analisou amostras de vegetais que apresentaram contaminação por esse patógeno, por se tratar de um tipo de alimento que pode ser consumidos cru, isso pode acarretar em risco de infecções intestinais, por se tratar a *P. aeruginosa* de um microrganismo oportunista de fácil ambientação em diferentes nichos.

Nas cepas isoladas neste estudo pode-se observar resistência a Gentamicina, Cefepime, Ceftazidima, e a Imipenem, no entanto a maioria das cepas, cerca de 82 % (n=91) se mostrou sensível as classes de antimicrobianos avaliados. Quando estabelecido um perfil de virulência foram caracterizados 7 grupos com destaque para a cepa PA 52 classificada como RA 2 (Gentamicina/Cefepime) onde foi identificado o ST 2230 além de associação com perfil de virulência V3 (Gelatinase/Atividade hemolítica). A cepa PA 05 foi classificada como RA 4 (Gentamicina) frente ao perfil de resistência e V2 (Fosfolipase C/Gelatinase/Atividade hemolítica) como perfil de resistência enquanto que a cepa PA 04 classificada como RA4 e V3 (Gelatinase/Atividade hemolítica) em

ambas foi identificado o ST 4296. Na cepa PA 50 foi identificado perfil RA 4 e V3 e na cepa PA 49 perfil RA 4 e V1 (Atividade proteolítica/Gelatinase/Atividade hemolítica), nestas cepas foi identificado o ST 1276.

Devido as diferenças em suas propriedades genotípicas e fenotípicas a espécie *P. aeruginosa* desperta a curiosidade dos pesquisadores e seu estudo vem trazendo novas informações relevantes ao meio científico e que podem explicar sua patogenicidade principalmente relacionada a infecções oportunistas. O estudo de Rudra *et al.* (2022) propôs a identificação de uma nova espécie, que seria a *Pseudomonas paraeruginosa*, após a análise de 212 cepas identificadas como *P. aeruginosa* identificou 2 grupos distintos após desenvolvimento da árvore filogenética e com base nos estudos existentes corrobora com a descoberta desta que seria uma nova espécie deste gênero bacteriano.

Diversos estudos têm utilizado metodologias moleculares para análise de água utilizada em ambiente hospitalar e em serviços de hemodiálise a fim de uma análise mais aprofundada dos possíveis patógenos presentes neste ambiente, os resultados podem subsidiar avaliações da possibilidade de inserção dos mesmos nos protocolos de monitoramento e legislações sobre análise da qualidade da água.

7 CONCLUSÃO

O tratamento de hemodiálise é essencial a manutenção da vida e no caso da diálise móvel qualquer indivíduo sob internação hospitalar pode vir a necessitar deste procedimento o que reforça a importância da garantia de segurança e qualidade no procedimento. O estabelecimento de padrões específicos para análise da água poderá subsidiar ações de monitoramento e controle que contribuam para a redução de danos ao paciente, risco de contaminação e tempo de internação e com isso melhor sobrevida.

A utilização de métodos moleculares na investigação microbiológica permite além de resultados robustos, a detecção de resíduos de microrganismos em sua maioria não detectáveis na metodologia convencional podendo oferecer informações sobre a composição da microbiota e da caracterização de contaminantes bacterianos viáveis, porém não cultiváveis. No entanto o custo dos insumos para as análises e não disponibilidade a todos os laboratórios ainda parece um fator dificultador de sua inserção nos protocolos internacionais de análise de água.

Os resultados encontrados reforçam a necessidade de vigilância ativa e parâmetros microbiológicos para monitoramento dos procedimentos de diálise móvel a fim de evitar risco a saúde dos pacientes hospitalizados que venham a necessitar deste procedimento. Os dados deste estudo poderão contribuir com discussões para a elaboração de legislação sanitária específica, dando subsídio ao monitoramento dos serviços hospitalares e a atuação dos profissionais de vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

AAMI. **American national standard for hemodialysis systems**. New York: ANSI, 2024. (ANSI/AAMI no. RD52).

ANDRADE, N.C.C. **Análise da comunidade bacteriana em sistemas de água de hemodiálise através de métodos dependentes e independentes de cultivo**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto Nacional de Metrologia, Rio de Janeiro, 2016.

ARAÚJO SOUZA, B. G. **Qualidade microbiológica de água tratada para hemodiálise e caracterização de bactérias patogênicas**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

ARIZONO, Kenji *et al.* Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis. **Blood Purif**22, supl. 2, p. 26-29, 2004.

ARVANITIDOU, M. *et al.* Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology**, n. 95, p. 180-185, 2003.

AWAK Technology. 2017. Disponível em: <https://awak.com/>.

BEJ, Asim K. *et al.* Detection of Escherichia coli and Shigella. In Water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1013-1017, 1991.

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

BRASIL. Portaria GM/MS Nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5/GM/MS, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 7 de maio de 2021.

BRASIL. Portaria/MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. In: Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 05 de setembro de 2017.

