

# Diversidade Genética e Produção de Biofilme de Amostras de *Pseudomonas Aeruginosa* Isoladas da Água Utilizada em Unidades de Terapia Renal Substitutiva

## Genetic Diversity and Production of Biofilm of *Aeruginosa Pseudomonas* Samples Isolated from Water Used in Units of Renal Replacement Therapy

### Resumo

A terapia renal substitutiva, ou hemodiálise, é um tratamento primordial para pacientes com insuficiência renal crônica. A água é essencial para a terapia de hemodiálise, tanto na produção do fluido como na reutilização dos dialisadores. A contaminação bacteriana dos fluidos de hemodiálise é um grave problema nesta terapia, uma vez que excessivos níveis de bactérias nesta solução são responsáveis por reações pirogênicas. Estudos mostram que a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* é a mais isolada como contaminante de fluidos de hemodiálise. Nesta pesquisa avaliamos amostras de *P. aeruginosa* oriundas de três pontos de coleta em seis Unidades de Terapia Renal Substitutiva (UTRS) do Estado do Rio de Janeiro. As UTRS escolhidas apresentaram valores insatisfatórios de contagem de bactérias heterotróficas, sendo isolada a bactéria *P. aeruginosa* em diversos anos consecutivamente. Estas amostras foram avaliadas quanto à produção de biofilme, resistência aos antimicrobianos e a diversidade genética. Na amostragem avaliada nenhuma amostra de *P. aeruginosa* mostrou resistência aos antimicrobianos empregados na prática clínica, tais como os aminoglicosídeos, fluorquinolonas, carbapenemas e  $\beta$ -lactâmicos utilizados para o tratamento de infecções por esta bactéria. Foi verificado também que todas as amostras analisadas eram fortemente produtoras de biofilme. Utilizando a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, por eletroforese em gel de campo pulsado, foi observado que na maioria das vezes o mesmo clone de *P. aeruginosa* foi encontrado nos três pontos de coleta analisados numa mesma data. Esta metodologia também possibilitou a determinação do tempo de persistência de uma amostra bacteriana no sistema de tratamento de água de hemodiálise. Deste modo, detectamos clones de *P. aeruginosa* ao longo de até três anos nas clínicas analisadas. Um fato interessante foi a detecção do clone I em três clínicas analisadas. Portanto, podemos sugerir que a determinação da diversidade genética das amostras bacterianas, oriundas de água de hemodiálise, seja um instrumento adicional para avaliar o sistema de purificação de água das clínicas de hemodiálise. Este método pode indicar a persistência de clones, produtores de biofilmes, que não estão sendo efetivamente eliminados por procedimentos de desinfecção. Este procedimento pode contribuir para a melhoria da qualidade dos fluidos de hemodiálise e, conseqüentemente, a garantia da sobrevivência de pacientes com doenças renais crônicas.

**Palavras-chave:** Hemodiálise, contaminação bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*

### Abstract


The substitutive renal therapy or hemodialysis is a primary treatment for patients suffering from chronic renal failure. The water is essential for hemodialysis and the bacterial contamination of hemodialysis fluids is a serious problem in this therapy, since excessive levels of bacteria are responsible for pyrogenic reactions. Some studies had showed that *Pseudo-*

Joana Angelica Barbosa Ferreira  
Hilda do Nascimento Nobrega  
Veronica Viana Vieira  
Shirley de Mello Pereira Abrantes

Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde – INCQS/  
FIOCRUZ

### Correspondências:

Shirley de Mello Pereira Abrantes  
shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br



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

**Keywords:** Hemodialysis, bacterial contamination, *Pseudomonas aeruginosa*

## Introdução

---

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

A importância da hemodiálise pode ser evidenciada por dados que registram que, no ano de 2008, cerca de 87 mil brasileiros foram submetidos a este tratamento. Entre estes, poucos conseguem recuperar o funcionamento dos rins e apenas um pequeno número de pacientes consegue ser submetido a um transplante renal (OLIVEIRA, ROMÃO JR, e ZATZ, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2009).

A água é essencial para a terapia de hemodiálise, tanto na produção do fluido como na reutilização dos dialisadores. O fluido de diálise ou dialisato, que banha o dializador (membrana semipermeável) não é uma solução estéril, é composta por uma mistura de água e concentrado polieletrólítico numa proporção de 34:1 (VORBECK-MEISTER et al., 1999). Durante uma sessão de tratamento por hemodiálise aproximadamente 120 litros de água purificada, misturados em proporções adequadas ao chamado concentrado polieletrólítico para hemodiálise, são utilizados na depuração do sangue, sendo assim, a qualidade da água é fundamental para evitar riscos adicionais à saúde do paciente (BOMMER e JABER, 2006).

O tratamento da água para hemodiálise é mais rigoroso do que o da água potável, sendo necessário um sistema de purificação adicional onde a água utilizada deve ser potável. Alguns

elementos de toxicidade conhecida, tais como: alumínio, flúor, mercúrio, cobre entre outros e substâncias como endotoxinas bacterianas e cianotoxinas devem ter concentração controlada na água para hemodiálise (BRASIL, 2004, FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2002).

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

Existem sistemas de purificação de água para hemodiálise compostos de diferentes combinações de tratamento para assegurar a qualidade da água resultante. O pré-tratamento é realizado para retirar substâncias e partículas da água que podem danificar os equipamentos de purificação, diminuindo a sua eficiência. Filtros de areia, abrandadores, filtros de carvão ativado são utilizados para o pré-tratamento. Os sistemas de purificação utilizam a água pré-tratada e diferentes processos de filtração podem ser utilizados, tais como: filtração por osmose reversa, por troca iônica e outros, que permitem a remoção de partículas, sais e íons, outros ainda retêm bactérias da fase líquida, antes da água ser entregue as unidades de hemodiálise (VORBECK-MEISTER et al., 1999). Segundo o censo realizado em 2008 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, no Brasil 93,7% das clínicas de hemodiálise utilizam em seus sistemas de tratamento da água a filtração por osmose reversa, 5,6% utilizam a filtração por osmose reversa e deionização e 0,7% utilizam apenas o processo de deionização (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2009).

A água purificada é armazenada em reservatórios e distribuída por tubulações para as máquinas. O projeto das tubulações deve evitar zonas mortas e volumes de água que não circulem. É recomendado que a água circule constantemente para evitar proliferação bacteriana. O sistema deve ser projetado de forma a facilitar a limpeza, desinfecção e enxágue do desinfetante (CALDERARO e BISCHOFBERGER, 1998).

