



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

CINTIA REGINA MEZZOMO BORGES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E
DIALISATOS EM UMA UNIDADE DE
HEMODIÁLISE EM PONTA GROSSA-PR**

LONDRINA-PARANÁ
2004

CINTIA REGINA MEZZOMO BORGES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA E
DIALISATOS EM UMA UNIDADE DE
HEMODIÁLISE EM PONTA GROSSA-PR**

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^ª. Dr^ª. Jacinta Sanchez Pelayo

Londrina-Paraná
2004

**“ A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original!”**

Albert Einstein

Aos meus pais, Clóvis e Sissi, com as mãos dadas me encaminharam na direção do conhecimento, abrindo as portas do meu futuro!

Ao meu marido Celso, pelo amor, confiança, compreensão e cumplicidade para trilhar novos caminhos, em busca de um ideal!

A todos os meus familiares, em especial: Claudia, Sílvio, Cassiana, Marcos e Ananda, obrigado pelo amor, carinho e dedicação constantes!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Jacinta Sanchez Pelayo, serei eternamente grata, pois quem ama o que faz, desperta em nós a mesma paixão de buscar na vida o conhecimento!

Aos Professores do Programa de Mestrado em Microbiologia, meus sinceros agradecimentos, aqueles que sabem que ensinar não se limita a apenas transmitir informações!

Aos amigos, por diversas vezes, chegamos a nos sentir derrotados, porém, a palavra amiga, a mão estendida, faz sentir o quão importante é ter um amigo!

Muito obrigada a todos os meus amigos: da turma de Mestrado; da Clínica de Hemodiálise-Nefromed, em especial ao Dr. Nelson Rodrigues Filho e a Enfermeira Dolores Márcia Mazzutti; do Laboratório de Análises Clínicas-Clinipon, ao Dr. Paulo Vanat pelo apoio e incentivo; ao Fábio Edenei Mainginski, pelo auxílio prestado.

A todos os funcionários: do Centro de Ciências Biológicas, da Nefromed, do Clinipon, que dia-a-dia, na humildade do anonimato são responsáveis pelas coisas bem feitas.

Ao Mário Júlio Kauffman, da Cape Cod, pelo material de apoio.

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

BORGES, Cintia R. Mezzomo. **Qualidade microbiológica da água e dialisatos em uma unidade de hemodiálise em Ponta Grossa-PR.** 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina

RESUMO

Objetivo: avaliar a qualidade bacteriológica de amostras de água e dialisatos em uma Unidade de Hemodiálise. **Metodologia e Resultados:** 72 amostras de água e 72 de dialisatos foram coletadas no período de novembro de 2003 a abril de 2004. Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: pesquisa de coliformes totais e fecais, a qual resultou negativa para todas as amostras; contagem total de bactérias heterotróficas, onde três amostras de água e duas de dialisatos apresentaram contagens superiores aos limites permitidos pela legislação; pesquisa de endotoxina que revelou quantidades elevadas somente nas amostras de água que antecederam a Osmose Reversa. Foram identificadas bactérias Gram-negativas não fermentadoras em 54 amostras de dialisatos e em 26 de água sendo que a maioria dos microrganismos pertencia aos gêneros: *Pseudomonas* (32,5%), *Burkholderia* (25%) e *Acinetobacter* (17,5%). Teste de adesão à superfície inerte, mostrou que várias bactérias são capazes de formar biofilme. Algumas bactérias apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio na concentração de 500 ppm, por 10 minutos (27%) e a três ou mais antimicrobianos (60%). **Conclusões:** os resultados sugerem que a água e dialisatos podem ser uma fonte de infecção para pacientes que necessitam de hemodiálise. **Significância e Impacto do Estudo:** um adequado sistema de tratamento de água, desinfecção do sistema de hemodiálise e monitoramento microbiológico da água e dialisatos são necessários para a redução de surtos de bacteremia e pirogenia, melhorando a qualidade do serviço de hemodiálise e protegendo a saúde dos pacientes.