BRASIL. Resolução – RDC/ ANVISA nº 11, de 13 de março de 2014. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. **[Diário Oficial da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 11 de março de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº 006/2009-GGTES/ANVISA. Estabelece parâmetros para execução de procedimentos dialíticos em ambiente hospitalar fora dos serviços de diálise abrangidos pela RDC/ANVISA nº 154, de 15 de junho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 dez. 2009.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. RDC nº 8, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico que institui as boas práticas de fabricação do concentrado polieletrólítico para hemodiálise – CPHD. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 8**, de 2 de janeiro de 2001.

BUGNO, A. *et al.* Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.66, p.172-175, 2007.

BUZZO, M.L. *et al.* A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, p. 1-6, 2010.

CÂMARA NETO, Henrique Fernandes da. **A “tragédia da hemodiálise” 12 anos depois: poderia ela ser evitada?** Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

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

CASTRO, M.C.M. de. Atualização em diálise: Complicações agudas em hemodiálise. **J. Bras Nefrol**, v. 23, n. 2, p. 108-113, 2001.

Chen Lihua *et al.* Profiling Total Viable Bacteria in a Hemodialysis Water Treatment System. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, n. 5, p. 995-1004, 2017.

CHERN, E.C. *et al.* Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 298-306, 2011a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 2018. (CLSI supplement M100).

COELHO, S.N. A água de Caruaru. **Revista Medicina On line**, v. 1, n. 3, 1998.

COITINHO, D. *et al.* Intercorrências em Hemodiálise e Avaliação da Saúde de Pacientes Renais. **Artículo de Investigación**, Bogotá, v. 33, n. 3, pág. 362-371, setembro de 2015.

COSTA, J. A. C.; VIEIRA NETO, O.M.; MOYSÉS NETO, M. Insuficiência Renal Aguda. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 36, p. 307-324, 2003.

COULLIETTE, A. D.; ARDUINO, M. J. Hemodialysis and Water Quality. **Seminars in Dialysis**, v. 26, n. 4, 2013.

CURRAN, B. *et al.* Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v. 42, p. 5644-5649, 2004.

DEUS, B.P.M. *et al.* Sintomas e complicações agudas relacionadas com a hemodiálise. **Rev Epidemiol Control Infect**, v. 5, n. 1, p. 52-56, 2015 .

DRAIBE, S.A. **Panorama da doença renal crônica no Brasil e no mundo**. Universidade Federal do Maranhão. São Luís: UNASUS/UFMA, 2014. Disponível em: http://repcursos.unasus.ufma.br/nefro_20142/modulo_3/und1/media/pdf/livro_pdf.pdf. Acesso em: março de 2020.

EUROFARMA. Hemolenta. **Guia de produtos**. 2023. Disponível em: <https://eurofarma.com.br/produtos/hemolenta>. Acesso em: junho de 2023.

FARMACOPEIA Brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019. 2 v.

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 (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.

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**. Monografia (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

FIGEL, I.C.; DALZOTO, P.R.; PIMENTEL, I. C. Microbiological quality of water and dialysate from haemodialysis units in Southern Brazil. **Rev Inst Adolfo Lutz.**, v. 74. p. 66-70, 2015.

GLORIEUX, Griet *et al.* Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 27, n. 11, p. 4010-4021, 2012.

GOMILA, Margarita *et al.* Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 52, p. 101-114, 2005.

HART, Christian. Segurança do paciente em serviços de diálise. **Revista da Associação Brasileira dos Centros de Dialise e Transplante**, Brasília- DF, 3 v., p.3, 2018.

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

HONG, J. S. Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. **Microb Drug Resist**, v. 26, n. 6, p. 605-610, 2020.

INTERNATIONAL SOCIETY OF NEPHROLOGY. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney Int**, v. 3, p. 1-150, 2013. Suppl.

JESUS, G.P.; ALMEIDA, A.A. Principais problemas gerados durante a terapia de hemodiálise associados à qualidade da água. **Rev. Eletrôn. Atualiza Saúde**, Salvador, v. 3, n. 3, p. 41-52, jan./jun. 2016.

JESUS, P. R. de *et al.* Detection of microorganisms, endotoxins and aluminum in mobile dialysis services. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 39, n. 4, p. 475-479, Oct.-Dec, 2017.

JESUS, P.R. *et al.* Monitoramento da qualidade da água utilizada nos serviços de diálise móvel em unidades de tratamento intensivo no município do Rio de Janeiro. **Braz. J. Nephrol.**, v. 44, n. 1, p. 32-41, jul. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbn/a/qNmM3vwfsZwJ5ZzQWrnVVsq/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: outubro de 2022.

JORGENSEN, J.H.; Pfaller, MA. **Manual of clinical microbiology**. 11. ed. Washington D.C.: American Society of Microbiology. 2015.

KIM, S. *et al.* Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 32-39, 2020.

LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 207-222, 2002.

LEE, C.S. *et al.* Rapid and Sensitive Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in Chlorinated Water and Aerosols targeting *gyrB* gene using Realtime PCR. **J Appl Microbiol**, v. 111, n. 4, p. 893-903, 2011.

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 Int**, v. 76, p. S112-119, 2000.