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

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

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

A bacteremia é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes de hemodiálise e tem sido atribuída a diferentes causas (AAMI, 2004). A infecção pelo acesso vascular é a causa mais comum devido a cuidados inadequados com o cateter (TENA, et al., 2005; LO CASCIO et al, 2006), entretanto, alguns estudos observaram uma relação direta entre a ocorrência de casos de bacteremia causadas por bactérias e o isolamento desses microrganismos a partir da água purificada, possivelmente devido a defeitos na integridade da membrana ou a utilização de água contaminada no reprocessamento das máquinas de diálise (MAGALHÃES et al., 2003; WANG, 1999; YAN et al., 2008).

A água purificada contém predominantemente bactérias heterotróficas do ambiente aquático como as espécies da classe *Pseudomonadales*, que podem crescer nos circuitos de água e nas máquinas de hemodiálise e, subsequentemente, contaminar o dialisato (BOMMER & JABER, 2006). Alguns estudos sobre identificação dos contaminantes bacterianos da água utilizada para hemodiálise indicam que o gênero bacteriano predominante é *Pseudomonas* (MORIN, 2000). Consequentemente tem sido sugerido que as amostras de água para hemodiálise deveriam ser testadas para a presença de bactérias indicadoras definidas,

tais como "*Pseudomonas*", em volumes de pelo menos 100 mL. Na Itália e Alemanha a legislação estabelece o limite de 1 UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* na água para hemodiálise (VORBECH-MEISTER et al., 1999; NYSTRAND, 2008). Atualmente várias discussões têm abordado o uso de dialisatos ultrapuros, que possuem limites de contagem menores que 0,1 UFC/mL e nível de endotoxina menor que 0,03 EU/mL para prevenir a inflamação crônica em pacientes em tratamento por hemodiálise e possíveis infecções devido às contaminações do dialisato (AAMI, 2004; ARIZONO et al., 2004; WARD, 2004; BOMMER e JABER, 2006). Em alguns países da Europa e no Japão o fluido de diálise ultrapuro está sendo amplamente utilizado (MASAKANE et al., 2008; NYSTRAND, 2008).

Embora o papel da qualidade da água usada para a hemodiálise tenha sido enfatizado por vários autores, não existe uma padronização universal que inclua todos os parâmetros químicos e microbiológicos (NYSTRAND, 2001; TRAGER, 2002). Existem diversas recomendações oficiais, para os parâmetros de qualidade microbiológicos da água de hemodiálise, publicadas por órgãos governamentais e por organizações internacionais, sendo a mais amplamente utilizada da *Association Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI, 2004). Uma vez que a pureza do dialisato está relacionada com complicações agudas e crônicas em pacientes em tratamento por hemodiálise, os limites de contagem microbiana e de endotoxina têm sido reduzidos (WARD, 2004). Em 1981, a AAMI recomendava o limite de 2000 UFC/mL para o dialisato, 200 UFC/mL para a água purificada e não havia limite para endotoxinas, atualmente há o limite de 200 UFC/mL e 2 EU/mL para o dialisato (AAMI, 2004).

Alguns estudos mostraram a importância de manter a contagem bacteriana de 100 UFC/ml no dialisato para prevenir complicações clínicas oriundas da contaminação bacteriana do fluido de diálise (LONNEMANN, 2000; BRUNET & BERLAND, 2000). Em vários países da Europa e no Japão o limite de contagem microbiana foi reduzido para 100 UFC/mL (NYSTRAND, 2008). Atualmente, as Farmacopeias Europeia e a Americana também recomendam o valor de 100 UFC/mL para água purificada (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008 e THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2008). Nystrand (2008) alerta que as diferentes recomendações dos parâmetros para a qualidade da água de hemodiálise se referem a diferentes técnicas de cultivo bacteriano, o que pode gerar interpretações equivocadas destes limites.

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

reiras naturais ou perda da imunidade, embora possa em algumas ocasiões, fazer parte da flora normal de indivíduos sadios (POLLACK, 2000).

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

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

O biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células microbianas protegidas por uma matriz polissacarídica ou proteica que é sintetizada pelas células e aderente tanto a superfícies inertes ou vivas. Esta matriz é formada fundamentalmente por água e substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances*) (DONLAN, 2002; WIMPENNY, MANZ e SZEZYK, 2000).

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

Nos ecossistemas terrestres e aquáticos os microrganismos aparecem como células livres (estado planctônico) ou sob a forma de biofilmes ligados a suportes sólidos. Na última década, os biofilmes microbianos foram intensamente estudados, uma vez que há um grande interesse científico do conhecimento de como bactérias formam e vivem em comunidades multicelulares (KLAUSEN, et al., 2006). A formação e o desenvolvimento dos biofilmes ocorrem em etapas iniciando com a adesão das células

a superfície, maturação, onde ocorre a produção de polímeros e reprodução celular até o desprendimento, onde pode ocorrer a liberação de células do biofilme, as quais podem voltar ao seu estado planctônico (DONLAN, 2002).

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

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

Dependendo do ponto de vista, os biofilmes podem ser benéficos ou nocivos. Os biofilmes que se formam nos leitos dos rios, lagos e ambientes marinhos contribuem grandemente para a remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos da água e são considerados benéficos. Os utilizados nas indústrias de fermentação e farmacêutica também são considerados benéficos. Quando os biofilmes estão alojados em locais indesejáveis podem trazer sérios problemas. Nas indústrias o acúmulo de biofilmes nos equipamentos causa impacto negativo a qualidade dos produtos finais por causarem corrosão aos equipamentos, interrupção do processo para limpeza entre outros prejuízos (PEYTON e CHARACKLIS, 1995; SARAVANAN e SREEKRISHNAN, 2006). Estes também são indesejáveis no interior de oleodutos, na aquicultura e nos sistemas de ar condicionado (DONLAN, 2002).

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

de resistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência (JUHAS, EBERL e TÜMMLER, 2005).

Os biofilmes são os maiores responsáveis pela contaminação da água potável e em água tratada para utilização em unidades de terapia renal substitutiva (UTRS), com consequências em nível de saúde pública e elevados custos associados. Nas UTRS o controle da formação de biofilmes é uma grande preocupação uma vez que o desprendimento destes causa um aumento dos níveis de endotoxinas permeáveis às membranas utilizadas no processo de purificação do sangue dos pacientes, que são submetidos a este tratamento causando uma série de quadros clínicos e até a morte destes (MARION et al., 2005). Os biofilmes podem ser controlados através do uso de biocidas, biodispersantes, tecnologias enzimáticas e da minimização do nutriente limitante. As desinfecções realizadas nas UTRS devem ser direcionadas ao controle de biofilmes para garantir a qualidade adequada do tratamento dialítico (CAPELLI et al, 2006; MARION et al., 2005).

