



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MICHELLE SIEWERT

**ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS E BACILOS GRAM-  
NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES EM ÁGUA E  
DIALISATO DE UMA CLÍNICA DE HEMODIÁLISE**

---

Londrina  
2010

MICHELLE SIEWERT

**ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS E BACILOS GRAM-  
NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES EM ÁGUA E  
DIALISATO DE UMA CLÍNICA DE HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina  
2010

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S573i Siewert, Michelle.  
Isolamento de micobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores em água e dialisato de uma clínica de hemodiálise / Michelle Siewert. - Londrina, 2010.  
52 f. : il.

Orientador: Jacinta Sanchez Pelayo.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. dialisato - Tese. 2. hemodiálise - Tese. 3. micobactéria - Tese. 4. bacilos gram-negativos - Tese. I. Sanchez Pelayo, Jacinta . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

MICHELLE SIEWERT

**ISOLAMENTO DE MICOBACTÉRIAS E BACIOS GRAM-  
NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES EM ÁGUA E  
DIALISATO DE UMA CLÍNICA DE HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Halha Ostrensky Saridakis  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Carolina Vespero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de março de 2010.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, por seu amor, pelo seu esforço em fazer o possível para me ajudar em todas as situações e por estar sempre disposta a me ouvir com paciência.

Ao meu pai, por sempre me incentivar a buscar meus sonhos, pelos ensinamentos, confiança e preocupação, serei sempre grata.

Ao meu marido Pedro, por fazer parte da minha vida, por todos os momentos que passamos juntos, por suportar minhas inquietações e sempre me incentivar e me dar forças, pelo amor e atenção mesmo quando distante.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jacinta Sanchez Pelayo, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança e incentivo, serei sempre grata.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Halha Ostrensky Saridakis, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação, paciência e compreensão.

Aos professores do Programa de Mestrado em Microbiologia, meus sinceros agradecimentos àqueles que tornaram nosso aprendizado um contentamento.

Aos amigos da turma de mestrado e ao pessoal do laboratório de Bacteriologia, pelo agradável convívio e pelas experiências compartilhadas. Sentirei saudades!

A todos os funcionários do Interlaboratório, em especial a Claci, pela prestatividade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A toda a equipe do Instituto do Rim, por viabilizar a realização do trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

SIEWERT, Michelle. **Isolamento de micobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores em água e dialisato de uma clínica de hemodiálise.** 2010. 52 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar a prevalência de micobactérias e bacilos gram-negativos não fermentadores em água e dialisato utilizados em uma clínica de hemodiálise em Londrina, PR. **Métodos e Resultados:** No período de novembro de 2008 a julho de 2009, foram coletadas 34 amostras de água e 100 de dialisato nas quais foram isoladas 52 cepas de bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNF) e 13 cepas de micobactérias. Os BGNF foram identificados através dos sistemas Api 20NE e as micobactérias, pelo método PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis). A maioria dos isolados foram identificados como pertencente ao gênero *Pseudomonas* (52,3%), *Mycobacterium* (20%) e *Stenotrophomonas* (15,4%). Os isolados foram submetidos à ação do ácido peracético e hipoclorito de sódio através de teste em suspensão. Três cepas de *M. scrofulaceum* (23,1%) foram resistentes ao ácido peracético a 0,2%, após contato por 30 minutos e, uma cepa de *Burkholderia pseudomallei* (1,9%) após 15 minutos. Apenas uma cepa de *M. scrofulaceum* (7,7%) foi resistente ao hipoclorito de sódio a 500 ppm após 30 minutos de exposição. Nos testes de adesão ao poliestireno, 04 (7,7%) cepas de BGNF mostraram forte aderência e 16 (30,8%) cepas mostraram aderência moderada, demonstrando sua capacidade de formar biofilmes. Das cepas de BGNF submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos através de disco difusão, 27 (84,4%) foram sensíveis a todas as drogas testadas. **Conclusões:** A água e o dialisato constituem uma fonte de infecção de diferentes espécies de BGNF e de micobactérias para pacientes submetidos à hemodiálise. **Significância e Impacto do Estudo:** O tratamento adequado da água, a desinfecção eficaz das máquinas de hemodiálise e dialisadores, e o monitoramento microbiológico do dialisato são importantes para a redução de casos de infecção por bactérias, mantendo assim a qualidade da terapia renal substitutiva oferecida aos pacientes com insuficiência renal crônica.

**Palavras-chave:** água; dialisato; hemodiálise; micobactéria; bacilos gram-negativos não-fermentadores; antimicrobianos.

SIEWERT, Michelle. **Micobacteria and nonfermenting gram-negative bacilli in water and dialysate in a hemodialysis unit.** 2010. 52 p. Dissertation (Master in Microbiology) – Londrina State University, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

**Aims:** To investigate the presence of mycobacteria and nonfermenting gram-negative bacilli in water and dialysate used in a hemodialysis unit in Londrina, PR. **Methods and Results:** From November 2008 to July 2009, 134 samples of water and dialysate were collected, in which 52 nonfermenting gram-negative bacilli (NFGNB) and 13 mycobacteria were isolated. The NFGNB were identified by Api 20NE system, and mycobacteria by PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis). The majority of the isolates belonged to *Pseudomonas* genus (52.3%), followed by *Mycobacterium* (20%) and *Stenotrophomonas maltophilia* (15.4%). The isolates were subjected to the action of peracetic acid and sodium hypochlorite by suspension test. By 0.2% peracetic acid testing, three strains of *M. scrofulaceum* (23.1%) were resistant after 30 minutes exposure and one strain of *Burkholderia pseudomallei* (1.9%) after 15 minutes. When tested with sodium hypochlorite at 500 ppm, one strain (7.7%) of *M. scrofulaceum* was resistant after 30 minutes exposure. In tests of adherence to polystyrene, 4 (7.7%) NFGNB strains showed strong adhesion and 16 (30.8%) showed moderate adhesion, demonstrating its ability to form biofilms. Amongst the NFGNB strains submitted to the antimicrobial susceptibility testing by agar disk diffusion method, 27 (84,4%) were susceptible to all drugs tested. **Conclusions:** The results evidenced water and dialysate as sources of infection by NFGNB and mycobacteria in patients undergone to hemodialysis. **Significance and Impact of the Study:** Adequate treatment of water, efficient disinfection of hemodialysis machines and dialysers, and the microbiological control of water and dialysate are important for the reduction of bacteremia cases and outbreaks, keeping the quality of the renal substitutive therapy offered to the patients with chronic renal failure.

**Keywords:** water; dialysate; hemodialysis; nonfermenting gram-negative bacilli; mycobacteria; antimicrobials.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Total de pacientes em tratamento dialítico por ano no Brasil .....13
- Figura 2** – Sistema de tratamento da água em uma unidade de hemodiálise .....14

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das espécies de micobactérias de acordo com o risco de infecção em humanos.....	20
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilo Álcool-Ácido-Resistentes
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BGNF	Bacilos Gram-negativos não fermentadores
BHI	Brain Heart Infusion (infuso de cérebro e coração de boi)
CDC	Centers for Diseases Control
CIM	Concentração Inibitória Mínima
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
LJ	Löwenstein Jensen (meio para micobactérias)
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	milimolar
MNT	Micobactérias Não Tuberculose
pb	Pares de bases
PRA	PCR Resctriction Enzime Analysis
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ppm	Partes Por Milhão
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy
TE	Tampão de Extração (Tris-EDTA)
U	Unidades
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
μL	microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1	HEMODIÁLISE.....	12
2.2	BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES.....	16
2.3	MICOBACTÉRIAS.....	17
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
	OBJETIVO GERAL .....	30
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
	<b>ARTIGO. ISOLATION OF MYCOBACTERIA AND NONFERMENTING GRAM-NEGATIVE BACILLI IN A HEMODIALYSIS CENTER</b> .....	<b>31</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A hemodiálise é uma terapia renal substitutiva que auxilia a manutenção do equilíbrio homeostático de pacientes com insuficiência renal aguda ou crônica. Consiste na passagem do sangue do paciente por um filtro especial – o dialisador – durante uma sessão de circulação extracorpórea, responsável pela alteração da composição de solutos no plasma e a possibilidade da remoção mais rápida do excesso de água corporal.

Pacientes com insuficiência renal submetidos à hemodiálise são expostos a volumes de água, entre 400 e 600 litros por semana, portanto se esta apresentar contaminação pode causar sérias conseqüências aos pacientes, como septicemia ou endotoxemia.

A desinfecção inadequada do sistema de distribuição de água tem sido implicada como uma possível fonte para surtos de infecções bacterianas. A maior incidência é de bactérias Gram-negativas, pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*. No entanto, também são relatados casos de infecções envolvendo espécies do gênero *Mycobacterium*, podendo ocorrer desde bacteremia e infecção de tecidos moles até doença disseminada. Um fator preocupante é que a contaminação por micobactérias pode não ser reconhecida quando métodos rotineiros de cultivo são usados.

Considerando-se a falta de dados sobre o assunto em nossa região e a importância das infecções bacterianas em imunodeficientes, como é o caso dos pacientes submetidos à hemodiálise, optou-se por realizar este trabalho que tem como objetivo a pesquisa de microrganismos patogênicos e potencialmente patogênicos na água e dialisato utilizados em um centro de hemodiálise na cidade de Londrina, PR.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Hemodiálise

A hemodiálise é um tratamento alternativo de grande importância para pacientes com falência renal crônica, uma vez que melhora a qualidade de vida desses indivíduos e para alguns, é a esperança de vida, em vista da irreversibilidade da doença durante a espera pelo transplante renal (LIMA *et al.*, 2005). É uma terapia renal substitutiva que auxilia a manutenção do equilíbrio homeostático de pacientes com insuficiência renal aguda ou crônica e consiste na passagem do sangue do paciente através do dialisador, conhecido como rim artificial, o qual contém canais muito finos delimitados por uma membrana semipermeável. Do outro lado da membrana ocorre o fluxo contrário do líquido dialisante, o dialisato, para o qual passam as substâncias indesejáveis presentes no sangue, responsáveis pela alteração da composição de solutos no plasma. Na diálise, solutos do soro como sódio, cloro, potássio, cálcio, magnésio, fosfato, uréia, creatinina, ácido úrico e bicarbonato difundem passivamente entre os compartimentos de acordo com um gradiente de concentração. Durante a hemodiálise o sangue é continuamente removido de uma artéria, bombeado pela máquina e então devolvido à veia (CARRARA *et al.*, 2009).

