

Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise

Detection of non-fermenting Gram-negative bacteria in treated water for dialysis procedure purpose

RIALA6/1124

Adriana BUGNO*, Adriana Aparecida Buzzo ALMODÓVAR, Tatiana Caldas PEREIRA, Mariângela Tirico AURICCHIO

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo, 355 São Paulo/ SP

CEP: 01246-902, telefone: 3068-2963, fax: 3068-2926, e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

Recebido: 28/03/2007 – Aceito para publicação: 25/05/2007

RESUMO

No Brasil, 90% dos pacientes renais crônicos dependem dos procedimentos de hemodiálise para remover produtos de degradação metabólica, excesso de água e de sais minerais do organismo, e para restaurar o equilíbrio ácido-base e eletrolítico. A água é o principal componente do tratamento por diálise e suas qualidades química e microbiológica são essenciais para evitar riscos adicionais ao paciente. As soluções para diálise e os equipamentos proporcionam ambientes adequados ao desenvolvimento microbiano, especialmente bactérias Gram-negativas. Além de bacteremias, os microrganismos Gram-negativos podem estar relacionados à ocorrência de reações pirogênicas. Este estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose em 97 amostras de água tratada para diálise e 27 amostras de dialisatos, avaliadas entre junho de 2005 e dezembro de 2006. As bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose foram detectadas em 29,6% das amostras de dialisatos e em 49,5% das amostras de água tratada. Nove espécies foram isoladas e identificadas, sendo a mais freqüente o complexo *Burkholderia cepacia* (59,0%), seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* (13,1%).

Palavras-chave. água para diálise, dialisato, bactérias Gram-negativas, bactérias não fermentadoras

ABSTRACT

In Brazil, 90% of patients with renal failure depend on the hemodialysis procedures in order to remove the metabolic degradation products, water and mineral salts excesses from the organism, restoring the electrolyte and acid-base balance. Water is the main component of the dialysis therapy, and its chemical and microbiology quality is essential to avoid additional risks to patient. Dialysis solutions and equipments provide suitable environments for the microbial growth, particularly Gram-negative bacteria. In addition to bacteremia, Gram-negative microorganisms can be related to pyrogenic reactions. The objective of this study was to investigate the occurrence of non-fermenting Gram-negative bacteria in 97 dialysis water samples, and 27 dialysates analyzed from June 2005 to December 2006. Non-fermenting Gram-negative bacteria were detected in 29.6% of dialysates and in 49.5% of treated water samples. Nine bacteria species were isolated and identified; the *Burkholderia cepacia* complex was the most frequent (59.0%), followed by *Stenotrophomonas maltophilia* (13.1%).

Key words. dialysis water, dialysate, Gram-negative bacteria, non-fermenting bacteria

INTRODUÇÃO

A insuficiência renal, que corresponde à diminuição da capacidade dos rins para eliminar substâncias tóxicas presentes no sangue, tem como causas principais, no Brasil, diabetes, hipertensão arterial, inflamações e infecções dos rins.

Levantamentos estatísticos realizados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia indicam progressão anual no número de pacientes renais crônicos no país: 59.153 pacientes em 2004, 65.121, em 2005 e 70.872, em 2006; aproximadamente 90% destes pacientes (64.306 pacientes, em 2006) dependem do procedimento de hemodiálise, que corresponde a um processo artificial que visa repor as funções renais de remoção de produtos de degradação metabólica, o excesso de água e de sais minerais do organismo e, estabelecer uma nova situação de equilíbrio.

O tratamento dialítico, que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal crônica, é também responsável por complicações, cuja intensidade e frequência são cada vez mais descritas^{1,2}.

Na hemodiálise, o fluido de diálise ou dialisato é utilizado para facilitar a normalização do balanço eletrolítico e a remoção de substâncias tóxicas de baixo peso molecular presentes no plasma. O dialisato consiste principalmente de água tratada, misturada com solução concentrada de eletrólitos, tampão e glicose¹.

Até a década de 70, a água potável era utilizada na hemodiálise; entretanto, evidenciou-se correlação entre os contaminantes na água potável e os efeitos adversos do procedimento¹⁻⁴, sendo necessária a utilização de tratamentos complementares, com a finalidade de adequar as características físico-químicas e microbiológicas da água potável à sua aplicação em procedimentos dialíticos.