LUGON, J. R.; STROGOFF, J. P.; WARRAK, E. A. Hemodiálise. *In*: RIEELA, M. C. **Princípios de Nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003. p.869-890.

MAGALHÃES, M. *et al.* Polyclonal outbreak of Burkholderia cepacia complex bacteraemia in haemodialysis patients. **Jornal of Hospital Infection**, v. 54, p. 120-123, 2003.

MARTINS, V. Água de clínica onde 35 passaram mal estava contaminada, diz laudo. **G1 Goiás (jornal online)**, Goiás, 2016. Disponível em: <http://g1.globo.com/goias/noticia/2016/07/agua-de-clinica-onde-35-passaram-mal-estava-contaminada-diz-laudo.html>. Acesso em: outubro de 2022.

MELO, F.A.F. **Epidemiologia da injúria renal aguda**: estudo prospectivo, multicêntrico e populacional no estado do Acre. 2017. 131 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

MOZENA, L. B. **Ação do ácido peracético e do hipoclorito de sódio no biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas da água de hemodiálise de um hospital público, na cidade de Botucatu**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/203868/000898239.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: março de 2020.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION.K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. **Am J Kidney Diseases**, v. 39, p. S1-S266, 2002, supl. 1.

NERBASS, F. B. *et al.* Pesquisa Brasileira de Diálise 2020. **J. Bras. Nefrol.**, v. 44, n. 3, p. 349-357, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbn/a/3Jts9Jdpcy5vc5MFjdMwV3g/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: junho de 2023.

MAGLIO NETO, C.; D'AVILA, R. **Tratamento de água para hemodiálise: conceitos e recomendações**. São Paulo: EDUC, 172 p. 2020.

OIE, S. *et al.* Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, v. 54, p. 115-119, 2003.

PACHORI, P.; GOTHALWAL, R.; GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes e diseases**, v. 6, p. 109-119, 2019.

PAIXÃO, A. O. R. *et al.* Monitoring water quality in hospitals: a longitudinal Descriptive study on detection of critical points. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, Aracaju, v. 9, n. 1, p. 159-174, 2022.

PEGORARO, L. A. **Validação de metodologia analítica aplicada ao controle da qualidade de água para hemodiálise para fins de credenciamento junto ao Inmetro**. Projeto Hemotec II. Curitiba: Tecpar; Finep, 2005.

PESSOA, V. da S. ***Pseudomonas aeruginosa***: Epidemiologia e resistência a antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, São Paulo, 2013.

PESQUISA de Patógenos em Produtos Não Estéreis e matérias-primas de uso em sua fabricação e água para diálise. *In*: INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (Brasil). **Manual da Qualidade**. Rio de Janeiro, 2008. (65.3210.008)

PRESTEL, C. *et al.* Dialysis Water Supply Faucet as Reservoir for Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 10, October 2022.

PIMENTEL, M. M. *et al.* **Genética Essencial**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013.

PISANI *et al.* Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1-2, p. 51-56, 2000.

PIZZARELLI, F. *et al.* Dialysis water treatment systems and monitoring in Italy: results of a national survey. **Journal of Nephrology**, v. 17, p. 565-569, 2004.

PONCE *et al.* Injúria renal aguda em unidade de terapia intensiva: Estudo prospectivo sobre a incidência, fatores de risco e mortalidade. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 321-326, 2011.

PRAMODHINI, S. *et al.* Detection of virulence determinants and its association with drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Res Med Sci**, 2016.

ROMÃO JUNIOR, J. E. **O rim e suas doenças**. *In*: Sociedade Brasileira de Nefrologia. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/Publico/rim.htm>. São Paulo, SP, 2004. Acesso em: 11 ago. 2015.

RUDRA, B. *et al.* Phylogenomic and comparative genomic studies robustly demarcate two distinct clades of *Pseudomonas aeruginosa* strains: proposal to transfer the strains from an outlier clade to a novel species *Pseudomonas paraeruginosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2022. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005542#tab2>. Acesso em: junho de 2023.

RUIZ-ROLDÁN, L. Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 2021.

QI-MIN TEO, J. Genomic characterization of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore. **Emerging Microbes & Infections**, v. 10, 2021.

SABAT, A. J. *et al.* Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Eurosurveillance**, v. 18, p. 17-30, 2013.

SAEKI, E. K. Phenotypic research of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from public water supply. **Scientia Plena**, Londrina, v. 16, 2020.

SANTOS, Fernando *et al.* Detecção de endotoxina pelo teste do *Limulus Amoebocyte Lysate* (LAL) em unidades de hemodiálise. **Medicina On Line**, v. 1, n. 6, out./dez. 2000.

SBN. **O que é hemodiálise**. São Paulo, 2023. Disponível em: <https://sbn.org.br/publico/tratamentos/hemodialise/>. Acesso em: 20 out. 2019.