A prevalência de pacientes dependentes de hemodiálise é bastante alta no Brasil e, segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) (2008), estima-se que existam 87.044 pacientes em diálise no país, sendo detectado um aumento relevante no número de pacientes em tratamento dialítico entre os anos 2000 e 2008, conforme observado na figura 1.



**Figura 1:** Total de pacientes em tratamento dialítico por ano no Brasil

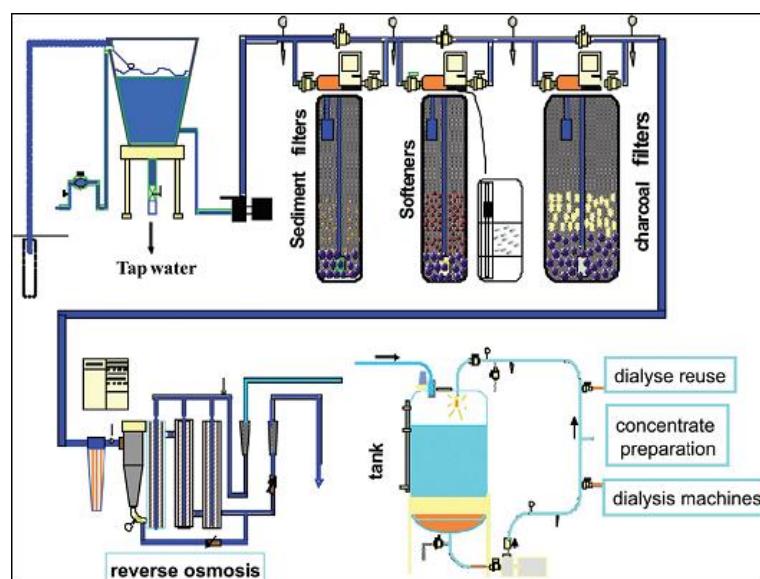
**Fonte:** SBN (2008)

A água constitui-se na principal matéria prima da hemodiálise, sendo utilizada na preparação do dialisato e no reprocessamento dos dialisadores (HOENICH; LEVIN, 2003). Portanto, o monitoramento da qualidade da água durante a hemodiálise é uma preocupação constante dos profissionais da saúde, uma vez que contaminações podem levar a sérias conseqüências aos pacientes (LIMA et al., 2005), que são expostos a volumes entre 400 e 600 litros de fluido de diálise por semana, totalizando 18.000 a 36.000 litros ao ano (ARDUINO *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2005; NYSTRAND, 2008).

Os pacientes com insuficiência renal crônica sofrem de anomalias no sistema imune, como resultado direto da uremia e suas conseqüências metabólicas, tornando-os mais susceptíveis a infecções. Tais anomalias incluem o prejuízo da ação dos neutrófilos, monócitos e linfócitos B e T, conduzindo ao processamento inadequado de antígenos, à produção de anticorpos e à resposta imune comunicada pelas células e assim à incidência aumentada de infecções bacterianas (LIMA *et al.*, 2005; JABER, 2005). Quando a água não é tratada corretamente, vários contaminantes químicos e bacteriológicos poderão ser transferidos para os pacientes devido ao contato entre o dialisato e o sistema sangüíneo dos mesmos, sendo que altas concentrações bacterianas podem colocá-los em risco de septicemia ou endotoxemia. A passagem da endotoxina bacteriana pela membrana pode desencadear uma resposta inflamatória pela estimulação dos macrófagos e subsequente produção de citocinas (BIERNAT *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2006).

Portanto, a qualidade da água e do dialisato são essenciais para o bem estar dos pacientes e crucial para a prevenção da inflamação crônica silenciosa associada à hemodiálise, supressão de reações pirogênicas e melhor controle da anemia derivada da insuficiência renal crônica (ARDUINO *et al.*, 1991; GOMILA *et al.*, 2005).

Cada unidade de hemodiálise é responsável pelo tratamento da água fornecida pela rede pública para a obtenção de uma água com características físico-químicas e microbiológicas compatíveis com os padrões exigidos. Para o tratamento, a água da rede pública passa primeiramente através de filtros mecânicos (remoção das partículas em suspensão), do abrandador (controle da dureza da água – cálcio e magnésio), de filtros de carvão vegetal (adsorção de cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas), dos deionizadores e por fim, pelas membranas da osmose reversa. Após esta etapa, é armazenada em tanques para a distribuição subsequente através da tubulação de PVC e abastecimento de todo o sistema de água da unidade (Figura 2). Em unidades de hemodiálise brasileiras, a osmose reversa é o sistema freqüentemente usado para o tratamento da água, sendo empregada em aproximadamente 93,7% das unidades segundo a SBN (2008). A osmose reversa retém entre 95 a 99% dos contaminantes químicos, praticamente todas as bactérias, fungos, algas e vírus, além de substâncias pirogênicas e materiais protéicos de alto peso molecular (SILVA *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 2002; CAPELLI *et al.*, 2006).



**Figura 2:** Sistema de tratamento da água em uma unidade de hemodiálise

Em tal sistema, as tubulações, os tanques e as torneiras representam reservatórios potenciais para os microrganismos capazes de formar biofilmes, os quais, uma vez formados são extremamente difíceis de erradicar por processo químico ou mecânico. Várias bactérias com capacidade de formar biofilmes são descritas na literatura como as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Mycobacterium* (CAPELLI *et al.*, 2006; MONTANARI *et al.*, 2009). Segundo Nystrand (2008), se ocorre formação de biofilme em um sistema, o índice de microrganismos no mesmo é muito mais elevado do que indica a análise microbiológica da água.

O incidente ocorrido no Instituto de Doenças Renais em Caruaru, Pernambuco, durante o mês de fevereiro de 1996, transformou a história e a prática clínica da Hemodiálise. O instituto mantinha 131 pacientes em tratamento dialítico, destes, 100 pacientes desenvolveram falência hepática aguda e 52 pacientes foram a óbito, caracterizando a “Síndrome de Caruaru”. Após as investigações realizadas pelas autoridades sanitárias, evidenciou-se a presença de microcistina, uma toxina liberada por cianobactéria, no filtro de carvão usado no instituto, no dialisador, no plasma e no fígado dos pacientes acometidos (AZEVEDO *et al.*, 2002).

O reconhecimento dos riscos durante o tratamento de hemodiálise levou à criação de diversos órgãos e comissões que regulamentam e estabelecem critérios para a composição adequada da água a ser utilizada pelos serviços de Terapia Renal Substitutiva (SILVA *et al.*, 1996; BRASIL, 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que estabelece os critérios de qualidade da água para diálise conforme a Resolução - RDC 154, de 15 de junho de 2004, segundo a qual a água utilizada na preparação das soluções para a diálise deve ter a sua qualidade garantida em todas as etapas de tratamento, mediante o monitoramento dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos. O valor máximo permitido de bactérias heterotróficas na água tratada é de até 200 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro, enquanto o dialisato pode apresentar um limite maior, de até 2000 UFC/mL. Testes microbiológicos da água e do dialisato devem ser realizados mensalmente ou, toda vez que ocorrerem manifestações pirogênicas, bacteremia ou suspeitas de sepse nos pacientes, assim como após qualquer modificação no sistema de tratamento ou distribuição da água.

A água usada durante sessões de diálise pode ser responsável por um número crescente de infecções e surtos de infecções sistêmicas em unidades de

hemodiálise, sendo geralmente causados pela contaminação microbiológica da água, seja durante o seu tratamento, a sua distribuição, contaminação dos fluídos de diálise ou equipamentos, ou ainda por reprocessamento inadequado dos dialisadores (ROTH; JARVIS, 2000; CAMARGO *et al.*, 2001; JABER, 2005).

Os pacientes renais crônicos, por terem o sistema imune comprometido, são susceptíveis a grande número de doenças infecciosas (ARVANITIDOU *et al.*, 2003; Lima, 2005), e apresentam maior risco de desenvolver sepse que qualquer outra população (ABBOTT; AGODOA, 2001).

Segundo dados da SBN (2008), a taxa de mortalidade anual entre pacientes submetidos à hemodiálise no Brasil é de 15,2% e infecções são a segunda causa mais comum, contabilizando 26% das mortes. A sepse, com 10,9% de todas as mortes, é a complicação infecciosa mais comum de mortalidade.

## **2.2 Bacilos Gram-Negativos Não Fermentadores**

A desinfecção inadequada do sistema de distribuição da água tem sido implicada como uma possível fonte para os surtos de infecções bacterianas. A maior incidência (em torno de 90%) é de bactérias Gram-negativas, particularmente as pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*. Espécies do gênero *Pseudomonas* estão amplamente disseminadas na natureza e, devido a sua extraordinária versatilidade fisiológica, podem se multiplicar até mesmo em água destilada. Estas bactérias se multiplicam com rapidez e geram altos níveis de endotoxinas, portanto uma baixa contagem de colônias bacterianas não significa ausência de endotoxinas (PISANI *et al.*, 2000; ARVANITIDOU *et al.*, 2003).

Em clínicas de hemodiálise, bacteremia por *Burkholderia cepacia* é uma preocupação crescente, pois este microrganismo coloniza com sucesso os fornecimentos de água, membranas filtrantes e soluções antissépticas (MAGALHÃES *et al.*, 2003). A sepse em pacientes imunocomprometidos causada por *Burkholderia cepacia* tem sido relatada desde 1971 (KAITWATCHARACHAI *et al.*, 2000).

Alguns microrganismos não tão frequentes, podem causar infecções em pacientes imunocomprometidos, como é o caso de *Aeromonas hydrophila*, amplamente distribuído em ambientes aquáticos, podendo estar associada com

várias manifestações clínicas em pacientes submetidos à hemodiálise. Trabalhos comprovam casos de bacteremia por *A. hydrophila* nesses pacientes (LIN *et al.*, 1996).

Vários autores descrevem a presença de bactérias, principalmente gram-negativas em sistemas de distribuição de água em unidades de hemodiálise. Arvanitidou *et al.*, (1998) estudou 85 centros de hemodiálise na Grécia, isolando várias espécies de bactérias gram-negativas. Dentre as bactérias isoladas por Lima *et al.* (2005) de água utilizada em hemodiálise de três hospitais, 90% eram bactérias Gram-negativas, predominando o gênero *Pseudomonas*, sendo todas provenientes de água pós-tratamento. Outros trabalhos relatam o isolamento de bactérias de unidades de hemodiálise, incluindo o sistema de distribuição de água, máquinas de hemodiálise e água de reuso, sendo a maioria bactérias gram-negativas. (LIMA *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2007). Um dado preocupante foi a resistência a três ou mais antibióticos apresentada por 60% dos isolados de Borges *et al.* (2007).