Dentre os métodos de tipagem molecular que foram usados para estudar a epidemiologia de *P. aeruginosa* e outros patógenos hospitalares, a análise dos perfis de restrição separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é o método mais amplamente utilizado (SINGH et al., 2006). Essa técnica possibilita a separação efetiva de grandes fragmentos de DNA gerados após digestão do cromossomo bacteriano com enzimas de restrição de sítios pouco frequentes no genoma bacteriano. Os fragmentos obtidos originam um número relativamente pequeno de bandas no gel, que facilitam a interpretação do mesmo e permite a comparação dos genomas bacterianos em questão (TENOVER et al., 1997). Este método identifica e determina o espalhamento de clones bacterianos e possui grande reprodutibilidade interlaboratorial (CARRIÇO et al., 2005).

PFGE mostrou ser útil nas investigações de surtos nosocomiais, na identificação de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes e/ou produtoras de  $\beta$ -lactamases, inclusive na detecção da disseminação do clone de *P. aeruginosa* produtora de M $\beta$ la SPM-1 em vários estados brasileiros (GALES et al., 2003; FONSECA et al., 2006; CIPRIANO et al., 2007). O objetivo deste trabalho é determinar a diversidade clonal e perfis de produção de biofilmes e de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada nas unidades de tratamento por hemodiálise.

## Metodologia

### Coleta de amostras

Foram selecionadas aleatoriamente seis clínicas de hemodiálise para este estudo considerando os seguintes critérios: clínicas que tiveram resultados insatisfatórios para a análise microbiológica da água segundo os limites da RDC nº 154/2004 (republicada em 2006) durante os anos analisados e que apresentaram a espécie bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* como contaminante da amostra de água em anos consecutivos. As clínicas analisadas neste estudo foram identificadas com letras maiúsculas diferentes.

As amostras de água foram coletadas de clínicas de hemodiálise localizadas no Estado do Rio de Janeiro em colaboração com a Coordenação de Vigilância Sanitária do Estado do Rio de Janeiro e a Superintendência de Controle de Zoonoses, Vigilância e Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro, em função da RDC nº 154/2004 (Republicada em 2006).

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

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

As amostras de água foram coletadas em frascos estéreis (um volume aproximado de 200 mL). As amostras foram mantidas em temperatura inferior a 10°C e processadas no mesmo dia da coleta. As amostras foram analisadas no período de 2004 a 2008.

### Métodos para análise de *P. aeruginosa*

O ensaio foi realizado segundo metodologia descrita no *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005), Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005), British Pharmacopoeia (BRITISH PHARMACOPOEIA 2007), The United States Pharmacopoeia (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA 2008), POP INCQS/FIOCRUZ nº. 65.3210.008.rev.09/2008, POP INCQS/FIOCRUZ nº. 65.3210.010.rev.11/2009 e POP INCQS/FIOCRUZ nº. 65.3210.030.rev.09/2009.

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

$$N = \frac{(\sum Pi)}{(\sum Vi)} D$$

- Onde: N = número de UFC/1 g ou 1 mL  
 D = Fator da diluição utilizado  
 $\sum Pi$  = Somatório do número de colônias observadas em cada placa  
 $\sum Vi$  = Somatório do volume de teste em cada placa

A identificação bioquímica foi realizada segundo Murray e colaboradores (2007) e o POP INCQS/FIOCRUZ nº 65.3210.008 rev.09/2008. As bactérias foram identificadas através de testes bioquímicos, tais como: fermentação-oxidação da glicose, mobilidade, presença da oxidase, presença da catalase, crescimento em agar Mac Conkey, utilização de carboidratos e produção de

gás, descarboxilação de aminoácidos, crescimento em diferentes concentrações de NaCl, incubação em diferentes temperaturas, detecção do indol, utilização do citrato, VM e VP, utilização da ureia, crescimento em ágar SS, em presença de KCN, detecção de DNase, detecção de H<sub>2</sub>S, utilização da fenilalanina, lecitina e amido, ONPG, produção de pigmento, presença de flagelo e outras provas complementares quando necessário.

O limite estabelecido pela legislação é de no máximo 200 UFC/mL para a água purificada e até 2000 UFC/mL para o dialisado (RDC nº 154/2004 (Republicada em 2006)).

#### **Determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo método automatizado VITEK 32 (BioMérieux), utilizando os cartões GNS-655 conforme instruções do fabricante. Os antibióticos utilizados no cartão utilizado foram: amicacina (AN), ampicilina (AM), ampicilina/sulbactam (AMS), aztreonam (AZM), cefepima (FEP), cefotaxima (TAX), ceftazidima (TAZ), cefalotina (CF), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GM), imipinem (IMI), meropenem (MEM), piperacilina/tazobactam (TZP), trimetoprima/sulfametaxazol (SXT). As amostras foram repicadas no meio de cultura TSA por 24 horas e o crescimento bacteriano foi utilizado para preparar uma suspensão em salina 0,85% com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland. Uma quantidade de 250 µl desta suspensão foi diluída em 1,8 ml de salina 0,85%. Esta diluição foi utilizada para preencher os cartões GNS-655. O resultado foi obtido após incubação do cartão no equipamento por aproximadamente 10 a 18 horas.

#### **Determinação dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos pela separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)**

O DNA cromossômico foi preparado pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose, segundo os procedimentos de Teixeira e colaboradores (1997) e Cipriano e colaboradores (2007). Em resumo, uma alíquota de 2 mL do crescimento bacteriano em fase exponencial foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos (Eppendorf modelo 5415 C) e as células obtidas foram suspensas em 250 µL de salina estéril. Foi adicionada a suspensão de células, 250 µL de agarose (low melting, NuSieve, BMA) a 2% em salina 0,85% a 50°C. A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Os blocos foram então transferidos para tubos contendo 4 mL de solução de lise (NaCl 1 M; TRIS-HCl 6 mM pH 7,6; EDTA 100 mM pH 8,0; BRIJ-58 0,5 %; desoxicolato 0,2 %; sarcosina 0,5 % e lisozima 1 mg/mL) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Em seguida, o tampão de lise foi substituído pelo tampão ESP (EDTA 0,5 M pH 8,0; sarcosina 1 %) contendo 0,1 mg/mL de proteinase K (Sigma) e os blocos incubados por 24 horas a 50°C. Os blocos foram lavados 10 vezes com tampão TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 0,1 mM pH 8,0) a 37°C e então incubados com 10 U da enzima de restrição SpeI (Invitrogen) diluída em tampão específico conforme instruções do fabricante por 24 h a 37°C.

Os blocos foram fundidos a 68-70°C e aplicados no gel de agarose (NA, Amersham) a 1,0% preparado em tampão TBE (TRIS 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; EDTA 1 mM pH final 8,3).