Em geral, os sistemas de tratamento de água incluem filtros primários, abrandadores, filtros de carvão ativado, deionizadores e osmose reversa, cuja eficiência depende da capacidade do equipamento, da natureza e origem geográfica da água a ser tratada, além de variações sazonais¹⁻⁷. Embora a escolha do tipo de sistema de tratamento da água seja crucial, é um erro supor que a melhor escolha significa que todos os problemas relacionados à qualidade da água estão resolvidos, pois a qualidade depende também da manutenção e monitoramento do sistema.

Considerando que cada paciente é exposto indiretamente a aproximadamente 120 litros de água a cada sessão de hemodiálise, com duração média de 3 a 4 horas, a qual é

realizada três vezes por semana e, que a barreira entre o sangue do paciente e o dialisato é realizada por uma membrana semi-permeável, a qual pode permitir acesso direto dos contaminantes para o sangue do paciente^{1,6}, verifica-se que a qualidade química e microbiológica da água utilizada para diálise é essencial para evitar riscos adicionais ao paciente^{2,3,5,8-10}.

Entre janeiro de 1980 e junho de 1999, o “Center for Diseases Control and Prevention” (CDC) investigou 16 surtos de bacteremia ou reações pirogênicas em pacientes submetidos a hemodiálise, sendo que foi relatado a ocorrência de cinco surtos relacionados ao inadequado tratamento de água e três surtos relacionados à contaminação dos dialisatos⁹.

Vários fatores contribuem para a ocorrência de contaminação microbiana em sistemas de tratamento de água para diálise: a) todos os componentes do sistema permitem o desenvolvimento microbiano, particularmente de bactérias Gram-negativas, entre as quais podem ser citadas espécies de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*^{2,9-15} e de micobactérias não tuberculosas^{2,5,9,10,14}; b) a presença de microrganismos, nutrientes orgânicos e pH, associados a fatores físicos (pontos cegos, baixo fluxo ou áreas de estagnação de água) favorecem a formação de biofilmes em todo o sistema de tratamento e distribuição de água tratada, e também no circuito hidráulico da máquina de diálise^{1,2,4,7,11,15}; c) biofilmes facilitam a persistência microbiana no sistema, mesmo após procedimentos de sanitização e desinfecção, e atuam como fonte de bactérias, endotoxinas, fragmentos de endotoxinas e polissacarídeos, que são liberados na água e aumentam o risco de ocorrência de bacteremia e reações pirogênicas^{1,2,5,7,10,11,15}.

Ao lado de doenças cardiovasculares, as infecções são as principais causas de morte em pacientes dialíticos^{3,9,12,13} e o reconhecimento do risco potencial que representava a qualidade da água utilizada nos tratamentos dialíticos fez com que vários órgãos e comissões estabelecessem critérios e normas para a especificação da água a ser utilizada. Dentre estas normas, cita-se as definidas na “European Pharmacopoeia”, as sugeridas pela “Association for the Advancement of Medical Instrumentation” (AAMI)^{2,4,6,7} e, no Brasil, os critérios de qualidade estabelecidos na Resolução RDC nº 154/2004¹⁶ (Tabela 1).

Os critérios de qualidade referentes à carga microbiana presente na água tratada estão relacionados à ocorrência de bacteremias e reações pirogênicas. Teoricamente, a membrana intacta do dialisador deve prevenir a passagem de bactérias do dialisato para o sangue do paciente, porém casos de bacteremia

Tabela 1. Parâmetros microbiológicos para água tratada para diálise.

Norma	Bactérias heterotróficas	Endotoxina bacteriana	Coliformes totais
AAMI	200 UFC/mL	2 EU/mL	—
European Pharmacopoeia	100 UFC/mL	0,25 EU/mL	—
Resolução RDC nº 154/2004	200 UFC/mL	2 EU/mL	Ausência (em 100 mL)

podem ocorrer se houverem defeitos na integridade da membrana, se o nível de contaminação microbiana for elevado ou por contaminação durante o processo de reuso dos dialisadores^{2,5,9,10}. Além disso, altas cargas microbianas podem estar associadas a elevado conteúdo de endotoxinas bacterianas, as quais podem interagir com monócitos através da membrana do dialisador e estimular a liberação indireta de citocinas ou podem atravessar a membrana e estimular diretamente uma resposta imune^{5,9,10,14}.