A presença dessas bactérias no sistema de distribuição de água em clínicas de hemodiálise constitui um risco para os pacientes submetidos à diálise. A ocorrência de sepse entre esses pacientes se agrava com o aumento da multiresistência aos antimicrobianos pelas bactérias presentes nos sistemas de distribuição e, a capacidade de adquirir facilmente determinantes de resistência. Bacilos Gram-negativos multiresistentes, incluindo os microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp. podem apresentar resistência aos antimicrobianos disponíveis (TOKARS, 2000; ARVANITIDOU *et al.*, 2003).

### 2.3 Micobactérias

O gênero *Mycobacterium*, único da família Mycobacteriaceae, apresenta espécies cosmopolitas amplamente distribuídas na natureza vivendo em diversos ambientes como solo, água e poeira. Compreende 148 espécies e 11 subespécies registradas na lista de nomes bacterianos aprovados (EUZÉBY, 2010).

As bactérias que compõem o gênero *Mycobacterium* têm forma de bastonetes retos ou ligeiramente curvos, com 0,2-7,0 x 1,0-10 µm de comprimento. São imóveis, não formam esporos, não possuem cápsulas, são aeróbias e quimiorganotróficas. Apresentam crescimento lento ou muito lento, sendo que as colônias aparecem em 5

a 60 dias em temperatura ótima de crescimento (25°, 37°, ou 42°C) (GOODFELLOW; MAGEE, 1998; LIVANAINEN *et al.*, 1999, LEÃO *et al.*, 2004).

As micobactérias se diferenciam das demais eubactérias por sua parede celular, a qual possui alto conteúdo lipídico (60% do peso seco da parede celular), destacando-se os ácidos micólicos e ácidos graxos  $\beta$ -hidroxilados de alto peso molecular (60-90 átomos de carbono), importantes na patogenicidade e caracterização das diferentes espécies, pela análise de perfis de ácidos micólicos (GOODFELLOW; MAGEE, 1998; KARTMANN *et al.*, 1999; LAURENT *et al.*, 2003).

Devido à composição única de sua parede celular, as micobactérias apresentam alta resistência a vários compostos químicos e dessecação, crescimento lento (dificulta a entrada de nutrientes) e dificuldade na penetração de drogas antimicrobianas. É também devido à sua parede celular que são consideradas bacilo álcool-ácido-resistentes (BAAR), característica que resulta na necessidade de coloração específica como a de Ziehl-Neelsen (KANTOR; LASZLO, 1998; SELVAKUMAR *et al.*, 2002).

O gênero *Mycobacterium* é constituído por espécies do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*), *M. leprae* e outras denominadas micobactérias não tuberculose (MNT) (COLLINS *et al.*, 1997; BROSCHE *et al.*, 2002). As espécies mais conhecidas dentre as micobactérias são os microrganismos patogênicos *M. tuberculosis* (agente etiológico da tuberculose) e *M. leprae* (agente etiológico da hanseníase). Embora a tuberculose tenha sido quase erradicada durante o século XX, a ocorrência da doença vem aumentando, levando a mais de dois milhões de mortes anuais, especialmente nos países menos desenvolvidos (JING *et al.*, 2004). As espécies do complexo *M. tuberculosis* causam tuberculose no homem ou em animais. Esse complexo é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose humana, *M. bovis*, principal agente da tuberculose bovina, *M. bovis*-BCG, *M. africanum*, agente da tuberculose humana encontrado mais freqüentemente na África e *M. microti* responsável por tuberculose em roedores. Essas espécies são muito similares e apresentam 99,9% de identidade genética, possuindo a seqüência 16S rRNA idêntica. No entanto, apresentam diferenças fenotípicas, epidemiológicas e de patogenicidade (BROSCHE *et al.*, 2002; COUSINS *et al.*, 2003).

Outras espécies de micobactérias, as MNT, são microrganismos ambientais amplamente distribuídos na natureza e têm sido isoladas de água, água de torneira,

solo e soluções cirúrgicas. Logo após a descoberta do *M. tuberculosis* por Robert Koch, surgiu o primeiro relato de micobactéria em amostra ambiental. Subseqüentemente, MNT foram isoladas de amostras ambientais, a maioria de água e solo, no mundo inteiro. Algumas das espécies de MNT são *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *M. wolinsky*, entre outras (KATOCH, 2004; van INGEN *et al.*, 2009).

Fatores tais como a parede hidrofóbica rica em lipídeos, formação de biofilme, resistência a ácidos, sobrevivência anaeróbia e o metabolismo de compostos recalcitrantes de carbono, permitem a sobrevivência e o crescimento das MNT em inúmeros habitats. Finalmente, o crescimento lento permite que as micobactérias adaptem-se às mudanças antes de perder a viabilidade (FALKINHAM III, 2009).

Seu potencial patogênico é reconhecido desde o início do século passado, causando doenças no homem chamadas “micobacterioses”. Podem causar infecção pulmonar e não pulmonar, geralmente em indivíduos imunocomprometidos como indivíduos com AIDS, ou portadores de outras doenças de base como fibrose cística, enfisema, pneumoconiose, bronquiectasia, alcoolismo crônico, entre outras (KATOCH, 2004; van INGEN *et al.*, 2009).

Segundo Tortoli (2003), as MNT podem ser identificadas com base em testes fenotípicos (tempo de crescimento, produção ou não de pigmentos, provas bioquímicas, crescimento ou não na presença de inibidores químicos) e testes moleculares (PRA - PCR Restriction Analysis, sondas genéticas). No entanto, a identificação fenotípica é demorada e não conclusiva para muitos isolados devido a características variáveis (KATOCH, 2004).

De acordo com as características fenotípicas as MNT podem ser classificadas em quatro grupos com base em duas características: 1) produção de pigmentos carotenóides e 2) tempo de crescimento em meio de cultura; rápido, se ocorrer antes de sete dias e lento, se ocorrer em sete dias ou mais (RUNYON, 1959; COLLINS *et al.*, 1997).

Podem ainda ser classificadas conforme sua capacidade de causar doença no homem como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas (Tabela 1). As MNT potencialmente patogênicas podem causar doenças em humanos e animais as quais diferem em severidade e importância em saúde pública. Geralmente as doenças disseminadas em pacientes portadores de AIDS estão associadas a espécies de crescimento lento (BARRETO *et al.*, 1993; ATS, 1997). Por outro lado,

as infecções pós-traumáticas são causadas por espécies de crescimento rápido (FREITAS *et al.*, 2003; WINTHROP *et al.*, 2004).

**Tabela 1** – Classificação das espécies de micobactérias de acordo com o risco de infecção em humanos

MNT POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS	MNT RARAMENTE PATOGÊNICAS
<i>M. abscessus</i>	<i>M. agri</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. aurum</i>
<i>M. avium</i>	<i>M. branderi</i>
<i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	<i>M. chitae</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. duvalli</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. fallax</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. flavescens</i>
<i>M. genavense</i>	<i>M. gastri</i>
<i>M. haemophilum</i>	<i>M. gordonae</i>
<i>M. immunogenum</i>	<i>M. hassiacum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. mageritense</i>
<i>M. kansasii</i>	<i>M. neoaurum</i>
<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>
<i>M. malmoense</i>	<i>M. phlei</i>
<i>M. marinum</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. shimoidei</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. simiae</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. szulgai</i>	
<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. xenopi</i>	

Fonte: LEÃO *et al.* (2004, p.23)

Diversas espécies de micobactérias como *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. marinum* e *M. xenopi*, são microrganismos potencialmente patogênicos e podem ser responsáveis por doenças pulmonares, cutâneas, linfadenite, entre outras (DAILLOUX *et al.*, 2003; DROBNIEWSKI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2010). As espécies mais isoladas no Brasil são *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* e o complexo *M. avium* (MAC) (LEITE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2002).

Segundo Brown-Elliott e Wallace Jr (2002) as espécies de *M. fortuitum* e *M. chelonae* são consideradas micobactérias de crescimento rápido e patogênicas. *M. fortuitum* cresce a 43°C, enquanto *M. chelonae* não se desenvolve nesta

temperatura (HEIFETS; JENKINS, 1998; MUNOZ *et al.*, 1998; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2002). Estas duas espécies podem causar infecções pulmonares, de pele e tecidos. Têm sido isoladas de muitas fontes naturais como rios, mares, solo e também de outras fontes como águas de hospitais, gelo e máquinas de gelo, águas de piscicultura, aquários e água de piscinas térmicas (FALKINHAM III, 1996; WOO *et al.*, 2002; BROWN-ELLIOTT; WALLACE JR, 2002).

As cepas pertencentes ao Complexo *Mycobacterium avium* (MAC) podem ser isoladas de ambientes naturais como a água e solo com muita matéria orgânica, baixo pH e pouco O<sub>2</sub> dissolvido. Em laboratório, requer pH em torno de 5,0 à 5,5 para seu melhor desenvolvimento, assim como temperaturas em torno de 42/45 °C (FALKINHAM III, 1996; FALKINHAM III, 1998). Infecções causadas por MAC em pacientes imunocompetentes são principalmente pulmonares ou disseminadas (FALKINHAM III, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2000; LAURENT *et al.*, 2003). Segundo Jing (2004) a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos lista o MAC como um dos dez microrganismos contaminantes de água potável, pois a infecção pelo MAC ocorre primeiramente devido à ingestão oral, sendo a inalação uma rota secundária de infecção.

*M. gordonae* é uma micobactéria de crescimento lento, escotocromogênica, isto é, produz pigmento amarelo ou laranja mesmo na ausência de luz. É considerada não patogênica, embora, ocasionalmente, seja descrita como agente de infecções, especialmente em pacientes com predisposição ou imunossupressão como AIDS, terapia com esteróides, carcinoma, transplantados e crianças. É extensamente distribuída na água e no solo, e geralmente é tida como um contaminante quando encontrada em culturas micobacterianas (LEÃO *et al.*, 2004; GRIFFITH *et al.*, 2007).