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

#### **Ensaio da formação de biofilmes**

Para a detecção de biofilme foram utilizadas placas para microtitulação de fundo plano, compostas de poliestireno inerte, contendo 96 poços (Nunclon; Nunc InterMed). As amostras bacterianas analisadas foram semeadas por esgotamento em meio TSA (Trypticase Soy Agar) e incubadas por 24 h a 37°C. Foram incluídas também como controles negativo (CN) e positivo (CP), cepas-padrão de *E. coli* HB101 e EAEC 042, além da cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027. Após esse período, colônias foram repicadas para tubos contendo 3 ml de TSB (Trypticase Soy Broth) e incubadas *overnight* com agitação. Em seguida, foram aplicados 200 µL das culturas bacterianas em cada poço em triplicata. Posteriormente, as placas foram incubadas por 4h a 37°C para avaliação da produção rápida de biofilme e por 24 h a 37°C conforme a metodologia seguida. Após a incubação, os conteúdos da placa foram aspirados e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS (0,01M, pH 7,2) e a placa foi colocada à temperatura ambiente para secar. Em seguida, 30 µL de solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço por 10 minutos. Após a coloração do biofilme o corante foi aspirado e os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS (0,01M, pH 7,2). A placa foi mantida à temperatura ambiente para secar e o corante foi eluído com 200 µL de etanol absoluto por 10 minutos e 150 µL da solução contida em cada um dos poços da placa foram transferidos para outra placa limpa e seca. A densidade ótica do biofilme (DO) foi quantificada utilizando um leitor de ELISA (Bio-Rad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm e as amostras foram classificadas segundo Stepanovic et al. (2000). Foram realizados quatro experimentos independentes. As amostras foram classificadas em quatro categorias de acordo com a média das DOs relacionada com os resultados obtidos para o controle negativo (*E. coli* HB101). As categorias foram base-

adas nos seguintes critérios: não aderente (NA), quando a  $DO \leq DO_{CN}$ ; fracamente aderente (+) quando a  $DO_{CN} < DO \leq 2 \times DO_{CN}$ ; moderadamente aderente (++) quando  $2 \times DO_{CN} < DO \leq 4 \times DO_{CN}$  ou fortemente aderente (+++), quando  $4 \times DO_{CN} < DO$ .

## RESULTADOS

### Análise de *P. aeruginosa*

Neste estudo foram analisadas 56 amostras de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de água para hemodiálise, coletadas após o tratamento (pós-osmose reversa), de água utilizada no reprocessamento dos dialisadores (reuso) e da solução de diálise (dialisato) (Tabela 1).

### Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

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

### Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos pela separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Um total de 56 amostras de *P. aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise de seis clínicas foi analisado por esta metodologia. Foram observados nove perfis eletroforéticos entre as amostras analisadas. Com exceção dos perfis eletroforéticos, II e II a que apresentaram apenas duas bandas de diferença, os demais perfis apresentaram mais de seis bandas de diferença sendo considerados não relacionados e, portanto, clones dife-

rentes. Os perfis II e II a foram considerados como pertencentes ao mesmo clone.

Neste estudo foi observado que a maioria das amostras de *P. aeruginosa* oriundas de uma coleta na mesma data teve o mesmo perfil eletroforético independente do ponto de coleta (pós osmose, reuso e solução de diálise). Apenas as clínicas A e D apresentaram mais de um perfil de PFGE na mesma data de coleta. Na clínica A foi observado que no ano de 2007 (A4/2007, A5/2007, A6/2007) foram encontrados os perfis eletroforéticos II e II a, que pertencem ao mesmo clone, e no ano de 2008 (A7/2008, A8/2008 e A9/2008) foram encontrados os perfis eletroforéticos II a e I (Tabela 1, Figura 1). Na clínica D foi observado que o ano de 2007 (D7/2007, D8/2007 e D9/2007) apresentou os perfis eletroforéticos IV e V (Tabela 1 e Figura 4).

O perfil eletroforético I foi encontrado em três clínicas de hemodiálise (A, B e C). Na clínica A foi encontrado no ano de 2005 e novamente em 2008, na clínica B em 2006 e 2008 e na clínica C nos anos de 2005, 2006 e 2007 (Tabela 1, Figuras 1, 2 e 3).

Também foi verificada a persistência de outros perfis eletroforéticos nas demais clínicas. O perfil eletroforético III foi encontrado nos anos de 2004 e 2005 na clínica B, o perfil IV em 2005 e 2006 na clínica D, os perfis VI e VII em 2005 e 2006 e em 2007 e 2008, respectivamente, na clínica E, e o perfil VIII em 2005 e 2006 na clínica F (Tabela 1, Figuras 2, 4, 5 e 6). Apenas as clínicas C e F apresentaram o mesmo perfil eletroforético em todos os anos analisados (Tabela 1, Figuras 3 e 6).

### Produção de biofilmes

Os resultados sobre a expressão de biofilme pelas cepas de *P. aeruginosa* oriundas de amostras de água de hemodiálise estão apresentados na Tabela 2. A metodologia foi empregada utilizando amostras de *P. aeruginosa* de representantes de todos os perfis eletroforéticos. Todas as amostras provenientes de água de hemodiálise analisadas foram classificadas como fortemente aderentes (+++) quando analisadas quanto à produção de biofilme em 4 e em 24 horas. A amostra de *P. aeruginosa* ATCC 9027 foi utilizada neste estudo e também foi classificada como fortemente aderente. Pouca variação foi observada na DO dos biofilmes de *P. aeruginosa* quando comparamos o período de tempo (Tabela 2).

**Tabela 1.** Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise: resultados da análise do perfil de resistência aos antimicrobianos e do perfil de fragmentação do DNA cromossômico obtidos pela separação por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

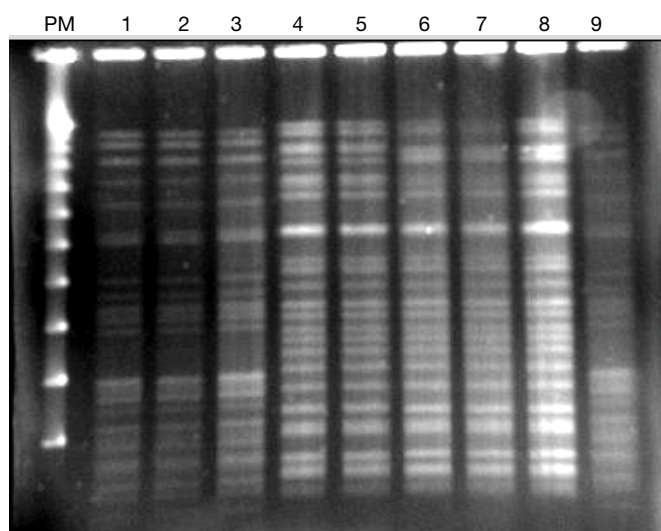
Código	Origem (Pontos de Coleta)	Perfil eletroforético	Perfil de resistência aos antimicrobianos <sup>a</sup>
A1/2005	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A2/2005	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A3/2005	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
A4/2007	Pós-osmose	II	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A5/2007	Reuso	II	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A6/2007	Solução de diálise	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A7/2008	Pós-osmose	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A8/2008	Reuso	II a	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT, GM
A9/2008	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF



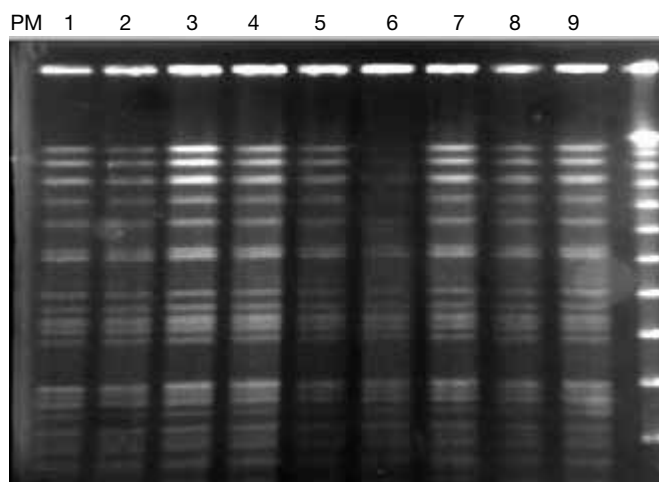
B1/2004	Pós-osmose	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B2/2004	Reuso	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B3/2004	Solução de diálise	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B4/2005	Pós-osmose	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B5/2005	Reuso	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B6/2005	Solução de diálise	III	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
B7/2006	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B8/2006	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B9/2006	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B10/2008	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B11/2008	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
B12/2008	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C1/2005	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C2/2005	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C3/2005	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C4/2006	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C5/2006	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C6/2006	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C7/2007	Pós-osmose	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C8/2007	Reuso	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
C9/2007	Solução de diálise	I	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D1/2005	Pós-osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D2/2005	Reuso	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D3/2005	Solução de diálise	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D4/2006	Pós-osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D5/2006	Reuso	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D6/2006	Solução de diálise	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D7/2007	Pós-osmose	IV	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D8/2007	Reuso	V	AM, AMS, FOX, TAX, CF
D9/2007	Solução de diálise	V	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E1/2005	Pós-osmose	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E2/2005	Reuso	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E3/2005	Solução de diálise	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E4/2006	Reuso	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E5/2006	Solução de diálise	VI	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E6/2007	Pós-osmose	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E7/2007	Reuso	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E8/2007	Solução de diálise	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E9/2008	Pós-osmose	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E10/2008	Reuso	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
E11/2008	Solução de diálise	VII	AM, AMS, FOX, TAX, CF
F1/2005	Pós-osmose	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F2/2005	Reuso	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F3/2005	Solução de diálise	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F4/2006	Pós-osmose	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F5/2006	Reuso	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT
F6/2006	Solução de diálise	VIII	AM, AMS, FOX, TAX, CF, SXT

<sup>a</sup> AM - ampicilina, AMS - ampicilina/sulbactam, FOX - ceftioxima, TAX - cefotaxime, CF - cephalotina, SXT - trimetoprim/sulfametaxazole, GM - gentamicina.

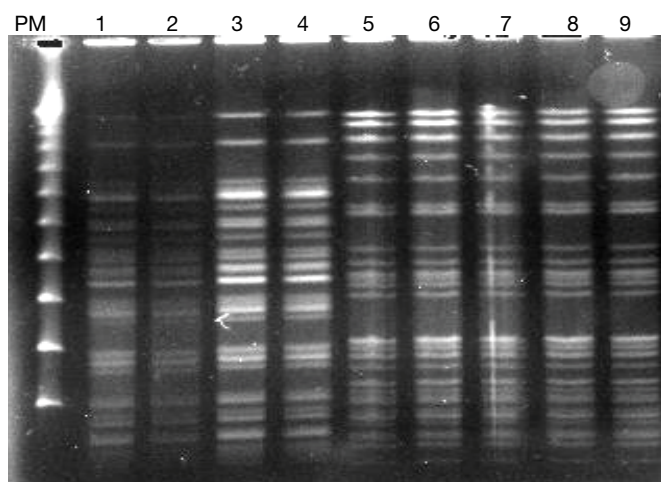




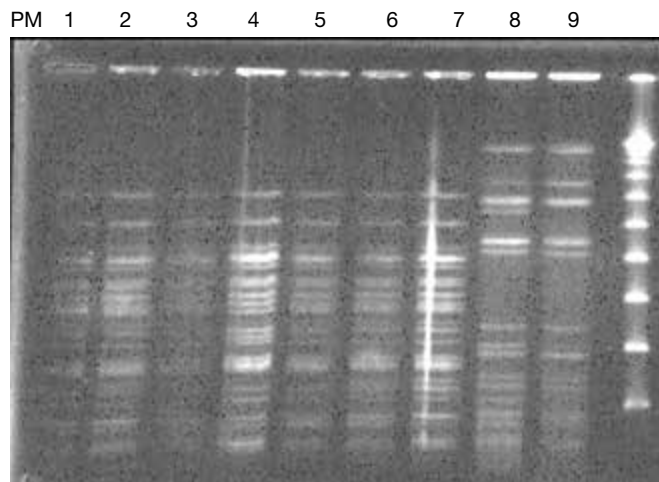
**Figura 1.** Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da clínica A após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – A1/2004 (perfil de PFGE I), 2 – A2/2004 (perfil de PFGE I), 3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



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



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

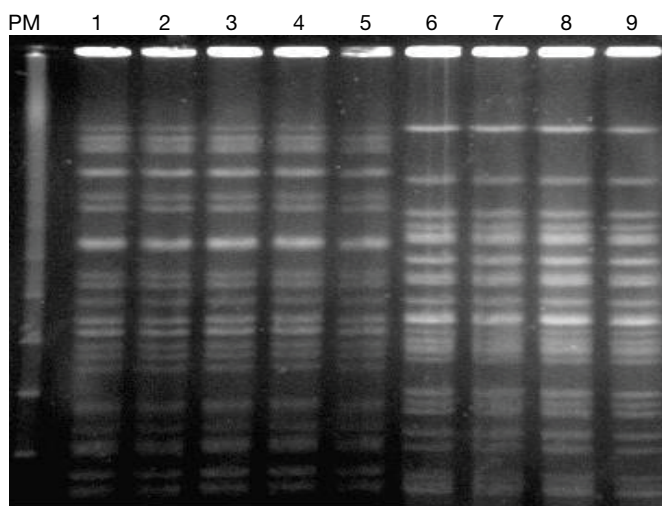


**Figura 4.** Perfil de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* provenientes da clínica D após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – D1/2005 (perfil de PFGE VI), 2 – D2/2005 (perfil de PFGE VI),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