SCHIFFFL, H. *et al.* Effects of ultrapuredialysis fluid on nutritional status and inflammatory parameters. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, p. 1863-1869, 2001.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO PARANÁ (SESA). Dispõe sobre as condições para realização de terapia renal substitutiva à beira do leito, em unidades intra-hospitalares fora da unidade de diálise, por meio de serviços de diálise móvel, próprios ou terceirizados. Resolução SESA nº 437, de 08 de agosto de 2013. **Diário Oficial do Estado do Paraná nº 9019**, de 12 de agosto de 2013, Curitiba.

SHAHRI, F. N. *et al.* Antimicrobial resistance, virulence factors, and genotypes of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Gorgan, northern Iran. **International Microbiology**, v. 25, p. 709-721, 2022.

SIMÕES *et al.* Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p. 173-178, 2005.

SIMÕES, Marise; PIRES, Maria de Fátima C. Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.63, n.2, p.224-31, 2004.

SIVIERO, Pamila Cristina Lima *et al.* Insuficiência renal crônica no Brasil segundo enfoque de causas múltiplas de morte. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 75-85, 2014.

SNUSTAD, P.; SIMONS, M.J. **Fundamentos de Genética**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SBPC. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): boas práticas em microbiologia clínica**. Barueri, SP: Manole; Minha Editora, 2015.

SOUSA, Maiana Regina Gomes de *et al.* Eventos adversos em hemodiálise: relatos de profissionais de enfermagem. **Rev Esc Enferm USP**, v. 47, n. 1, p. 76-83, 2013.

SOUSA *et al.* Prevalência de eventos adversos em uma unidade de hemodiálise. **Rev enferm UERJ**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 6, 2016.

SOUZA, B.G.A. **Qualidade microbiológica de água tratada para hemodiálise e caracterização de bactérias patogênicas**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

TENA, D. *et al.* 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.

THE UNITED States Pharmacopeia 40. United States Pharmacopeial Convention. 40. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2017.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Version 9.0. 2019. Disponível em: <http://www.eucast.org>. Acesso em: março de 2020.

THOME *et al.* Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. **Braz. J. Nephrol.**, v. 41, n. 2, p. 208-214, 2019.

VASCONCELOS, Patrícia Daniele Silva de. **Monitoramento da água de diálise: um estudo de caso em uma clínica do município de Recife.** Monografia (Especialização em Gestão de Sistemas e Serviços de Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Ageu Magalhães, Rio de Janeiro, 2012.

VERSALOVIC, James *et al.*, **Manual of clinical microbiology**. 10. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2011.

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

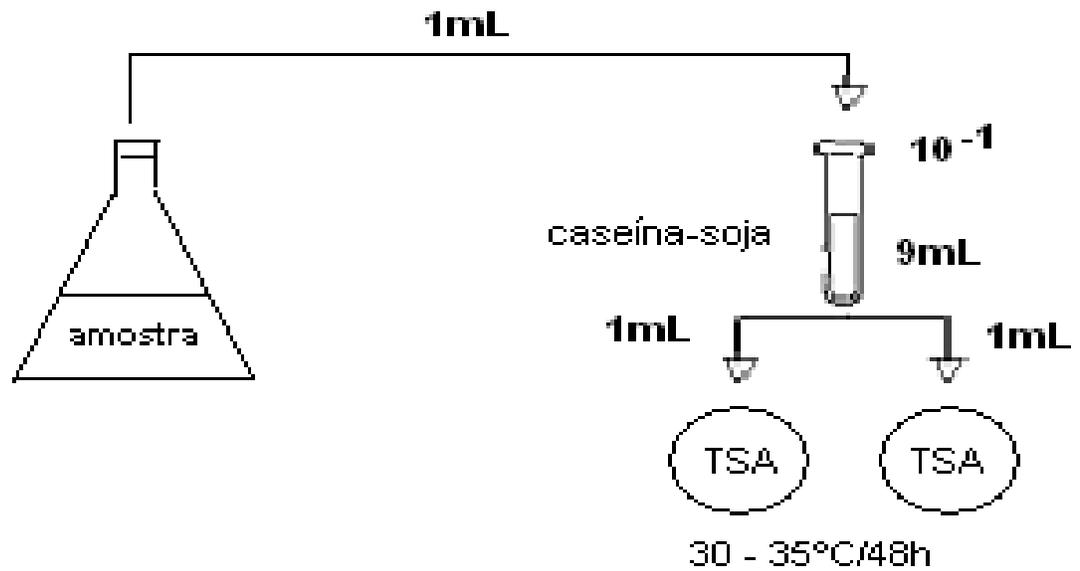
WANG, Susan A. *et al.* An outbreak of Gram-negative bacteremia in haemodialysis patients traced to haemodialysis machine waste drain ports. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 20, p. 746-741, 1999.

WAHRHAFTIG, K.M.; CORREIA, L.C.L.; SOUZA, C.A.M. Classificação de RIFLE: análise prospectiva da associação com mortalidade em pacientes críticos. **Jornal Bras. Nefrologia**, v. 34, n. 4, p. 369-377370, 2012.