*M. scrofulaceum* é uma das espécies de micobactérias mais conhecidas, e foi descrita aproximadamente há 50 anos. É descrito como uma micobactéria de crescimento lento, escotocromogênica, caracterizada pela inatividade em quase todos os testes bioquímicos freqüentemente executados, e produtora de catalase. Esta espécie foi isolada de lagos, rios e de aerossóis naturais. O isolamento de águas naturais é esperado para um microrganismo que causa linfadenite cervical em crianças. A associação a outras manifestações clínicas é rara, mas foi descrito causando infecção pulmonar em adultos, infecções disseminadas (igualmente relatada em pacientes com AIDS e em pacientes com e sem imunodeficiência) e

lesões de pele ulcerosas e nodular crônicas (FALKINHAM, 1996; LEÃO *et al.*, 2004; MARAZZI *et al.*, 2010).

Infecções humanas por MNT não ocorrem por contato pessoa-pessoa, mas sim por ingestão, inalação ou inoculação dos microrganismos a partir de fontes ambientais tais como a água. Micobactérias que colonizam os sistemas de abastecimento de água doméstico e público estão associadas às infecções humanas (SCHULZE-RÖBBECKE; BUCHHOLTZ, 1992). Segundo Covert *et al.* (1999) a persistência de micobactérias na água potável, especialmente na água de torneira, é atribuída a sua elevada resistência aos desinfetantes geralmente utilizados no tratamento da água. A resistência das micobactérias à desinfecção química se deve principalmente à concentração elevada de ácidos micólicos em sua parede celular, crescimento lento, aderência à superfície inerte e hidrofobicidade (WHO, 2004; LEE *et al.*, 2010).

MNT têm sido isoladas de vários ambientes aquáticos naturais. Sabe-se que crescem bem em água tratada e fluídos de diálise, colonizando as superfícies internas das tubulações de distribuição, máquinas de diálise, e componentes dos sistemas do tratamento da água tais como resinas do abrandador e deionizador, e membranas de osmose reversa (CARSON *et al.*, 1988, GOMILA *et al.*, 2005, MONTANARI *et al.*, 2009).

Segundo Band *et al.*, (1981), cepas de *M. chelonae* associadas a episódios de peritonite em pacientes submetidos a diálise não foram eliminadas das máquinas de diálise por tratamento *overnight* com formaldeído a 2%. Em estudos laboratoriais, estas cepas de *M. chelonae* mostraram alta resistência ao formaldeído tanto que sobreviventes foram encontrados em soluções aquosas de formaldeído a 2% após 24 horas de exposição.

Bolan *et al.* (1985), relataram um surto ocorrido entre abril e novembro de 1982 em Louisiana (EUA), no qual 27 de 140 pacientes de um centro de hemodiálise foram infectados por micobactérias de crescimento rápido; 14 tiveram somente bacteremia, 3 apresentaram infecções de tecidos moles, um infecção de fístula e 9 apresentaram doença amplamente disseminada. Dos 26 isolados identificados, 25 eram *M. chelonae* ssp. *abscessus*, e um *M. chelonae*-like. Um fator comum a todos os pacientes foi exposição à dialisadores reprocessados.

Entre julho 1987 e janeiro 1988, conforme descrito por Lowry *et al.* (1990), cinco pacientes submetidos a diálise em uma clínica de hemodiálise na Califórnia

desenvolveram infecções sistêmicas por *M. chelonae abscessus*. Quatro dos cinco pacientes tiveram infecções arteriovenosas, e dois foram a óbito durante a terapia antimicrobiana.

Becker *et al.* (2003), descrevem um caso de bacteremia e infecção arteriovenosa por *M. neoaurum* em uma paciente de hemodiálise.

Estes relatos demonstram que os pacientes submetidos à hemodiálise apresentam risco de desenvolver infecções por micobactérias. Outro fator preocupante é que a contaminação da água e do dialisato por estes microrganismos pode não ser reconhecida pelos métodos rotineiros de análise microbiológica empregados pelos centros de hemodiálise (PIZZARELLI, 2004; MONTANARI *et al.*, 2009). Este fato enfatiza ainda a importância do uso de procedimentos eficientes para desinfecção dos dialisadores nos centros de hemodiálise, com intuito de minimizar a exposição dos pacientes a contaminantes (HOENICH, *et al.*, 2010).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, K. C.; AGODOA, L. Y. Etiology of Bacterial Septicemia in Chronic Dialysis Patients in the United States. **Clin Nephrol**, v. 56, n. 2, p. 124 - 131, 2001.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, p. 367 - 416, 2007.

ANDERSON, W. B.; SLAWSON, R. M.; MAYFIELD, C. I. A Review of Drinking-Water-Associated Endotoxin, Including Potencial Routes of Human Exposure. **Can J Microbiol**, v. 48, p. 567 - 587, 2002.

ARDUINO, M. J.; BLAND, L. A.; AGUERO, S. M.; CARSON, L. A., RIDGEWAY, M.; FAVERO, M. S. Comparison of Microbiologic Assay for Hemodialysis Fluids. **J Clin Microbiol**, v. 29, n. 3, p. 592 - 594, 1991.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Isolated in Hemodialysis Water and Dialysate of Renal Units: Results of a Greek Multicenter Study. **J Appl Microbiol**, v. 95, n. 1, p. 180 - 185, 2003.

AZEVEDO, S.M.F.O.; CARMICHAEL, W.W.; JOCHIMSEN, E.M.; RINEHART, K.L.; LAU, S.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441 - 446, 2002.

BAND, J.D.; WARD, J.I.; FRASER, D.W.; PETERSEN, N.J.; HAYES, P.W.; SILCOX, V.A.; GOOD, R.C.; OSTROY, P.R.; KENNEDY, J. Peritonitis due to a Mycobacterium chelonae-like organism associated with intermittent chronic peritoneal dialysis. **J Infect Dis**, v. 145, p. 9 - 17, 1981.

BARRETO, J.A.; PALACI, M.; FERRAZOLLI, L.; MARTINS, M.C.; SULEIMAN, J.; LORENÇO, R.; FERREIRA Jr., O.C. RILEY, L.W.; JOHNSON Jr., W.D.; GALVÃO, P.A.A. Isolation of Mycobacterium avium Complex from Bone Marrow Aspirates of AIDS Patients in Brazil. **J Infect Dis**, v. 168, p. 168 - 177, 1993.

BECKER, M.L.; SUCHAK, A.A.; WOLFE, J.N.; ZARYCHANSKI, R.h; KABANI, A.; NICOLLE, L.E. *Mycobacterium neoaurum* bacteremia in a hemodialysis patient. **J Infect Dis**, v. 14, p. 45 - 48, 2003.

BIERNAT J.C., SANTOS F., SANTOS A.G., RAUBACH A.A., SOUZA M.L., DEMIN M.S., AGUIRRE A.: Detecção de Endotoxina pelo Teste do Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) em Unidades de Hemodiálise. **Medonline**, v. 1, n. 2, 1998.

BOLAN, G.; REINGOLD, A. L.; CARSON, L. A.; SILCOX, V. A.; WOODLEY, C. L., HAYES, P. S.; HIGHTOWER, A. W.; McFARLAND, L.; BROWN, J. W. 3rd; PETERSEN, N. J. Infections with *Mycobacterium chelonae* in Patients Receiving

Dialysis and Using Processed Hemodialyzers. **J Infect Dis**, v. 152, n. 5, p. 1013 - 1019, 1985.

BORGES, C.R.M.; LASCOWSKI, K.M.S.; FILHO, N.R.; PELAYO, J.S. microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. **J Appl Microbiol**, v. 103, p. 1791 - 1797, 2007.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC N<sup>o</sup>. 154 de 15.06.2004. DOU 22.12.2000. Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília, Ministério da Saúde, 2004.

BROWN-ELLIOTT, B.A; WALLACE Jr, R.J. Clinical and Taxonomic Status of Pathogenic Nonpigmented or Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 15 n. 4, p. 716 - 746, 2002.

BROSCH, R.; GORDON, S.V.; MARMIESSE, M.; BRODIN, P.; BUCHRIESER, C.; EIGLMEIER, K.; GARNIER, T.; GUTIERREZ, C.; HEWINSON, G.; KREMER, K.; PARSONS, L.M.; PYM, A.S.; SAMPER, S.; VAN SOOLINGEN, D.; COLE, S.T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684 - 3689, 2002.

CAPELLI, G.; RICCARDI, M.; PERRONE, S.; BONDI, M.; LIGABUE, G.; ALBERTAZZI, A. Water treatment and monitor disinfection. **Hemodialysis International**, v.10, p. S13 - S18, 2006.

CARRARA, C. L.; GOMES, R. T.; GUERRA, L. L.; ESTEVES, A. P. Qualidade Microbiológica dos Fluídos Hemodialíticos: Perspectivas para um Serviço de Diálise Seguro e Eficiente. **Pratica Hospitalar**, n. 66, p. 51 - 53, 2009.

CARSON, L. A.; BLAND, L. A.; CUSICK, L. B.; FAVERO, M. S.; BOLAN, G. A.; REINGOLD, A. L.; GOOD, R. C. Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Water Supplies of Hemodialysis Centers. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, n. 12, p. 3122 - 3125, 1988.

COLLINS L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 5, p. 1004 - 1009, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION: Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. **MMWR Recommendations and Reports: morbidity and mortality weekly report**, v. 50, n. RR-5, p. 1 - 43, 2001.

COLLINS, C.H; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. **Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice**. 3. Ed. Oxford : Butterworth-Heinemann, 1997.

COUSINS, D.V., BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRAIGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.;

ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 53, p. 1305 - 1314, 2003.

COVERT, T.; RODGERS, M.; REYES, A. Occurrence of Nontuberculous Mycobacteria in Environmental Samples. **J Clin Microbiol**, v. 65, n. 6, p. 2492 - 2496, 1999.

DAILLOUX, M., ALBERT, M.; LAURAIN, C.; ANDOLFATTO, S.; LOZNIEWSKI, A.; HARTEMANN, P.; MATHIEU, L. *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p. 6946 - 6948, 2003.

DE LOS SANTOS, C.A.; ANTONELLO, I.C.F., FIGUEIREDO, C. E. P. Further Evidence that Ultrapure Water Decreases Inflammation in Hemodialysis. **J Bras Nefrol**, v. 28, n. 3, p. 134 - 138, 2006.

DROBNIIEWSKI, F.A.; AMIN, A.K., BALABANOVA, Y. Non pulmonary tuberculosis and mycobacterial infection. **Medicine**, v. 37, p. 649 - 653, 2009.