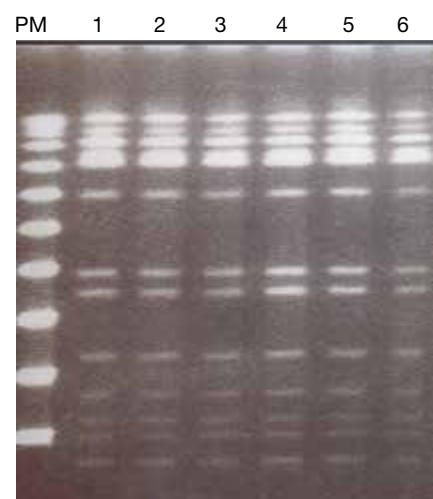
**Tabela 2.** Resultados de produção de biofilme de perfis eletroforéticos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de água de hemodiálise

Amostra bacteriana	Classificação	Perfil eletroforético	Produção de biofilme 4 horas (média da DO)	Produção de biofilme 24 horas (média da DO)
<i>E.coli</i> AEAC 042	NA <sup>a</sup>	NR <sup>b</sup>	1,415	1,498
<i>E.coli</i> DH5A	NA	NR	0,138	0,240
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	+++ <sup>c</sup>	NR	1,921	2,105
A/2005	+++	I	2,028	2,401
A/2007	+++	II	2,297	2,712
A/2008	+++	II a	1,944	2,792
B/2005	+++	III	2,092	2,612
B/2006	+++	I	2,065	2,262
B/2008	+++	I	1,921	2,448
C/2005	+++	I	1,910	2,324
C/2006	+++	I	1,940	2,269
C/2007	+++	I	1,985	2,275
D/2005	+++	IV	2,219	2,519
D/2006	+++	IV	1,997	2,421
D/2007	+++	IV	2,208	2,545
E/2006	+++	VI	2,201	2,750
E/2007	+++	VII	2,369	2,663
E/2008	+++	VII	2,401	2,576
F/2005	+++	VIII	2,434	2,525
F/2006	+++	VIII	2,198	2,512

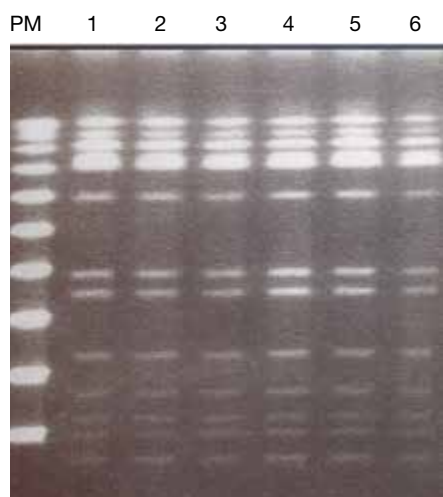
**a** NR: Não se aplica **b** NR: Não realizado **c** +++: fortemente aderente



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



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



**Figura 7.** Perfis de fragmentação do DNA cromossômico de amostras de *P. aeruginosa* após digestão com a enzima de restrição *SpeI*. PM – peso molecular (kilobase), lambda PFGE marker (New England Biolabs); 1 – Perfil , 2 – Perfil , 3 – Perfil , 4 – Perfil , 5 – Perfil , 6 – Perfil , 7 – Perfil , 8 – Perfil , 9 – Perfil

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no INCQS durante no período de 1999 a 2003 mostravam um quadro preocupante, onde o número de análises microbiológicas insatisfatórias estava acima de 64%. Neste período várias orientações sobre aperfeiçoamento do tratamento da água, desinfecção apropriada do sistema das máquinas, observação dos protocolos de reprocessamento dos dialisadores, monitoramento e controle de qualidade em todo sistema foram dadas pelo programa de hemodiálise visando à melhoria contínua para saúde dos pacientes. Os dados relacionados à avaliação microbiológica realizada pelo Programa de Hemodiálise/INCQS também alertaram para a necessidade de determinar um nível de ação que foi sugerido pelo INCQS numa consulta pública. O nível de ação de 50 UFC/mL referente à contagem de bactérias heterotróficas foi incluído na resolução RDC no. 154/2004 (BRASIL, 2004) que substituiu a Portaria no. 82/2000 (BRASIL, 2000). O nível de ação de 50 UFC/mL foi estabelecido pela AAMI e é atualmente recomendado (AAMI, 2001, 2004).

O estabelecimento do nível de ação causou mudanças nos procedimentos do tratamento da água utilizada no sistema de hemodiálise e observamos o impacto desta medida na avaliação microbiológica realizada pelo programa de hemodiálise/INCQS. O cumprimento deste limite pelas clínicas de hemodiálise e o monitoramento constante das clínicas de hemodiálise resultaram numa profunda melhoria na qualidade da água de hemodiálise, o que pode ser facilmente constatado com a análise comparativa dos resultados obtidos a partir do ano de 2004, o número de análises insatisfatórias foi consideravelmente reduzido (12,9% em 2006) (FERREIRA, 2006).

Ferreira (2006) verificou também que a principal espécie bacteriana isolada de amostras de água purificada e dialisato nas clínicas do Estado do Rio de Janeiro era a *P. aeruginosa*,

como também relatado em outros estudos (ZUNINO et al., 2002; BOMMER & JABER, 2006; BORGES et al. 2007; MONTANARI et al., 2009).

A espécie *P. aeruginosa* de origem clínica apresenta altas taxas de resistência aos antimicrobianos e geralmente apresentam multirresistência, incluindo importantes antimicrobianos como  $\beta$ -lactâmicos e fluorquinolonas (ROSSOLINI e MANTENGOLI, 2008). Entretanto, ao testar a suscetibilidade das amostras de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de água de hemodiálise deste estudo frente aos antimicrobianos utilizados no cartão GNS-650 (VITEK/BioMérieux), observamos que nenhuma amostra mostrou resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica, tais como os aminoglicosídeos, fluorquinolonas, carbapenemas e  $\beta$ -lactâmicos antipseudomonas. Observamos em todas as amostras analisadas a resistência aos antimicrobianos dos quais a espécie bacteriana em questão apresenta resistência intrínseca. Apenas três perfis eletroforéticos (II, III e VIII) apresentaram resistência à gentamicina e/ou ao sulfametaxazol e trimetoprima, mostrando que as amostras de *P. aeruginosa* analisadas apresentaram pouca resistência aos antimicrobianos. Este fato pode ser explicado devido à origem das amostras de *P. aeruginosa* que estão presentes no ambiente e têm acesso ao sistema de purificação da água onde não há pressão seletiva das drogas antimicrobianas, como acontece com as amostras oriundas de pacientes hospitalizados.