WHITMAN, W. B. *et al.* **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK., 2015. Disponível em: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=GQtZEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA16&dq=metais+pesados+na+%C3%A1gua+de+hemodialise&ots=oM3ERaZn0F&sig=JUTmJ7s1CYOneUmo5SnILHfXKAI&redir_esc=y#v=onepage&q=metais%20pesados%20na%20%C3%A1gua%20de%20hemodialise&f=false. Acesso em: abril de 2020.

WIDER, M.C. Toxina produzida pela *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de combater linhagens da bactéria resistentes a antibióticos: estudo revela estrutura e mecanismo de ação da piociana S8. **CEPID Redoxoma**. São Paulo, 2020. Disponível em: <https://redoxoma.iq.usp.br/noticias.php/toxina-produzida-pela-pseudomonas-aeruginosa-e-capaz-de-combater-linhagens-da-bacteria-resistentes-a-antibioticos>. Acesso em: maio de 2023.

APÊNDICE 1 - ESQUEMA DO ENSAIO PARA CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS

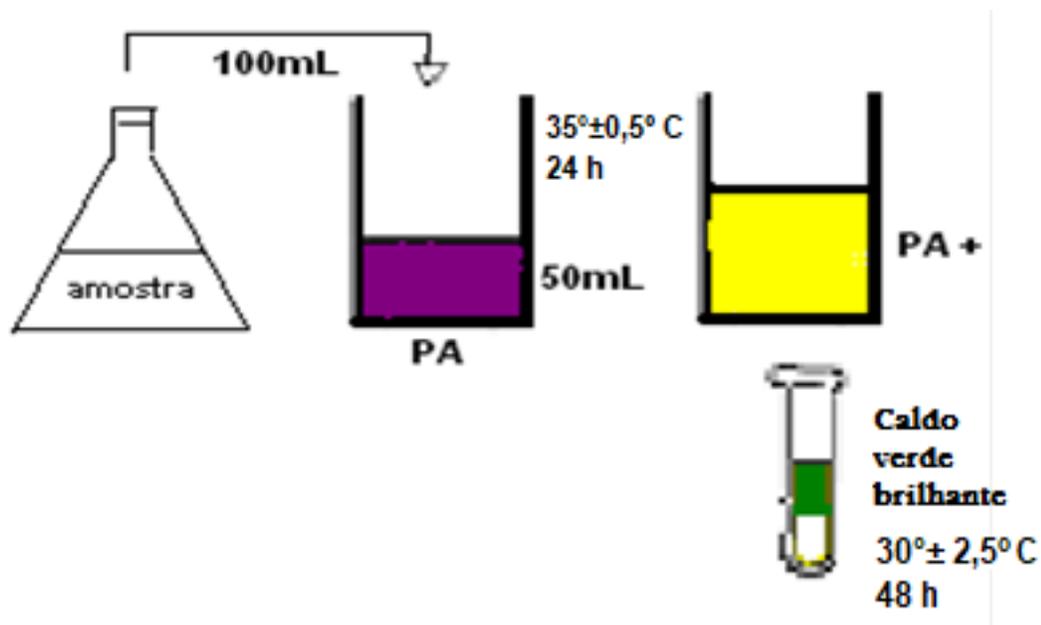


Caseína-soja: meio líquido utilizado para diluição da amostra

TSA: meio de cultura ágar caseína-soja

Fonte: Adaptado de Farmacopeia Brasileira (2019).

APÊNDICE 2 - ESQUEMA DA METODOLOGIA DO ENSAIO DE PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS



PA: Caldo Presença-Ausência em tripla concentração

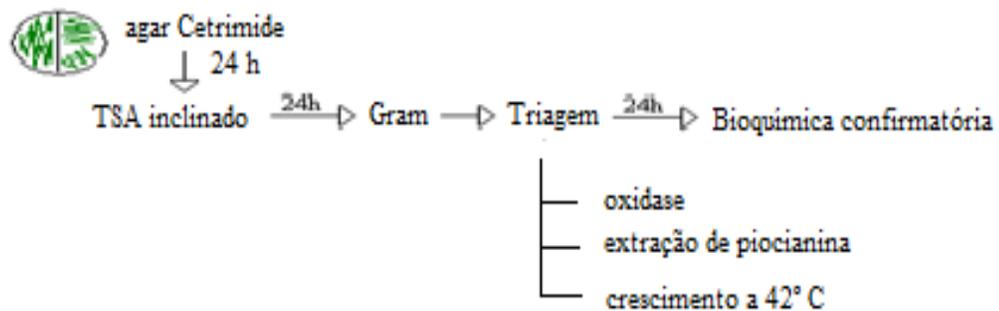
PA+: Caldo Presença-Ausência com resultado positivo

Caldo verde brilhante: Caldo seletivo utilizado para confirmação da presença de coliformes totais.

Fonte: Adaptado de Farmacopeia Brasileira (2019).