EUZÉBY J.P. 2010. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>). Acesso em: 10 fev 2010.

FALKINHAM III, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous micobactéria. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, p. 177 - 215, 1996.

FALKINHAM III, J. O. Transmission of mycobacteria. In GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P. A. **Mycobacteria Basic aspects**. v. 1, New York : Chapman and Hall, p. 178 - 209, 1998.

FALKINHAM III, J.O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human enviroment. **J Appl Microbiol**, v. 107, p. 356 - 367, 2009.

FREITAS, D.; ALVARENGA, L.; SAMPAIO, J.; MANNIS, M.; SATO, E.; SOUSA, L.; VIEIRA, L.; YU, M.C.; MARTINS, M.C.; HOFFLING-LIMA, A.; BELFORT JR., R. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIK. **Ophthalmology**, v. 110, p. 276 - 285, 2003.

GOMILA, M.; GASCÓ, J.; BUSQUETS, A.; GIL, J.; BERNABEU, R.; BUADES, J. M.; LALUCAT, J. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 52, p. 101 - 114, 2005.

GOODFELLOW, M.; MAGEE, J.G. Taxonomy of Mycobacteria. In GANGADHARAM, P.R.J.; JENKINS, P.A. **Mycobacteria Basic aspects**. v. 1, New York, NY : Chapman and Hall, p. 1 - 71, 1998.

GRIFFITH, D.E., AKSAMIT, T., BROWN-ELLIOTT, B.A., CATANZARO, A., DALEY, C., GORDIN, F., HOLLAND, S. M., HORSBURGH, R., HUITT, G., IADEMARCO, M. F., ISEMAN, M., OLIVIER, K., RUOSS, S., REYN, C. F., WALLACE Jr, R. J.; WINTHROP, K. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and

Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. **Am J Respi Crit Care Med**, v. 175, 2007.

HEIFETS, L. B.; JENKINS, P. A. Speciation of mycobacteria in clinical laboratories. In GANGADHARAM, P. R. J.; JENKINS, P. A. **Mycobacteria Basic aspects** v. 1, New York : Chapman and Hall, p. 308 - 350, 1998.

HOENICH, N. A.; LEVIN, R. The Implications of Water Quality in Hemodialysis. **Semin Dial**, v. 16, n. 6, p. 492 - 497, 2003.

HOENICH, N. A.; LEVIN, R., RONCO, C. Water for Hemodialysis and Related Therapies: Recent Standards and Emerging Issues. **Blood Purif**, v. 29, p. 81 - 85, 2010.

JABER, B. L. Bacterial infections in hemodialysis patients: Pathogenesis and prevention. **Kidney Int**, v. 67, p. 2508 - 2519, 2005.

JING, G.; HOLLIS, G.; POLACZYK, A.; ELURU, H.B.; KINKLE, B.; MAST, D.; OERTHERB, D.B.; PAPAUTSKY, I. Developing rapid detection of mycobacteria using microwaves. **Analyst**, v. 129, p. 963 - 969, 2004.

KAITWATCHARACHAI, C.; SILPAPOJAKUL, K.; JITSURONG, S.; KALNAUWAKUL, S. An Outbreak of *Burkholderia cepacia* Bacteremia in Hemodialysis Patients: an Epidemiologic and Molecular Study. **Am J Kidney Dis**, v. 36, n. 1, p. 199 - 204, 2000.

KANTOR, I.N.; LASZLO, A. Tuberculosis laboratory procedures for developing countries. In: GANGADHARAM, P. R. J., JENKINS, P. A. **Mycobacteria Basic aspects**. v. 1, New York : Chapman and Hall, p. 351 - 390, 1998.

KARTMANN, B.; STENGLER, S.; NIEDERWEIS, M. Porins in the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v. 181, n. 20, p. 6543 - 6546, Oct. 1999.

KATOCH, V. M. Infections due to Non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J Med Res**, v. 120, p. 290 - 304, 2004.

LAURENT, J.; HAUGE, K.; BURNSIDE, K.; CANGELOSI, G. Mutation Analysis of Cell Wall Biosynthesis in *Mycobacterium avium*. **J Clin Microbiol**, v. 185, n. 16, p. 5003 - 5006, 2003.

LEÃO S.C, MARTIN A., MEJIA G.I, PALOMINO J.C, ROBLEDO J., TELLES M.A.S, PORTAELS F. **Practical handbook for phenotypic and genotypic identification of Mycobacteria**. [S.l : s.n], 2004.

LEE, E.; YOON, T.; LEE, M.; HAN, S.; KA, J. Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. **Water Res**, v. 44, p. 1329 - 1334, 2010.

LEITE, C. Q. F.; SOUZA, C. W. O.; LEITE, S. R. A. Identification of Mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 801 - 805, 1998.

LIMA, J. R. O.; MARQUES, S. G.; GONÇALVES, A. G.; FILHO, N. S.; NUNES, P. C.; SILVA, H. S.; MONTEIRO, S. G.; COSTA, J. M. L. Microbiological Analyses of Water from Hemodialysis Services in São Luís, MA, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 36, p. 103 - 108, 2005.

LIN, S.H.; SHIEH, SD.; LIN, Y.F.; DE BRAUWER, E.; LANDUYT, H.W.V.; GORDTS, B.; BOELAERT, J.R. Fatal *Aeromonas hydrophila* bacteremia in a hemodialysis patient treated with deferoxamine. **Am J Kidney Dis**, v. 27, p. 733 - 735, 1996.

LIVANAINEN, E. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. **J Appl Microbiol**, v. 86, p. 673 - 681, 1999.

LOWRY, P.W.; BECK-SAGUE, C.M.; BLAND, L.A.; AGUERO, S.M.; ARDUINO, J.; MINUTH, A.N.; MURRAY, R.A.; SWENSON, J.M.; JARVIS, W.R. *Mycobacterium chelonae* Infection among Patients Receiving High-Flux Dialysis in a Hemodialysis Clinic in California. **J Infect Dis**, v. 161, p. 85 - 90, 1990.

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

MARAZZI, M.G.; CHAPGIER, A.; DEFILIPPI, A.; PISTOIA, V.; MANGINI, S.; SAVIOLI, C.; DELL'ACQUA, A.; FEINBERG, J.; TORTOLI, E.; CASANOVA, J. Disseminated *Mycobacterium scrofulaceum* infection in a child with interferon-gamma receptor 1 deficiency. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 167 - 170, 2010.

MONTANARI, L.B; SARTORI, F.G; CARDOSO; M.G.O; VARO, S.D; PIRES, R.H; LEITE, C.Q.F; PRINCE, K.; MARTINS, C.H.G. Microbiological Contamination Of A Hemodialysis Center Water Distribution System. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 37 - 43, 2009.

MUÑOZ, M.; RAYNAUD, C.; LANÉELLE, M.; JULIÁN, E.; MARÍN, L.M.L.; SILVE, G.; AUSINA, V.; DAFFÉ, M.; LUQUIN, M. Seroreactive species-specific lipooligosaccharides of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. (formerly *Mycobacterium chelonae-like* organisms): identification and chemical characterization. **Microbiology**, v. 144, p. 137 - 148, 1998.

NYSTRAND, R. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis. **J Chin Med Assoc**, v. 71, n. 5, p. 223 - 229, 2008.

OLIVEIRA, R. S. PCR-Restriction Analysis of a Bone Marrow Isolate from Humana Immunodeficiency Virus-Positive Patient Discloses Polyclonal Infection with Two *Mycobacterium avium* Strains. **J Clin Microbiol**, v. 38, p. 4643 - 4645, 2000.

PISANI, B.; SIMÕES, M.; PRANDI, M.A.G.; ROCHA, M.M.M.; GONÇALVES, C.R.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 59, p. 51 - 56, 2000.

PIZZARELLI, F.; CERRAI, T.; BIAGINI, M.; MALAGUTI, M.; BARGAGNA, R. Dialysis water treatment systems and monitoring in Italy: results of a national survey. **J Nephrol**, v. 17, p.565 - 569, 2004.

ROCHA, A. S. Novel Allelic Variants of Mycobacteria isolated in Brazil as determined by PCR-Restriction Enzyme Analysis of hsp65. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 11, p. 4191 - 4196, 2002.

ROTH, V.R.; JARVIS, W.R. Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. **Semin Dial**, v.13, p. 92 - 96, 2000.

RUNYON, E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. **Med Clin North Am**, v. 43, p. 273 - 290, 1959.

SCHULZE-RÖBBECKE, R.; BUCHHOLTZ, K. Heat Susceptibility of Aquatic Mycobacteria. **Appl Environ Microbiol**, v. 58, n. 6, p. 1869 -1873, 1992.

SELVAKUMAR, N. Inefficiency of 0.3% Carbol Fuchsin in Ziehl-Neelsen Staining for Detecting Acid-Fast Bacilli. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 8, p. 3041 - 3043, 2002.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; ROMÃO Jr., J. E. Revisão / Atualização em diálise: água para hemodiálise. **J Bras Nefrol**, v. 18, n. 2, p. 180 - 188, 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo SBN, 2008**. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/Censo/2008/censoSBN2008.pdf>>

TOKARS, J.I. Infections due to antimicrobial-resistant pathogens in the dialysis unit. **Blood Purif**, v.18, p. 355 - 360, 2000.

VAN INGEN, J.; BOEREE, M.J.; DEKHUIJZEN, P.N.R; VAN SOOLINGEN, D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. **Clin Microbiol Infect**, v. 15, p. 888 - 893, 2009.

WINTHROP, K.C.; ALBRIDGE, K.; SOUTH, D.; ALBRECHT, P.; ABRAMS, M.; SAMUEL, M.C.; LEONARD, W.; WAGNER, J.; VUGIA, D.J. The Clinical Management and Outcome of Nail Salon-Acquired *Mycobacterium fortuitum* Skin Infection. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 38 - 44, 2004.

WOO, P. C. Y. Relatively Alcohol-Resistant Mycobacteria Are Emerging Pathogens in Patients Receiving Acupuncture Treatment. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1219 - 1224, 2002.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo geral

- Pesquisar a prevalência de micobactérias e bacilos gram-negativos não-fermentadores em água e dialisato utilizados em uma clínica de hemodiálise.