Recentemente, um estudo, realizado em uma unidade de terapia substitutiva em um hospital do Brasil, no Paraná, verificou que as amostras de *P. aeruginosa* isoladas de água de hemodiálise apresentaram resistência alta ao cloranfenicol (12/15 amostras) e algumas amostras apresentaram resistência aos antimicrobianos: cefepime (6/15), ceftazidima (3/15), gentamicina (5/15), imipinem (6/15) (BORGES et al., 2007). Neste trabalho, 12 das 15 amostras de *P. aeruginosa* foram isoladas de dialisato, entretanto, não foi descrito o que foi considerado como dialisato. Na legislação brasileira há um equívoco relacionado a este termo (BRASIL, 2004). Se a coleta foi realizada após contato com o paciente, estas amostras não representam as amostras do sistema de água, o que explica a presença de resistência aos antimicrobianos.

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

Nós verificamos que todas as amostras analisadas eram fortemente produtoras de biofilme segundo a metodologia utilizada. No estudo de Borges e colaboradores (2007), que utilizou a mesma metodologia de detecção de biofilme em amostras de *P. aeruginosa* oriundas de água de hemodiálise e de “dialisato”, foram verificadas amostras classificadas como produtoras fortes, mo-

deradas ou fracas. Bernardo (2009) utilizou a mesma metodologia para avaliar a produção de biofilme em água mineral e encontrou 52,9% de amostras produtoras fortes, 41,2% de amostras produtoras moderadas e 5,9% de amostras produtoras fracas. Outros estudos realizados com *P. aeruginosa* de origem clínica também mostram esta variação na classificação, entretanto, diferem nas metodologias de detecção (FONSECA et al., 2004; FONSECA et al., 2007). Contudo, não há outros estudos sobre a detecção de biofilme nesta espécie bacteriana provenientes de água e não há uma metodologia padronizada para a detecção da produção de biofilme em placas de poliestireno. Recentemente, um estudo (PEETERS, NELIS e COENYE, 2008) foi realizado comparando os métodos de quantificação da produção de biofilme utilizando placas de poliestireno, porém na literatura as metodologias empregadas ainda não seguem as recomendações sugeridas.

Cappelli e colaboradores (2005) afirmam que não há como avaliar a extensão e incidência da formação de biofilmes num sistema de tratamento de água para hemodiálise uma vez que

não há um método de detecção *in vivo* para verificar a sua erradicação e as condições experimentais *in vitro* não representam as condições reais do sistema. Estes autores afirmam também que uma vez que o biofilme é formado, este passa a ser mais resistente aos métodos convencionais da desinfecção e que todos os esforços devem ser feitos para impedir a contaminação bacteriana e a colonização a fim impedir complicações inflamatórias em pacientes de hemodiálise. Nosso estudo sugere que as amostras oriundas de água de hemodiálise apresentam um grande potencial de produção de biofilme nas condições em que foram realizados os experimentos *in vitro*. Entretanto, podemos sugerir que a determinação da diversidade genética das amostras bacterianas oriundas de água de hemodiálise seja um instrumento adicional para avaliar o sistema de purificação de água das clínicas de hemodiálise, uma vez que a metodologia empregada pode indicar a persistência de clones, que sugere a presença de biofilmes, que não estão sendo efetivamente eliminados por procedimentos de desinfecção.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ed. Washington, D.C.,2005.
- ANDERSSON, S. *et al.* Biofilm formation and interactions of bacterial strains found in wastewater treatment systems. FEMS Microbiology Letters, v. 283, n. 1, p. 83-90, 2008.
- ARIZONO, K.; NOMURA, K.; MOTOYAMA, T.; TAKESHITA, H.; FUKUI, H. Use of ultrapure dialysate in reduction of chronic inflammation during hemodialysis. Blood Purification, v. 22, suppl. 2, p. 26-29, 2004.
- ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION. Water quality for hemodialysis. American national standard for hemodialysis systems, 2. ed.. Arlington Press, Arlington, VA, 2001.
- ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION, AAMI. American national standard for hemodialysis systems, ANSI/AAMI no. RD52, 2004.
- ARVANITIDOU, M. *et al.* Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centers of Greece. Nephrology Dialysis Transplantation, v. 13, p. 949-954, 1998.
- BERNARDO, S. P. C.. Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
- BORGES, C. R. *et al.* Microbiological quality of water and dialysate in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. Journal Applied Microbiology, v. 103, n. 5, p. 1791-7, 2007.
- BOMMER, J.; JABER, B. L. Ultrapure dialysate: facts and myths. Seminars in Dialysis, v. 19, p. 115-119, 2006.
- BRASIL a. Portaria nº 82, de 03 de janeiro 2000. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas para o cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde. [Diário Oficial da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 08 fev. 2000.
- BRASIL b. Resolução-RDC/ANVISA n. 154, de 31 de maio de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Diário Oficial [ da República Federativa do Brasil ], Brasília, DOU de 17 de junho de 2004, seção 1, p. 65. n. 115 (replicada em 2006).
- BRUNET, P.; BERLAND, Y. Water quality and complications of haemodialysis. Nephrology Dialysis Transplantation, v. 15, p. 578-80, 2000.
- CALDERARO, R. V. V.; BISCHOFBERGER, C. Tratamento e vigilância da qualidade das águas de hemodiálise. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 3, n. 3/4, p. 118-127, 1998.
- CARRIÇO, J. A. *et al.* Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed- field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n. 11, p. 5483- 90, 2005.
- CAPPELLI, G. *et al.* Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. Nephrology Dialysis Transplantation, v. 18, n. 10, p. 2105-2111,2003.
- CAPPELLI G. *et al.* Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. Nephrology Dialysis Transplantation, v. 20, 2, p. 266-70, 2005.