APÊNDICE 3 - TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE *P. AERUGINOSA*

PESQUISA DE *Pseudomonas aeruginosa*



TSA inclinado – ágar caseína soja inclinado

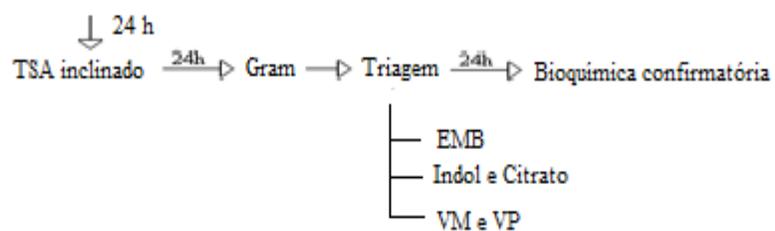
Fonte: Adaptado de WHITMAN *et al.* (2015).

APÊNDICE 4 - TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE E. COLI

PESQUISA DE *Escherichia coli*



agar Mac Conkey



TSA inclinado – ágar caseína soja inclinado

EMB- ágar Eosina azul de metileno

VM- Vermelho de metila

VP- Voges Proskauer

Fonte: Adaptado de WHITMAN *et al.* (2015).

APÊNDICE 5 - RESULTADOS CONTAGEM DE BACTÉRIAS AERÓBIAS

Tabela Suplementar 1 – Contagem total de bactérias aeróbias nas amostras de água obtidas em 3 diferentes pontos de coleta em 22 unidades hospitalares do município do Rio de Janeiro nos serviços de diálise móvel nos anos de 2017 a 2019

Local da coleta	Ano de coleta	Pré-osmose (UFC/ml)	Pós-osmose (UFC/ml)	Solução de diálise (UFC/ml)
Hospital 1	2017	<10	<10	1,5 x 10³
	2018	<10	<10	2,6 x 10³
	2019	<10	1,2 x 10²	1,5 x 10³
Hospital 2	2017	<10	1,2 x 10³	1,0 x 10³
	2018	<10	1,6 x 10³	1,5 x 10⁴
	2019	<10	<10	<10
Hospital 3	2017	<10	1,2 x 10³	2,1 x 10³
	2018	<10	<10	2,5 x 10³
	2019	<10	<10	NC
Hospital 4	2017	1,9 x 10³	<10	<10
	2018	2,3 x 10⁴	2,0 x 10³	<10
	2019	<10	<10	NC
Hospital 5	2017	1,6 x 10⁴	1,0 x 10³	1,2 x 10³
	2018	1,6 x 10⁴	2,1 x 10⁴	3,0 x 10⁴
	2019	<10	<10	NC
Hospital 6	2017	<10	1,0 x 10⁴	1,2 x 10⁴
	2018	1,0 x 10³	1,2 x 10⁴	<10
	2019	1,9 x 10²	2,3 x 10³	<10
Hospital 7	2017	3,6 x 10²	1,0 x 10³	1,5 x 10³
	2018	1,6 x 10⁴	2,1 x 10⁴	3,0 x 10⁴
	2019	1,2 x 10²	1,0 x 10³	1,5 x 10³
Hospital 8	2017	<10	1,0 x 10³	1,2 x 10⁴
	2018	<10	1,9 x 10³	2,0 x 10³
	2019	<10	NC	NC
Hospital 9	2017	<10	1,5 x 10³	1,2 x 10⁴
	2018	<10	1,2 x 10³	1,6 x 10³
	2019	<10	NC	NC

Hospital 10	2017	<10	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
	2018	<10	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
	2019	$1,6 \times 10^3$	NC	NC
Hospital 11	2017	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	<10
	2018	$1,6 \times 10^4$	<10	<10
	2019	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$
Hospital 12	2017	<10	$1,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$
	2018	<10	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
Hospital 13	2017	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
	2018	$3,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
Hospital 14	2017	$1,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$
	2018	$1,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
Hospital 15	2017	$1,0 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$
	2018	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
Hospital 16	2017	$1,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
	2018	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
Hospital 17	2017	<10	<10	$2,0 \times 10^4$
	2018	<10	$1,0 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$
Hospital 18	2017	<10	$1,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$
	2018	<10	<10	$2,6 \times 10^3$
Hospital 19	2017	$2,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
	2018	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Hospital 20	2017	<10	$1,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
	2018	<10	<10	<10
Hospital 21	2017	$1,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$
	2018	$1,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
Hospital 22	2017	<10	$1,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
	2018	<10	<10	$2,3 \times 10^2$

Valores consideradas insatisfatórias >500 UFC/ml (pré-osmose), >100 UFC/ml (pós osmose) e >200 UFC/ml (solução de diálise) (BRASIL, 2017; BRASIL, 2014). NC – não houve coleta.