Considerando que bactérias Gram-negativas são as principais responsáveis pela ocorrência de endotoxinas bacterianas, verifica-se o diferencial nos critérios de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira quanto à pesquisa de bactérias do grupo dos coliformes totais, as quais correspondem a cerca de 20 espécies de bactérias Gram-negativas, entéricas e não entéricas, não esporogênicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Entretanto, a legislação brasileira falha ao não considerar a presença de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa*, cuja presença está relacionada à ocorrência de endotoxinas bacterianas e à possibilidade de formação de biofilmes.

Os riscos decorrentes da presença de *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise foram considerados neste estudo, que teve por objetivo verificar a ocorrência destes microrganismos em amostras de água tratada para diálise e dialisatos, de diversas clínicas de diálise do Estado de São Paulo, avaliadas entre junho de 2005 e dezembro de 2006.

MÉTODOS

Foram analisadas 27 amostras de dialisatos e 97 amostras de água tratada para diálise, das quais 31 amostras foram coletadas após o sistema de tratamento; 24 amostras, na entrada da máquina de diálise e 42 amostras, na sala do reuso.

A coleta foi realizada segundo recomendações da “American Public Health Association” (APHA)¹⁷, em frascos estéreis com 300 mL de capacidade. Antes da amostragem, o ponto de coleta foi

desinfetado com álcool 70% e a água foi mantida em escoamento por 3 a 5 minutos; somente após este período foi realizada a coleta. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante seu transporte ao laboratório e submetidas à análise microbiológica imediatamente após seu recebimento. Somente foram submetidas às análises as amostras recebidas, no máximo, até 12 horas após a coleta.

Para a pesquisa de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, foi utilizada técnica recomendada pela APHA¹⁷ para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas: 100mL da amostra foram adicionados a 100mL de Caldo Asparagina, concentração dupla, e incubados a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram efetuados repiques em Agar Verde Brillante, Agar Cetrimide e Agar Leite, incubados a 37°C por 48 horas. A identificação presuntiva dos isolados foi realizada em Meio Rugai e Araujo modificado¹⁸, enquanto a confirmação foi realizada em sistema de identificação bioquímica API 20NE.

RESULTADOS

Neste estudo, bacilos Gram-negativos não fermentadores foram detectados em 08 amostras (29,6%) de dialisatos e em 48 amostras (49,5%) de água tratada. Com relação as amostras de água tratada, verificou-se a presença destes microrganismos em 15 amostras (48,4%) coletadas na saída do tratamento, 10 amostras (41,7%) coletadas na entrada da máquina de diálise e em 23 amostras (54,8%) coletadas no reuso. Nove espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose foram isolados e identificados, sendo apresentada, na Tabela 2, a frequência de detecção em função do tipo de amostra analisada.

O complexo *Burkholderia cepacia* foi o mais frequentemente isolado, seguido de *Stenotrophomonas maltophilia*, que representaram 72,1% de todos os isolados obtidos e detectados em todos os pontos de coleta. O complexo *Burkholderia cepacia* foi o mais prevalente em todos os tipos de amostras, seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Ralstonia pickettii*, em água tratada e de *Pseudomonas fluorescens*, em dialisatos.

Tabela 2. Bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados em amostras de água tratada para diálise e dialisatos.

Microrganismo	Nº de amostras positivas				Total
	Água tratada			Dialisato	
	Saída Tratamento	Entrada Máquina	Reuso		
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	10	5	16	5	36
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2	3	1	8
<i>Ralstonia pickettii</i>	2	0	2	0	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	1	1	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	1	2	3
<i>Pseudomonas putida</i>	0	1	1	0	2
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	0	2	0	3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	0	1
<i>Brevundimonas vesiculares</i>	0	1	0	0	1

DISCUSSÃO

Bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas* spp, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp, foram isoladas em amostras clínicas e em água tratada e dialisatos associados à ocorrência de surtos de infecção^{9,12}. Estudos bacteriológicos efetuados nestas amostras indicam que os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* são mais frequentemente isolados^{9,11,12}, embora *Burkholderia* spp, *Comamonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Flavobacterium* spp, *Alcaligenes* spp e *Xantomonas* spp possam também estar presentes^{2,7,14}.