Palavras-chaves: Água. Dialisato. Hemodiálise. Bactérias Gram-negativas. Endotoxina. Antimicrobiano.

BORGES, Cintia R. Mezzomo. **Microbiological quality of water and dialysate in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil.** 2004. Dissertation (Master of Microbiology) – State of University of Londrina.

ABSTRACT

Aims: The objective of the study was to determine the bacteriological quality of samples of water and dialysate in a hemodialysis unit. **Methods and Results:** Seventy-two samples of water and 72 of dialysate were collected in the period of November, 2003 to April, 2004. The following microbiological analyses were performed: test for total and fecal coliforms, which produced negative results for all the samples; counts of total heterotrophic bacteria, where three samples of water and two of dialysate showed levels higher than those permitted by national standards; and endotoxin assay which revealed high quantities only in samples of water that preceded reverse osmosis. Non-fermenting Gram-negative bacteria were identified in 54 samples of dialysate and in 26 of water, in which the majority of the microorganisms belonged to the genera *Pseudomonas* (32.5%), *Burkholderia* (25%) and *Acinetobacter* (17.5%). The test for adhesion to an inert surface showed that various bacteria were capable of forming biofilms. Some bacteria were resistant to sodium hypochlorite at a concentration of 500 ppm for 10 min (27%) and to three or more antibiotics (60%). **Conclusions:** Water and dialysate can be a source of infection for patients who need hemodialysis. **Significance and Impact of Study:** An adequate system for water treatment, disinfection of the hemodialysis system and microbiological monitoring of the water and dialysate are necessary to reduce bacteremia and pyrogenia outbreaks, to improve the quality of the hemodialysis service and to protect the health of patients.

Keywords: Water. Dialysate. Hemodialysis. Gram-negative bacteria. Endotoxin. Antibiotic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERÊNCIAS	19
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4 ARTIGO: MICROBIOLOGICAL QUALITY OF WATER AND DIALYSATE IN A HEMODIALYSIS UNIT IN PONTA GROSSA – PR, BRAZIL	24
CONCLUSÕES	43

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 em um processo, onde o sangue do paciente com Insuficiência Renal passa por dentro de um filtro especial – o dialisador – durante uma sessão de circulação extracorpórea, oferecendo uma modificação da composição de solutos do plasma e a possibilidade de uma remoção mais rápida do excesso de água corporal.

O número de pacientes com Insuficiência Renal em tratamento por Hemodiálise tem aumentado durante os últimos 30 anos (ARVANITIDOU et al., 2003).

O paciente com Insuficiência Renal grave, em geral, tem baixa diurese, retém excesso de líquido (sal e água) e ao não excretar as várias toxinas, chamadas de urêmicas, tem sua vida em risco devido ao acúmulo destas substâncias no sangue.

A Hemodiálise é um tratamento complexo que envolve uma variedade de problemas clínicos, decorrentes de diversos fatores, alguns inerentes aos pacientes, tais como: diabetes, hipertensão, lupus eritematoso, glomerulonefrite, pielonefrite e outros problemas considerados complicações técnicas como o uso repetido das máquinas e equipamentos, reprocessamento dos dialisadores e manutenção do sistema de tratamento da água.

Os pacientes submetidos ao tratamento dialítico apresentam maiores riscos de adquirir septicemia que qualquer outra população estudada (ABBOTT & AGODOA, 2001). A necessidade de se criar um acesso vascular (fístula artério-venosa) para repetidas punções por períodos prolongados, favorece tais riscos (ABDULRAHMAN et al., 2002).

Surtos de bacteremias entre estes pacientes geralmente implica a presença de uma fonte ambiental comum (KAITWATCHARACHAI et al., 2000). O ambiente onde muitos pacientes recebem o tratamento dialítico apresenta oportunidades para a transmissão de agentes infecciosos, seja direta, pessoa a pessoa, ou indiretamente através de aparelhos, equipamentos ou superfícies contaminadas. Além disso, o paciente renal crônico tem um sistema imune comprometido o que o torna suscetível a um grande número de doenças infecciosas (ARVANITIDOU et al., 2003).