## REFERÊNCIAS

- CAPPELLI, G. et al. Water treatment and monitor disinfection. *Hemodialysis International*, n. 10, suppl 1, p. S13-18, 2006.
- CAPPELLI, G. et al. Biofilm on artificial surfaces. *Contributions for Nephrology*, v. 154, p. 61-71, 2007.
- CANAUD, B. et al. Microbiologic purity of dialysate: rationale and technical aspects. *Blood Purif*, v. 18, p. 200-213, 2000.
- CIPRIANO, R. et al., Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the blaSPM clone, spread in hospital. *Microbiology Drug Resistance*, v. 13, n. 2, p. 142-146, 2007.
- DEPLANO A. et al. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 3, p. 1198-1204, 2005.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infect Disease*, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. 6. ed., v. 6.1. Strasbourg: Council of Europe 2008. CD ROM.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2005.
- FAVERO, M. S.; ALTER, M. J.; BLAND, L. A. A. Dialysis-associated infections and their control. In: *HOSPITAL Infections*, 3. ed. Boston; Toronto; London: Little, Brown and Co., p. 375-403, 1992.
- FERREIRA, J. A. B. Avaliação microbiológica da água utilizada nas unidades de terapia renal substitutiva no estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Monografia (Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, 2006.
- FONSECA, A. P. et al. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, Pt 9, p. 903-10, 2004.
- FONSECA, E. L. et al. Emergence of dhfrXVb and blaCARB-4 gene cassettes in class 1 integrons from clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Amazon region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 81-4, 2006.
- FONSECA, A. P. et al. Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 505-16, 2007.
- FUX, C.A et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.
- GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta- lactamase. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.
- HOENICH, N. A., RONCO, C., LEVIN, R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purification*, v. 24, p.11-18, 2006.
- JUHAS M., EBERL L., TÜMMLER B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 459-71, 2005.
- KAWANISHI, H., et al. The new standard of fluids for hemodialysis in Japan. *Blood Purification*, v. 27, Suppl 1, p. 5-10, 2009.
- KLAUSEN, M. et al. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 261, n. 1, p. 1-11, 2006.
- KOMLOS, J. et al. Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microbiol Ecology*, v. 49, n. 1, p. 114-125, 2005.
- LO CASCIO, G. et al. A napkin-associated outbreak of *Burkholderia cenocepacia* bacteraemia in haemodialysis patients. *Journal of Hospital Infection*. v. 64, p. 56-62, 2006.
- LONNEMANN, G. The quality of dialysate: an integrated approach. *Kidney International*, v. 76, p. S112-119, 2000.
- LONNEMANN, G. Should ultra-pure dialysate be mandatory? *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 15, suppl 1, p. 55-59, 2000.
- LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms or antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* our worst nightmare? *Clinical Infect Disease*, v. 34, n. 5, p. 634-640, 2002.
- MAGALHÃES, M., DOHERTY, C., GOVAN, J.R.W., VANDAMME, P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *Journal of Hospital Infection*, v. 54, p. 120-123, 2003.
- MAN, N. K. et al. Evidence of bacterial biofilm in tubing from hydraulic pathway of hemodialysis system. *Artificial Organs*, v. 22, n. 7, p. 596-600, 1998.
- MANUAL DA QUALIDADE. Pesquisa de Patógenos em Produtos Não Estéreis. rev. 09. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. Seção 10. (65.3210.008).

## REFERÊNCIAS

- MANUAL DA QUALIDADE. Contagem Total de Bactérias Aeróbias. rev. 11. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009a. Seção 10. 5p. (65.3210.010)
- MANUAL DA QUALIDADE. Contagem de bactérias heterotróficas. rev. 09. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009b. Seção 10. 5p. (65.3210.030).
- MARCUS, R. J. et al. Biofilms in nephrology. Expert Opinion on Biological Therapy, v. 8, p.1156-1166, 2008.
- MARION, K. et al. A new procedure allowing the complete removal and prevention of hemodialysis biofilms. Blood Purification, v. 23, n. 5, p. 339-48, 2005.
- MASAKANE et al. Bacteriological water quality in the central dialysis fluid delivery system from the survey of the Japanese Society for Dialysis Therapy Blood Purification, v. 27, suppl 1, p. 11-6, 2008.
- MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiology, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.
- MONTANARI, L. B. et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2009.
- MORIN, P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. Journal Hospital Infection, v. 45, p. 218-224, 2000.
- MURRAY, R. et al., Manual of Clinical Microbiology, 9. ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2007
- NYSTRAND, R. Dialysis fluid contamination of pathways and life of microbes. Edna Erca Journal, v. 27, n. 3, p. 35-139, 2001.
- NYSTRAND, R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. Journal of the Chinese Medical Association, v. 71, n. 5, p. 223-229, 2008.
- NYSTRAND, R. Official recommendations for quality of fluids in dialysis -the need for standardisation. Journal Renal Care, v. 35, n. 2, p. 74-81, 2009.
- OLIVEIRA, M. B.; ROMÃO JR, J. E., ZATZ, R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. Kidney International Supplement, v. 97, p. S82-6, 2005.
- PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Current Opinion in Microbiology, v. 11, n. 6, p. 560-6, 2008.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiology Methods, v. 72, n. 2, p. 157-65, 2008.
- PEYTON, B. M.; CHARACKLIS, W. G. Microbial biofilms and biofilm reactors. Bioprocess in Technology, v. 20, p. 187-231, 1995.
- POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: MANDELL, Douglas; BENNETT. Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. ed., v. 2, New York NY: Churchill Livingstone, 2000, p. 2310-2334.
- ROSSOLINI, G. M.; MANTENGOLI, E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. Clinical Microbiology Infect, v. 14, Suppl 6, p. 2-8, 2008.
- RUTALA, W. A. A.; WEBER, D. J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. Clinical Microbiology Review, v. 10, p. 597-610, 1997.
- SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. J. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology, v. 189, n. 14, p. 5383-6, 2007.
- SARAVANAN, V.; SREEKRISHNAN, T. R. Modelling anaerobic biofilm reactors--a review. Journal of Environmental Management, v. 81, n. 1, p. 1-18, 2006.
- SIMÕES, L. C.; SIMOES, M.; VIEIRA, M. J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. Applied Environmental Microbiology, v. 73, p. 6192-6200, 2007
- SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. American Society for Microbiology, v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.
- SMEETS, E. et al. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. Kidney International, v. 63, n. 4, p. 1574-6, 2003.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo da SBN. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Censo/2008/censoSBN2008.pdf>>. Acesso em: 28 ago. de 2009.
- STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiology Methods, v. 40, p. 175-179, 2000.
- TEIXEIRA, L. M. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strain isolated from human sources. Journal of Clinical Microbiology, v. 35, n.11 p. 2778-2781, 1997.

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

WARD, R. A. Ultrapure dialysate. *Seminars in Dialysis*, v. 17 p. 489-497. 2004. WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Review*, v. 24, n. 5, p. 661-71, 2000.

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

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

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

# PRO SEARCH HEAD HUNTING

CONFIE SUA MISSÃO A QUEM TEM ANOS DE EXPERIÊNCIA NO MERCADO

A melhor maneira para encontrar o melhor profissional

Pesquisador de executivos nas áreas de:

- Saúde
- Análises Clínicas
- Análises Industriais



PRO SEARCH

[www.prosearch.com.br](http://www.prosearch.com.br)

e-mail: [consultant@prosearch.com.br](mailto:consultant@prosearch.com.br)

Fone/Fax: 55 (11) 3171-2190