APÊNDICE 6 - IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR PONTO DE COLETA

Tabela Suplementar 2 – Cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* isoladas por pontos de coleta de 22 unidades hospitalares do município do Rio de Janeiro nos serviços de diálise móvel nos anos de 2017 a 2019

Local da Coleta	Ano de Coleta	Pré-osmose	Pós-osmose	Solução de diálise
Hospital 1	2017	-	-	PA 55
	2018	-	-	PA 70
	2019	-	PA 56 EC 06	PA 57 EC 07
Hospital 2	2017	-	PA 58	PA 59
	2018	-	PA 60	PA 61
	2019	-	-	-
Hospital 3	2017	-	PA 62	PA 63
	2018	-	-	PA 64
	2019	-	-	-
Hospital 4	2017	PA 65	-	-
	2018	PA 66	PA 67	-
	2019	-	-	-
Hospital 5	2017	PA 01	PA 02	PA 03
	2018	PA 04	PA 05	PA 06
	2019	-	-	-
Hospital 6	2017	-	PA 68	PA 69
	2018	PA 70 PA 71	PA 72 PA 73	-
		2019	PA 74 EC 08	PA 75 EC 09
Hospital 7	2017	PA 07	PA 08	PA 09
	2018	PA 10	PA 11	PA 12
	2019	PA 13 EC 01	PA 14 EC 02	PA 15 EC 03
Hospital 8	2017		PA 76 PA 77	PA 78 PA 79
		2018	-	PA 80
	2019	-	-	-
Hospital 9	2017	-	PA 82	PA 83
	2018	-	PA 84	PA 85
	2019	-	-	-
Hospital 10	2017	-	PA 86	PA 87
	2018	-	PA 88	PA 89
	2019	PA 90	-	-
Hospital 11	2017	PA 91 PA 92	PA 93 PA 94	-
		2018	PA 95	-
	2019	PA 16 EC 04	PA 17 EC 05	PA 18
Hospital 12	2017	-	PA 96	PA 97
	2018	-	PA 98	PA 99
Hospital 13	2017	PA 19	PA 20	PA 21

	2018	PA 22	PA 23	PA 24
Hospital 14	2017	PA 25	PA 26	PA 27
	2018	PA 28	PA 29	PA 30
Hospital 15	2017	PA 31	PA 32	PA 33
	2018	PA 34	PA 35	PA 36
Hospital 16	2017	PA 37	PA 38	PA 39
	2018	PA 40	PA 41	PA 42 EC 10
Hospital 17	2017	-	-	PA 100 PA 101
	2018	-	PA 102	PA 103
Hospital 18	2017	-	PA 104	PA 105
	2018	-	-	PA 106
Hospital 19	2017	PA 43	PA 44	PA 45
	2018	PA 46	PA 47	PA 48
Hospital 20	2017	-	PA 107	PA 108
	2018	-	-	-
Hospital 21	2017	PA 49	PA 50	PA 51
	2018	PA 52	PA 53	PA 54
Hospital 22	2017	-	PA 109	PA 110
	2018	-	-	PA 111

APÊNDICE 7 – PERFIL DE RESISTÊNCIA DAS CEPAS DE *P. AERUGINOSA*

Tabela Suplementar 3 - Perfil de resistência das cepas de *P. aeruginosa*

Perfil	Característica	Cepas	N
RA 1	Gentamicina/Cefepime/ Ceftazidima	PA 65	1
RA 2	Gentamicina/Cefepime	PA 52	1
RA 3	Gentamicina/Ceftazidima	PA 33, PA 43	2
RA 4	Gentamicina	PA 04, PA 05, PA 08, PA 09, PA 17, PA 49, PA 50, PA 64, PA 72, PA 73, PA 83, PA 97	12
RA 5	Cefepime	PA 01, PA 19, PA 30	3
RA 6	Imipenem	PA 34	1
RA 7	Sensível a todos os antibióticos	PA 02, PA 03, PA 06, PA 07, PA 10, PA 11, PA 12, PA 13, PA 14, PA 15, PA 16, PA 18, PA 19, PA 20, PA 21, PA 22, PA 23, PA 24, PA 25, PA 26, PA 27, PA 28, PA 29, PA 30, PA 31, PA 32, PA 35, PA 36, PA37, PA 38, PA 39, PA 40, PA 41, PA 42, PA 44, PA45, PA 46, PA 47, PA 48, PA 51, PA 53, PA 54, PA 55, PA 56, PA 57, PA 58, PA 59, PA 60, PA 61, PA 62, PA 63, PA 65, PA 66, PA 67, PA 68, PA 69, PA 70, PA 71, PA 74, PA 75, PA 76, PA 77, PA 78, PA 79, PA 80, PA 81, PA 82, PA 84, PA 85, PA 86, PA 87, PA 88, PA 89, PA 90, PA 91, PA 92, PA 93, PA 94, PA 95, PA 96, PA 98, PA 99, PA 100, PA 101, PA 102, PA 103, PA 104, PA 105, PA 106, PA 107, PA 108, PA 109, PA 110, PA 111	91

APÊNDICE 8 – PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS CEPAS DE *E. COLI*

Tabela Suplementar 4 - Perfil de resistência a antimicrobianos (RA) das cepas de *E. coli*

Perfil	Característica	Cepas	N
RA 1	Cefuroxima/Aztreonam/Ceftazidima/ Cefepime/Gentamicina	EC 02, EC 03	2
RA 2	Cefuroxima/Aztreonam Cefepime/Gentamicina	EC 04	1
RA 3	Cefuroxima/Ceftazidima/ Cefepime/	EC 07	1
RA 4	Cefuroxima/Aztreonam	EC 06	1
RA 5	Cefuroxima	EC 01	1
RA 6	Ceftazidima	EC 08	1
RA 7	Sensível a todos os antibióticos	EC 05, EC 09, EC 10	3