Os pacientes urêmicos, em tratamento por Hemodiálise, são expostos de forma não seletiva a volumes de água que variam entre 18.000 a 36.000 litros por ano (SILVA et al., 1996), através da membrana semipermeável do dialisator, desta forma, todas as substâncias de baixo peso molecular presentes na água tem acesso direto a corrente sanguínea do paciente.

A água é um elemento essencial à vida e um importante componente na terapia dialítica, onde é utilizado na preparação do dialisato e no reprocessamento dos dialisatores (HOENICH & LEVIN, 2003).

A água constitui-se na principal matéria-prima da Hemodiálise, sendo a sua qualidade e pureza essenciais para o bem estar dos pacientes. Portanto, se a água não for corretamente tratada, vários contaminantes químicos, bacteriológicos e tóxicos, poderão ser transferidos para os pacientes, levando ao aparecimento de efeitos indesejáveis (SILVA et al., 1996).

Os surtos de infecções sistêmicas em unidades de Hemodiálise são geralmente causados pela contaminação da água, seja durante o seu tratamento, a sua distribuição, ou ainda por erros no reprocessamento dos dialisatores (KAITWATCHARACHAI et al., 2000).

A Hemodiálise é um tratamento que ao longo dos anos vem se desenvolvendo, sendo um alvo de constante aprimoramento científico e tecnológico a fim de aumentar a sobrevida dos pacientes com comprometimento renal (SILVA et al., 1996).

Estudos foram sendo realizados com o intuito de se obter mais informações sobre as complicações da utilização da água para Hemodiálise sem um tratamento específico e padronizado. O incidente ocorrido no Instituto de Doenças Renais (IDR) em Caruaru, Pernambuco, durante o mês de fevereiro de 1996, transformou a história e a prática clínica da Hemodiálise. O IDR mantinha 131 pacientes em tratamento dialítico, destes, 100 pacientes desenvolveram falência hepática aguda e 52 pacientes foram à 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 IDR, no dialisator, 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).

No Brasil, a Portaria vigente é a número 82, de 3 de janeiro de 2000 do Ministério da Saúde e conforme esta, a água utilizada na preparação da solução para diálise, deve ter a sua qualidade garantida em todas as etapas do seu tratamento, mediante o monitoramento dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos.

Conforme a Portaria 82/2000, a água utilizada para hemodiálise pode apresentar uma contagem total de heterotróficos de até 200 UFC/mL; enquanto o dialisato apresenta um limite maior, sendo até 2000 UFC/mL.

Cada Unidade de Diálise é responsável pelo tratamento da água fornecida pela rede pública, e também pela desinfecção do sistema de tratamento da água.

O tratamento consiste no uso de: filtro de areia (para a remoção das partículas em suspensão), abrandador (para controle da dureza da água – cálcio e magnésio) e filtro de carvão (para adsorver cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas). Este procedimento protege o equipamento de Osmose Reversa, usado em seguida, para a obtenção de uma água com características físico-químicas e microbiológicas compatíveis com os padrões exigidos pela Portaria 82/2000 (BECK-SAGUE et al., 1990; SILVA et al., 1996; SIDNEY et al., 1999; ANDERSON et al., 2002).

A maioria dos centros de diálise usam a Osmose Reversa para remover substâncias químicas e microbiológicas e efetivamente reduzir níveis de bactérias e endotoxinas (COOPER, 2001; SMEETS et al., 2003).