### Objetivos específicos

- Identificar as micobactérias através de *PCR-Restiction Enzyme Analysis* (PRA);
- Identificar os bacilos gram-negativos não-fermentadores pelos sistemas API 20NE e Bactray;
- Verificar o comportamento dos isolados frente ao ácido peracético e hipoclorito de sódio em diferentes tempos de ação e concentrações;
- Determinar a susceptibilidade das bactérias aos antimicrobianos de uso clínico;
- Quantificar a formação de biofilmes pelos bacilos gram-negativos não-fermentadores em microplacas de poliestireno.

**ARTIGO. ISOLATION OF MYCOBACTERIA AND NONFERMENTING GRAM-  
NEGATIVE BACILLI IN A HEMODIALYSIS CENTER**

Michelle Siewert<sup>1</sup>, Halha Ostrensky Saridakis<sup>1</sup>, Jacinta Sanchez Pelayo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Laboratory of Bacteriology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

\* Corresponding author: Department of Microbiology, Laboratory of Bacteriology, State University of Londrina, Londrina, PO Box 6001, ZIP code 86051-990, Brazil.

Phone/Fax: 554333714494, Email: [jspelayo@gmail.com](mailto:jspelayo@gmail.com)

## ABSTRACT

Water constitutes the main raw material of hemodialysis due to its role to prepare dialysate and to reprocess dialyzers. Considering the lack of data on the impact of bacterial infections in hemodialysis patients in the Londrina region, this research focused to investigate the presence of mycobacteria and nonfermenting gram-negative bacilli (NFGNB) in water and dialysate used in a hemodialysis center in Londrina, PR. From November 2008 to July 2009, 34 samples of water and 100 samples of dialysate were collected, in which 52 NFGNB and 13 strains of mycobacteria were isolated. The NFGNB were identified by the API 20NE system, and mycobacteria by PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis). All isolates were subjected to the action of peracetic acid and sodium hypochlorite. By 0.2% peracetic acid testing, three strains of *Mycobacterium scrofulaceum* were resistant after 30 minutes (min) exposure and one strain of *Burkholderia pseudomallei* after 15 min. When tested with sodium hypochlorite at 500 ppm, one strain of *M. scrofulaceum* was resistant after 30 min exposure. In tests of adherence to polystyrene, 4 (7.7%) NFGNB strains showed strong adhesion and 16 (30.8%) showed moderate adhesion, demonstrating its ability to form biofilms. Amongst the 50 NFGNB strains submitted to the antimicrobial susceptibility testing, 27 (84%) were susceptible to all drugs tested. The results evidenced water and dialysate as sources of infection by NFGNB and mycobacteria in patients undergone to hemodialysis.

**Key words:** hemodialysis, mycobacteria, nonfermenting gram-negative bacilli, antimicrobial.

## INTRODUCTION

Hemodialysis is an alternative treatment for patients with chronic renal failure, it improves the quality of life of individuals and it may become, for some, the ultimate hope of living, due to the irreversibility of the disease during the waiting for renal transplantation (13). It is characterized as a process in which the renal failure patient's blood runs through a special filter - the dialyzer - during an extracorporeal circulation, enabling debugging and maintenance of the ionic balance of the blood (9).

The prevalence of hemodialysis-dependent patients is high in Brazil, according to data from the Brazilian Society of Nephrology (30), it is estimated that there are 91,314 patients on dialysis in 643 hemodialysis center in the country. The number of end-stage renal disease patients treated with renal replacement therapy is growing worldwide at a rate of approximately 7% per year. In Brazil, between 2000 and 2006, this growth was about 9% per year (31).

Water constitutes the main raw material of hemodialysis, being used to prepare dialysate and to reprocess dialyzers (12). Monitoring of water quality during hemodialysis is a constant concern of health professionals, since contamination can lead to serious consequences for patients, whom are exposed to approximately 400 and 600 liters of dialysis fluid per week, totaling 18,000 to 36,000 liters per year (19). Each hemodialysis center is responsible for treating the water supplied by the public water systems, in order to obtain the required physico-chemical and microbiological standards (16).

The inadequate disinfection of the water distribution system has been implicated as a possible source for outbreaks of bacterial infections. The highest

incidence is of nonfermenting gram-negative bacilli (NFGNB), particularly those belonging to the genus *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* and *Stenotrophomonas* (1, 4). However, cases of infections in hemodialysis patients involving species of the genus *Mycobacterium* were also reported, and it may cause bacteremia, soft tissue infection or even disseminated disease (3, 36).

According to the Brazilian Society of Nephrology (29), the annual mortality rate among hemodialysis patients in Brazil is 15.2%, the second highest cause of death in these patients.

The aim of this study was to investigate the presence of mycobacteria and NFGNB in water and dialysate used in a hemodialysis center in the city of Londrina, PR. The isolation of mycobacteria is relevant once the contamination by this microorganism may not be recognized by routine microbiological methods employed by hemodialysis centers (17). Furthermore, the identification of the microorganisms prevalent in hemodialysis water and dialysate, and its susceptibility to disinfectants employed in the hemodialysis centers, guide the search for more effective disinfection procedures of hemodialysis water distribution systems, thereby reducing the exposure of patients to these microorganisms and consequently the risk of infection by dialysis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Collection of Samples*

Samples were collected on weekly basis at three different points of the Hemodialysis Center in the city of Londrina, PR. On each collection day were collected one sample of pretreatment water (artesian well), one sample of water post

reverse osmosis treatment and five of dialysate from random machines. The samples were collected in sterile glass flasks and immediately forwarded to the Laboratory of Bacteriology of the Department of Microbiology at the State University of Londrina, where they were processed.

From November 2008 to July 2009, 134 samples were collected, including 17 pretreatment water, 17 post treatment water and 100 samples of dialysate.

*Isolation and identification of mycobacteria and gram-negative nonfermenting bacilli*

The isolation of mycobacteria was carried out according to Steadham (27) with some modifications. Therefore, 1000 ml of each sample was filtered through membrane (Millipore, USA), pore size 0.22  $\mu\text{m}$ . The membranes were placed in Falcon tubes containing 5 ml of 0.9% saline solution and stirred for 30-45s to remove the adherent bacteria from the membrane. From this suspension, 100  $\mu\text{l}$  were inoculated into Brain Heart Infusion broth (BHI) (Difco, USA) for isolation of nonfermenting bacteria.

In order to isolate mycobacteria, the suspension in saline solution was treated with 4% sodium hydroxide for 10 min to reduce levels of non-acid-fast bacilli, increasing selectivity for mycobacteria. After dilution in 10 ml of sterile distilled water and centrifugation for 15 min at 2000 rpm, the supernatant was discarded and, to the sediment, added 1.0 ml of 0.2% bovine serum albumin (fraction V). 200  $\mu\text{l}$  of sample was plated onto Löwenstein Jensen (LJ) medium and agar BHI containing 5% glucose. Slants were incubated at 25° C and 37° C and weekly scanned for growth up to 40 days. Colonies of mycobacteria were confirmed as acid-fast bacilli by the Ziehl-Neelsen staining method.

The bacterial DNA was first extracted by adding a purview of a culture in log phase in 1000µl Tris-EDTA (TE), homogenized using a mixer and centrifuged for 5 min at 12,000 rpm in microcentrifuge (Eppendorf, USA). The supernatant was discarded and to the sediment was added 100 µl of TE and homogenized in a mixer. The mixture was boiled for 20 min and then frozen at -20° C for 18 to 24 h. After frosting, it was boiled again for 20 min and then subjected to thermal shock in an ice bath. After that were added 200 µl of TE and 100 µl of chloroform, the suspension was stirred for 10 seconds and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. 200 µl were separated from the supernatant in which was added 300 µl of TE and 500 µl of phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution 25:24:1 (Merck, Germany). After homogenization and centrifugation as described above, DNA was precipitated with 400 µl of cold absolute ethanol (Merck, Germany) homogenized and frozen for 12 h. Finally, centrifuged and washed out three times with 70% ethanol, and once dried the DNA was eluted in 200 µl tri-distillated water and stored at -20° C.

DNA fragment of 439 bp was initially amplified by PCR with the primers Tb 11 (5'ACCAACGATGGTGTGTCCAT) and Tb 12 (5'CTTGTCGAACGCATACCCT), and the amplicon was cleft by restriction enzymes BstEII and HaeIII and separated into fragments by electrophoresis in 4% agarose gel, which was subsequently developed with ethidium bromide, illuminated with UV light and photographed. The PRA band patterns were analyzed by comparison with data in the PRASITE data bank: <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

To identify NFGNB the positive cultures in BHI broth were plated on MacConkey agar (Biobrás, Brazil), and isolated colonies were transferred to biochemical tests EPM (34), MILi (35), and Simmons citrate (Biobrás, Brazil ) for checking the profile of nonfermenting, growing only on the surface of the media.

These strains were tested for oxidase (Laborclin, Brazil) and motility by hanging drop observation (39). The strains were identified by the API 20NE system (Biomérieux, France).

#### *Susceptibility to disinfectants*

The mycobacterial isolates were submitted to peracetic acid (Farmasteril, Farmarin, Brazil) at a concentration of 0.2%, and to sodium hypochlorite at 500 ppm (Qboa, Industry Anhembi, Brazil). A suspension test was performed according to Vizcaino-Alcaide (37). A suspension was prepared out of a log phase culture according tube turbidity 1 of the MacFarland scale, obtaining a suspension with approximately  $10^8$  microorganisms per ml. An aliquot of 100  $\mu$ l of this suspension was added to 5 ml of the disinfectant, remaining in contact for 15 and 30 min on peracetic acid and 30 min on sodium hypochlorite. After these intermissions, aliquots of 100  $\mu$ l were neutralized with 0.05% sodium thiosulfate (Biobrás, Brazil), and cultured in LJ at 37° C until appearance of colonies in LJ tubes, used as control of isolates growth. Cultures subjected to treatment that showed growth of mycobacteria were considered resistant to disinfectant.

The NFGNB isolates were submitted to peracetic acid and sodium hypochlorite at the same concentrations used above. The test was performed according to Litsky and Litsky (15). The isolates were cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco, USA) at 37°C for 24 h. After the incubation period the cultures were adjusted to tube turbidity 1 of the MacFarland scale. An aliquot of 1.0 ml of this suspension was added to 4 ml of disinfectant, leaving in contact for 15 and 30 minutes on peracetic acid and 30 min on sodium hypochlorite. After the contact time

an aliquot of 100  $\mu$ l was plated on Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco, USA) with neutralizing and incubated at 37° C for 24h.