Considerando que bactérias Gram-negativas não fermentadoras podem se desenvolver rapidamente em águas, inclusive quando tratadas por deionização, destilação e osmose reversa^{9,10,12}; que estes microrganismos podem ser responsáveis pela ocorrência de bacteremias e endotoxemias em hemodíalises, mesmo quando os níveis de contaminação microbiológica da água tratada estão em conformidade com padrões estabelecidos^{9,10,12} e que a água tratada e dialisatos podem ser reservatórios para várias espécies de *Pseudomonas* e outros bacilos Gram-negativos, é necessário aprimorar o monitoramento microbiológico da água tratada a fim de se conhecer as espécies potencialmente patogênicas que possam estar presentes entre a população bacteriana e estabelecer estratégias de controle da contaminação do sistema que atuem sobre este grupo de bactérias.

Muitos surtos associados à diálise demonstram o potencial de morbidade e mortalidade relacionado às infecções em pacientes dialíticos, sendo que muitos destes surtos poderiam ter sido evitados pelo uso de adequado tratamento de água, eficiente desinfecção do sistema de tratamento e de máquinas de diálise, pela adesão a rígidos protocolos de reprocessamento de dialisadores e por rigoroso monitoramento da qualidade da água tratada.

Sendo um importante componente no tratamento dialítico, a escolha do tipo de sistema de tratamento da água é importante, mas a melhor escolha não garante a qualidade da água, que também depende da manutenção e monitoramento do sistema.

Os resultados obtidos neste estudo, associado ao reconhecimento do papel da qualidade da água para a prevenção de riscos a pacientes dialíticos, conduzem à necessidade de que os padrões microbiológicos e de endotoxinas na água tratada sejam revistos e adotados parâmetros adequados quanto a presença de microrganismos indicadores, como *Pseudomonas* spp e outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras.

REFERÊNCIAS

1. Hoenick NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*, 2006; 24: 11-8.
2. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Junior JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodíalise. *J Bras Nefrol*, 1996; 18(2): 180-8.
3. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14: 666-75.
4. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18 (suppl 7): vii21-5.
5. Morin P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *J Hosp Infect*, 2000; 45: 218-24.
6. Hoenick NA, Levin R. The implications of water quality in hemodialysis. *Semin Dial*, 2003; 16(6): 492-7
7. McFeters GA, Broadaway SC, Pyle BH, Egozy Y. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. *Appl Environm Microbiol*, 1993; 59 (5): 1410-5.
8. Lebedo I. On-line preparation of solutions for dialysis: practical aspects versus safety and regulations. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13: S78-S83.
9. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial*, 2000; 13 (2):92-6.
10. Favero MS. Role of the CDC in hemodialysis: an historical perspective. *Semin Dial*, 2000; 13 (2): 64-7.
11. Zunino P, Beltrán L, Zunino L, Méndez H, Percovich V et al. Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *J Nephrol*, 2002; 15:374-9.
12. Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N, Tsakris A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol*, 2003; 95: 180-5.
13. Saxena AK, Panhora BR. Haemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention. *Swiss Med Wkly*, 2005; 135:127-38.
14. Oie S, Kamiya A, Yoneda I, Uchiyama K, Tsuchida M, Takai K et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J Hosp Infect*, 2003; 54: 115-9.
15. Cappelli G, Sereni L, Scialoja MG, Morselli M, Perrone S, Ciuffreda A et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18: 2105-11.
16. Brasil, Leis e Decretos. Resolução RDC nº154 de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para funcionamento dos Serviços de Diálise. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22875&word>>. Acesso em 29 de dezembro de 2006.
17. American Public Health Association. Standard Methods for the examination of Water and Wasterwater. 20ª ed. Baltimore: United Book Press, Inc; 1998.
18. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1972; 32: 97-100.