APÊNDICE 9 – RESULTADOS DOS TESTES DE VIRULÊNCIA POR CEPAS POSITIVAS

Tabela Suplementar 5 - Resultados dos testes de fatores de virulência por cepas analisadas

Fatores de Virulência cepas de *P. aeruginosa*

Fator de virulência	Cepas	N
Atividade proteolítica	PA07, PA42, PA46, PA48, PA50, PA51, PA55, PA73	8/111
Fosfolipase C	PA02, PA05, PA10, PA13, PA18, PA19, PA21, PA22, PA23, PA24, PA25, PA26, PA27, PA28, PA29, PA30, PA31, PA33, PA34, PA35, PA36, PA37, PA38, PA39, PA40, PA41, PA44, PA54, PA80, PA82, PA83, PA84, PA85, PA91, PA92, PA94, PA108, PA109	39/111
Gelatinase	PA01, PA02, PA03, PA04, PA05, PA06, PA07, PA08, PA09, PA10, PA11, PA12, PA13, PA14, PA15, PA16, PA17, PA18, PA19, PA20, PA21, PA22, PA23, PA24, PA25, PA26, PA31, PA32, PA33, PA37, PA38, PA40, PA42, PA43, PA45, PA46, PA47, PA48, PA49, PA50, PA51, PA52, PA53, PA54, PA55, PA56, PA57, PA58, PA59, PA60, PA61, PA62, PA63, PA64, PA65, PA66, PA67, PA68, PA69, PA70, PA71, PA72, PA73, PA74, PA75, PA76, PA77, PA78, PA79, PA80, PA81, PA83, PA84, PA85, PA86, PA87, PA88, PA89, PA90, PA91, PA92, PA93, PA95, PA96, PA97, PA98, PA99, PA100, PA101, PA102, PA103, PA104, PA105, PA106, PA107, PA108, PA109, PA110, PA111	99/111
Atividade hemolítica (α)	PA01, PA02, PA03, PA04, PA05, PA06, PA07, PA08, PA09, PA10, PA11, PA12, PA13, PA14, PA16, PA17, PA18, PA19, PA21, PA22, PA23, PA24, PA25, PA26, PA31, PA32, PA38, PA40, PA42, PA43, PA45, PA46, PA47, PA48, PA49, PA50, PA51, PA52, PA53, PA54, PA55, PA56, PA57, PA58, PA59, PA60, PA61, PA62, PA63, PA64, PA65, PA66, PA67, PA68, PA69, PA70, PA71, PA72, PA73, PA74, PA75, PA76, PA77, PA78, PA79, PA81, PA83, PA84, PA85, PA86, PA87, PA88, PA89, PA90, PA91, PA92, PA93, PA95, PA96, PA97, PA98, PA100, PA101, PA102, PA103, PA104, PA105, PA106, PA107, PA108, PA109, PA110, PA111	94/111
Atividade hemolítica (β)	PA15, PA20, PA33, PA37, PA80	5/111
Fatores de virulência cepas de <i>E. coli</i>		
Fator de virulência	Cepas	N
Fosfolipase C	EC01, EC02, EC03, EC04, EC05, EC06, EC07, EC08, EC09, EC10	10/10

APÊNDICE 10 – PERFIL DE VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *P. AERUGINOSA*

Tabela Suplementar 6 - Perfil de virulência das cepas de *P. aeruginosa*

Perfil	Característica	Cepas	N
V1	Atividade proteolítica/ Gelatinase/Atividade hemolítica	PA07, PA42, PA46, PA48, PA50, PA51, PA55, PA73	8
V2	Fosfolipase C /Gelatinase/Atividade hemolítica	PA02, PA05, PA10, PA13, PA18, PA19, PA21, PA22, PA23, PA24, PA25, PA26, PA31, PA33, PA37, PA38, PA40, PA54, PA80, PA83, PA84, PA85, PA91, PA92, PA108, PA109	26
V3	Gelatinase/Atividade hemolítica	PA01, PA03, PA04, PA06, PA08, PA09, PA11, PA12, PA14, PA15, PA16, PA17, PA20, PA32, PA43, PA45, PA47, PA49, PA52, PA53, PA56, PA57, PA58, PA59, PA60, PA61, PA62, PA63, PA64, PA65, PA66, PA67, PA68, PA69, PA70, PA71, PA72, PA74, PA75, PA76, PA77, PA78, PA79, PA81, PA86, PA87, PA88, PA89, PA90, PA93, PA95, PA96, PA97, PA98, PA99, PA100, PA101, PA102, PA103, PA104, PA105, PA106, PA107, PA110, PA111	65
V4	Fosfolipase C	PA27, PA28, PA29, PA30, PA34, PA35, PA36, PA39, PA41, PA44, PA82, PA94	12