#### *Antimicrobial susceptibility testing of NFGNB*

The antimicrobial susceptibility testing of NFGNB was performed according to the agar disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Oxoid, England), described by Bauer et al. (2). The antimicrobials tested for the genus *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas* were piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, polymyxin B, aztreonam, gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, minocycline, levofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole, as recommended by the CLSI (10). All antibiotics were purchased from Oxoid (England).

The remained NFGNB strains isolated were not submitted to susceptibility testing because the disk diffusion method is not recommended, since no standardized breakpoints are found.

#### *Quantification of biofilm formation*

The NFGNB were tested for quantification of biofilm formation according to the method described by Stepanović et al. (28). The bacteria grew in TSB supplemented with 2% glucose (TSBG) at 37° C for 24 h. The cultures were diluted in TSBG 1:200 and 200  $\mu$ l of this suspension were transferred in triplicate to 96 well polypropylene plates (NUNC, USA), including a negative control with only TSBG and then incubated at 37° C for 24 h. The content of each well was aspirated and washed three times with 250  $\mu$ l of 0.9% saline solution. The adhered bacteria were fixed with 200  $\mu$ l methanol (Merck, Germany) for 15 min, after drying, were stained with 200  $\mu$ l 2% crystal violet solution for 5 min. The exceeded dye was washed out in water and after

dried, the optical density was measured at 550 nm in an ELISA reader (MultiScan EX Labsystem, Uniscience, Finland).

The absorbance value of the sample ( $OD_a$ ) was obtained from the arithmetic mean of the three values of each sample and compared to the absorbance of TSBG (OD) to determine the degree of adhesion according to the classification: Non-adherent ( $OD_a \leq OD$ ); weakly adherent ( $OD < OD_a \leq 2 \times OD$ ); moderately adherent ( $2 \times OD < OD_a \leq 4 \times OD$ ); Strongly adherent ( $4 \times OD < OD_a$ ).

## RESULTS

Among 17 samples of pre-treatment water analyzed, 02 (11.8%) showed mycobacteria growth, and 05 (29.4%) NFGNB growth; From the 17 post-treatment water samples, 02 (11.8%) showed micobactéria growth and 11 (64.7%) NFGNB growth; Among 100 dialysate samples, 9 samples (9%) of mycobacteria and 36 samples (36%) of NFGNB were isolated. Within the isolated bacterias, there was a predomination of the genus *Pseudomonas* (52.3%), followed by the genus *Mycobacterium* (20%). The different species of mycobacteria and NFGNB isolated and their origin are shown in Table 1.

Table 2 sets forth the isolated microorganisms from water and dialysate by collection date. We observed that in 8(47%) of 17 collection dates, the bacteria specie isolated from dialysate was also isolated from pre-treatment or post-treatment water.

**Table 1** Frequency of mycobacteria species and NFGNB by type of sample

Microorganism	Number of isolates			Total
	Pre-treatment water	Post-treatment water	Dialysate	
<i>Mycobacterium fortuitum</i> type 1	0	0	2	2
<i>Mycobacterium gordonae</i> type 3	1	2	4	7
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> type 1	1	0	3	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	2	16	21
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1	5	7
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	6	6
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0	1	1
<i>Burkholderia gladioli</i>	0	2	1	3
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0	1	0	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	3	7	10
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	0	0	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0	1	0	1
Unidentified	0	1	0	1
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>45</b>	<b>65</b>

Regarding the susceptibility to 0.2% peracetic acid, 01 strain (*Burkholderia pseudomallei*) was resistant after 15 min of exposure and 03 strains (*Mycobacterium scrofulaceum*) showed resistance after 30 min of exposure. All NFGNB were sensitive to 500 ppm sodium hypochlorite for 30 min and, 01 strain (*M. scrofulaceum*) was resistant.

Among NFGNB strains submitted to susceptibility testing, 27 (84.4%) were susceptible to all drugs tested. However, 02 (6.2%) strains of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* showed intermediate susceptibility to minocycline, and 03 (9.4%) strains of *Pseudomonas aeruginosa* were resistant to aztreonam.

**Table 2** Origin of microorganisms isolated from water and dialysate by collection date

Collection date	Pre-treatment water	Post-treatment water	Dialysate
25/11/08			<i>P. putida</i> (3) <i>P. aeruginosa</i> (1)
09/12/08			<i>M. fortuitum</i> 1 (2) <i>P. putida</i> (1) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>P. fluorescens</i> (1)
04/03/09			<i>S. maltophilia</i> (1)
10/03/09		<i>B. gladioli</i>	<i>P. aeruginosa</i> (1)
19/03/09	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>P. aeruginosa</i> (1)
25/03/09	<i>A. xylosoxidans</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i> (2)
31/03/09		<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>S. maltophilia</i> (1)
15/04/09	<i>M. gordonae</i> 3 <i>P. fluorescens</i>		<i>P. aeruginosa</i> (1) <i>S. maltophilia</i> (1)
29/04/09	<i>M. scrofulaceum</i>		<i>M. scrofulaceum</i> (3)
06/05/09	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. maltophilia</i> (1)
22/05/09	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> (2) <i>S. maltophilia</i> (1)
28/05/09		<i>S. maltophilia</i>	<i>P. putida</i> (1) <i>B. cepacia</i> (1)
02/06/09		<i>M. gordonae</i> 3 Unidentified	<i>M. gordonae</i> 3 (2) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>B. gladioli</i> (1)
09/06/09		<i>B. pseudomalei</i>	<i>P. fluorescens</i> (2) <i>P. aeruginosa</i> (1)
23/06/09		<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i> (5)
02/07/09		<i>M. gordonae</i> 3 <i>B. gladioli</i>	<i>M. gordonae</i> 3 (2) <i>P. aeruginosa</i> (1) <i>P. fluorescens</i> (1)
08/07/09		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> (1) <i>P. fluorescens</i> (1) <i>P. putida</i> (1)

Concerning the NFGNB ability of adhesion to polystyrene, 4 strains (7.7%) showed strong adhesion, 16 strains (30.8%) showed moderate adhesion (Table 3) and 32 strains (61.5%) were weakly adherent.

**Table 3** NFGNB adhesion to polystyrene

<b>Species</b>	<b>Strong Adhesion</b>	<b>Moderate Adhesion</b>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	2
<i>Pseudomonas putida</i>	0	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	2
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	0	1
<i>Burkholderia gladioli</i>	0	1

## DISCUSSION

Hemodialysis is an important treatment for chronic renal failure patients, by increasing the quality of life while waiting for a kidney transplant. However, these patients are exposed to large amounts of water, increasing the probability of infection, which makes monitoring the quality of water used in hemodialysis essential to avoid the risk of infection to these patients (7).

Studies have shown that gram-negative bacteria and nontuberculous mycobacteria (NTM) are the most frequently microorganisms encountered as contaminants in water and dialysate used in the dialysis procedure (6, 11). In agreement with these studies, among bacteria isolated in this study, 52.3% belong to the genus *Pseudomonas* spp., 20% *Mycobacterium* spp., and 15.4% *Stenotrophomonas maltophilia*; other genres were also isolated, but in smaller quantities. Borges *et al.* (4), also isolated gram-negative bacteria, wherein 32.5% *Pseudomonas* spp., 25% *B. cepacia* and 17.5% *Acinetobacter* spp. Among the bacteria isolated from water used in hemodialysis in three hospitals, 90% were gram-negative bacteria, predominantly *Pseudomonas* spp (13).

*P. aeruginosa* is a major etiological agent of hospital infections, and may have natural or acquired resistance to many antibiotics used in clinical practice, or acquire

resistance determinants from other gram-negative bacilli during treatment with antibiotic. The expression of multiple antimicrobial resistance of this species associated with a difficulty to eradicate the disease, result in high morbidity and mortality levels (18).

The NTM are currently recognized as significant pathogens in lung infection, skin lesions and disseminated disease, especially in immunosuppressed individuals (23). The NTM have been isolated from dialysis fluids, increasing evidence that water is a vehicle by which mycobacteria infects the individuals (11, 17). In this study, 20% of isolates were mycobacteria, in which *M. gordonae* and *M. scrofulaceum* were the species most commonly found. Montanari *et al.* (17) isolated 128 bacterial strains from the water distribution system of a dialysis center, in which 7.1% were mycobacteria predominating the species *M. gastri* 1 and *M. kansasii* 3.

Among the outbreak reports of gram-negative bacteria infections in hemodialysis centers, inadequate disinfection of water treatment and distribution systems is mentioned as a possible cause of these outbreaks (1, 16). The hemodialysis center in which this study took place has a daily routine of disinfection throughout the water distribution system by using ozone for a period of approximately 30 min, in order to prevent the proliferation of bacteria and biofilm formation. Hemodialysis machines were disinfected with 0.2% peracetic acid for about 15 min and the dialyzers reprocessed using the same disinfectant for a minimum of 8 hours. Our results showed good bactericidal activity of sodium hypochlorite and peracetic acid for the NFGNB, since only one strain was resistant to 0.2% peracetic acid after 15 min of exposure. As for mycobacteria, 20% were resistant to peracetic acid within 30 min of exposure. According to Santos *et al.* (22) ozone usage for disinfection of hydraulic systems and dialysis machines is more effective than the use of peracetic

acid, greatly reducing bacterial growth in the dialysis solution. However, even in the clinic where this research took place, which uses ozone to disinfect its water distribution system, were also isolated several microorganisms. One possible explanation is that, although most of the disinfectants used to disinfect dialysis machines and the water treatment system has proven effective in eliminating bacteria, few of them were evaluated in biofilms (8).

Bacteria resistant to disinfection process used in hemodialysis center may adhere to the piping, tanks and faucets and form biofilms, that once formed, are extremely difficult to eradicate by chemical or mechanical processes. Based on results of the adhesion test in polystyrene plates, 8% of NFGNB isolates showed the ability to adhere strongly, and 32.6% adhered moderately, demonstrating the willingness of these strains to form biofilm. Several bacteria are described in literature as capable to form biofilms, such as *Pseudomonas*, *Burkholderia* and mycobacteria (8, 17). Biofilm formation by rapidly and slowly growing mycobacteria is reported over decades, both in environment and in medical instruments (24, 25, 38). According to the study presented by Smeets *et al.*(26) neither disinfection procedures by heat nor by chemicals were capable of eradicating biofilm formed by the contamination of a dialysis monitor with *P.aeruginosa*.

The relevance of biofilm formation is in its higher resistance to the disinfection process and the constant presence of microorganisms, releasing cellular components such as endotoxins, which makes biofilm responsible for contamination of dialysis water (5, 32). This constant contamination of the water distribution system has been related to the chronic inflammatory state present in many patients on dialysis (21).

Due to dialysis machines susceptibility to microbial contamination and biofilm formation, Oie *et al.* (20) suggested measures such as placing an ultrafiltration

membrane in the circuit before the dialysate entrance in the dialyzer, to prevent the ingress of microorganisms and contamination of dialysis solution.

Hemodialysis patients are more susceptible to infections due to their compromised immunity and, in addition, the microorganisms responsible for infection related to dialysis are becoming increasingly resistant to antimicrobials (14). In the study designed by Arvanitidou *et al.* (1), 35% of isolates were resistant to three or more antimicrobial agents, as well as the strains isolated by Borges *et al.* (4) showed resistance to many antibiotics. Unlike the results obtained by the authors mentioned above, in our study, 84.4% of NFGNB were sensitive to all drugs tested. These data demonstrate the variation in susceptibility of strains in different clinics, reinforcing the importance of susceptibility testing in cases of infection.

Finally, this study demonstrates that water and dialysate are sources of infection by various species of NFGNB and also by mycobacteria. Consequently, to maintain the quality of renal replacement therapy offered to patients with chronic renal failure, it is important to select a suitable water treatment system, as well as ensure effective disinfection of dialysis machines and dialyzers, certified by rigorous microbiological monitoring of water and dialysate. For a better microbiological monitoring it is required to revise the microbiological standards in order to adopt appropriated parameters that are able to detect the presence of NFGNB and micobactéria, not just count heterotrophic bacteria and total coliforms.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the National Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

## REFERENCES

1. Arvanitidou, M.; Vayona, A.; Spanakis, N.; Tsakris, A. (2003). 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.*, 95 (1): 180-185.
2. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J. C. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45 (4): 493-496.
3. Becker, M.L., Suchak, A.A., Wolfe, J.N., Zarychanski, R., Kabani, A., Nicolle, L.E. (2003) *Mycobacterium neoaurum* bacteremia in a hemodialysis patient. *Can. J. Infect. Dis.*, 14(1): 45-48.
4. Borges, C.R.M., Lascowski, K.M.S., Filho, N.R., Pelayo, J.S. (2007) Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *J. Appl. Microbiol.*, 103(5): 1791-1797.
5. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9): 1017-1032.
6. Bugno, A., Almodovar, A. A. B., Pereira, T. C., Auricchio, M. T. (2007) Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(2): 172-175.
7. Buzzo, M.L., Bugno, A., Almodovar, A.A.B, Kira, C.S., Carvalho, M.F.H., Souza, A., Scorsafava, M.A. (2010) A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 69(1): 1-6.
8. Capelli, G., Riccardi, M., Perrone, S., Bondi, M., Ligabue, G., Albertazzi, A. (2006) Water treatment and monitor disinfection. *Hemodial. Int.*, 10(1): S13-S18.

9. Carrara, C.L., Gomes, R.T., Guerra, L.L., Esteves, A.P. (2009) Qualidade Microbiológica dos Fluídos Hemodialíticos: Perspectivas para um Serviço de Diálise Seguro e Eficiente. *Prat. Hosp.*, 66: 51-53.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (2009) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
11. Gomila, M., Gascó, J., Busquets, A., Gil, J., Bernabeu, R., Buades, J. M., Lalucat, J. (2005) Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 52(1): 101-114.
12. Hoenick N.A, Ronco C, Levin R. (2006) The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif.*, 24(1): 11-18.
13. Lima, J.R.O., Marques, S.G., Gonçalves, A.G., Filho, N.S., Nunes, P.C., Silva, H.S., Monteiro, S.G., Costa, J.M.L. (2005) Microbiological Analyses of Water from Hemodialysis Services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 36(2): 103-108.
14. Leone, S. e Suter, F. (2010) Severe bacterial infections in haemodialysis patients. *Infez. Med.*, 18(2): 79-85.
15. Litsky, B.Y., Litsky, W. (1968) Investigations on decontamination of hospital surfaces by use of disinfectant detergents. *Am J Public Health Nations Health*, 58(3): 534-543.
16. Magalhães, M., Doherty, C., Govan, J.R.W., Vandamme, P. (2003) Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *J. Hosp. Infect.*, 54(2): 120-123.
17. Montanari, L.B.; Sartori, F.G., Cardoso, M.G.O., Varo, S.D., Pires, R.H., Leite, C.Q.F., Prince, K., Martins, C.H.G. (2009) Microbiological Contamination of a

- Hemodialysis Center Water Distribution System. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 51(1): 37-43.
18. Neves, P.R., Mamizuka, E.M., Levy, C.E., Lincopan, N. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Print)*, 47: 409-420.
19. Nystrand, R. (2008) Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis. *J. Chin. Med. Assoc.*, 71(5): 223-229.
20. Oie, S., Kamiya, A., Yoneda, I. (2003) Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J. Hosp. Infect.*, 54(2): 115-119.
21. Pachaly, M. A., Nascimento, M. M., Suliman, M. E, Hayashi, S. Y., Riella, M. C., Manfro, R. C., Stenvinkel, P., Lindholm, B. (2008) Interleukin-6 Is a Better Predictor of Mortality as Compared to C-Reactive Protein, Homocysteine, Pentosidine and Advanced Oxidation Protein Products in Hemodialysis Patients. *Blood Purif.*, 26(2): 204-210.
22. Santos, F., Biernat, J.C., Santos, A.M.G., Souza, M.E.L.S., Raubach, A.A.S., Demin, M.S.S. (2006) Disinfection of Hemodialysis Machines With Ozone. *J. Bras. Nefrol.*, 29(1): 14-18.
23. Satyanarayana, G., Heysell, S.K., Scully, K.W., Houpt, E.R. (2011) Mycobacterial infections in a large Virginia hospital, 2001-2009. *BMC Infect. Dis.*, 11: 113.
24. Schulze-Röbbecke, R., Janning, B., Fischeder, R. (1992) Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber. Lung Dis.*, 73: 141-144.
25. September, S.M., Brözel, V.S., Venter, S.N. (2004) Diversity of Nontuberculoïd *Mycobacterium* Species in Biofilms of Urban and Semiurban Drinking Water Distribution Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12): 7571-7573.

26. Smeets, E., Kooman, J., Van Der Sande, F., Stobberingh, E., Frederik, P., Claessens, P., Grave, W., Schot, A., Leunissen, K. (2003) Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney Int.*, 63: 1574-1576.
27. Steadham, J.E. (1980) High-catalase strains of *Mycobacterium kansasii* isolated from water in Texas. *J. Clin. Microbiol.*, 11(5): 496-498.
28. Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, 40(2): 175-179.
29. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2008. Censo de Diálise SBN 2008. Available at: <http://www.nefrologiaonline.com.br/Censo/2008/censoSBN2008.pdf>. Accessed 26 June 2009.
30. Sociedade Brasileira De Nefrologia. 2011. Censo de Diálise SBN 2011. Available at: <http://www.sbn.org.br/pdf/censo2011>. Accessed 26 June 2009.
31. Szuster, D. A. C., Caiaffa, W. T., Andrade, E. I. G., Acurcio, F. A., Cherchiglia, M. L. (2012) Sobrevida de pacientes em diálise no SUS no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, 28(3): 415-424.
32. Tapia, G., Yee, J. (2006) Biofilm: its relevance in kidney disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 13(3): 215-224.
33. Telenti, A. (1993) Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 31(2): 175-178.
34. Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. (1982<sub>a</sub>) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano-desaminase. *Revista de Microbiologia*, 13: 309-315.

35. Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. (1982<sub>b</sub>) MILi: um meio para realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Revista de Microbiologia*, 13: 230-235.
36. Van Ingen, J., Boeree, M.J., Dekhuijzen, P.N.R, Van Soolingen, D. (2010) Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15: 888-893.
37. Vizcaino-Alcaide, M.J., Herruzo-Cabrera, R., Fernandez-Acenero, M.J. (2003) Comparison of the disinfectant efficacy of Perasafe and 2% glutaraldehyde in in vitro tests. *J. Hosp. Infect.*, 53(2) 124-128.
38. Williams, M.M., Yakrus, M.A., Arduino, M.J., Cooksey, R.C., Crane, C.B., Banerjee, S.N., Hilborn, E.D., Donlan, R.M. (2009) Structural Analysis of Biofilm Formation by Rapidly and Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(7): 2091-2098.
39. Winn, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.W.; Schrenckenberger, P.C.; Woods, G.L. (2008) Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. *In: Bacilos Gram-Negativos Não-fermentadores*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

## CONCLUSÕES

1. Dentre as 134 amostras analisadas foram isoladas 65 cepas bacterianas, pertencendo a maioria aos gêneros *Pseudomonas* (52,3%), *Mycobacterium* (20%) e *Stenotrophomonas* (15,4%).
2. Foram identificados 52 bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNF), sendo 5/17 de água pré-tratamento, 11/17 de água pós-tratamento e 36/100 de dialisato.
3. Isolou-se 13 cepas de micobactérias, 2/17 de água pré-tratamento, 2/17 de água pós-tratamento e 9/100 de dialisato, sendo *M. gordonae* a espécie predominante (53,8%).
4. Três cepas de *M. scrofulaceum* (23,1%) foram resistentes ao ácido peracético a 0,2%, por 30 minutos e, uma cepa de *Burkholderia pseudomallei* em 15 minutos.
5. Apenas uma cepa de *M. scrofulaceum* (7,7%) foi resistente ao hipoclorito de sódio a 500 ppm por 30 minutos, sendo todos os BGNF sensíveis.
6. Nos testes de adesão ao poliestireno, 20/52 cepas de BGNF mostraram adesão forte ou moderada.
7. Das cepas de BGNF submetidas ao teste de susceptibilidade, 27 (84,4%) foram sensíveis a todas as drogas testadas.
8. Dentre as micobactérias 12 (92,3%) apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas.
9. A água e dialisato constituem fonte de infecção, portanto o tratamento adequado da água, desinfecção eficaz das máquinas de hemodiálise e dialisadores, e o monitoramento microbiológico do dialisato são importantes para a redução de infecções bacterianas, melhorando a qualidade da terapia renal substitutiva oferecida aos pacientes.