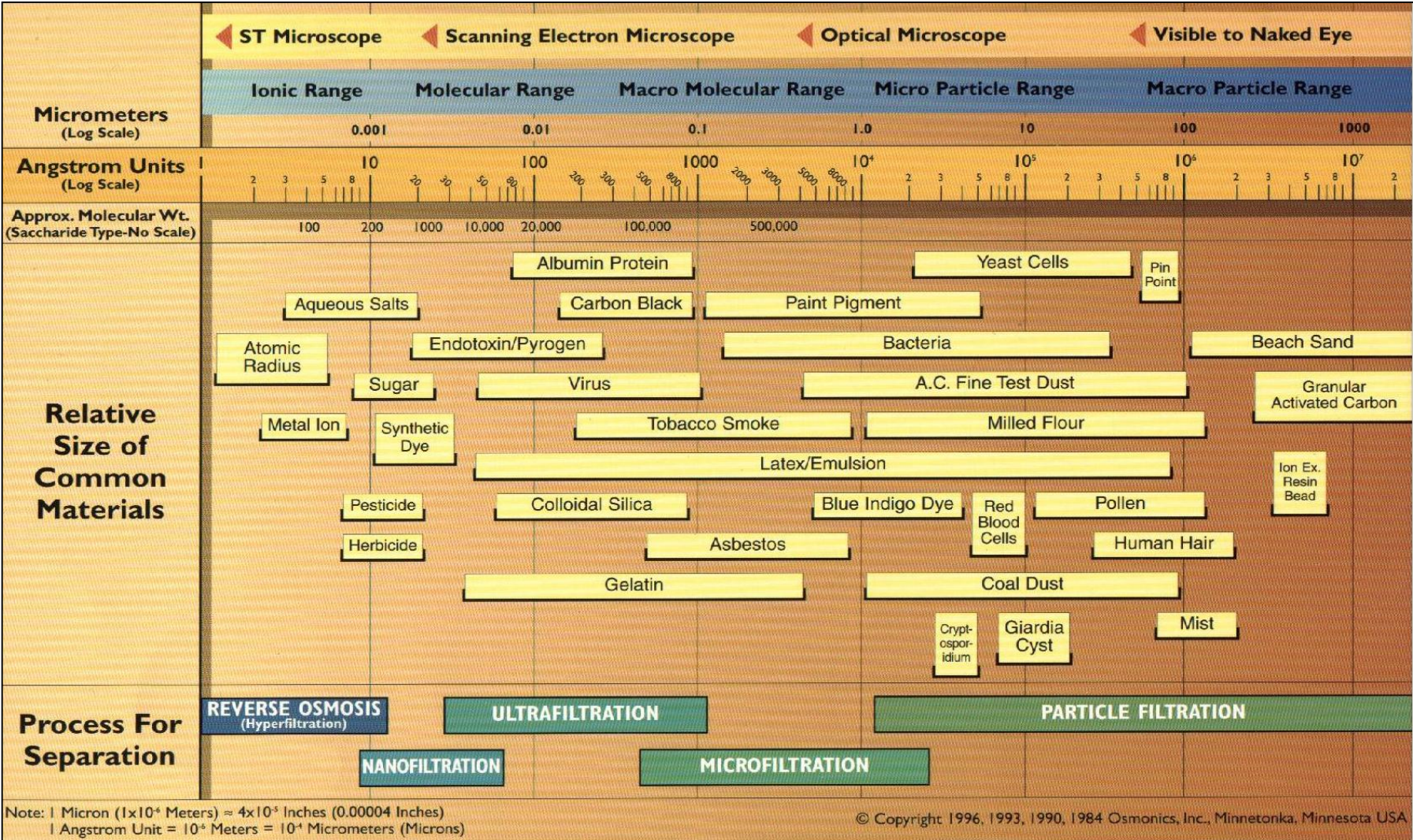
A presença de endotoxina é avaliada em EU/mL (Unidades de Endotoxina por mililitro); uma outra medida padronizada é ng/ml, determinando a massa de LPS; em termos de equivalência, 1ng/ml correspondem a 5EU/ml, sendo este o limite máximo permitido em água para uso em Hemodiálise (PORTARIA 82/2000).

A água potável se constitui em uma fonte de endotoxinas que são inofensivas quando ingeridas, mas não quando entram em contato direto com a corrente circulatória (BOHRER et al., 2001).

As endotoxinas podem ser encontradas na água fornecida pela rede pública em um nível entre 10 a 50EU/mL. Possui uma estrutura estável, difícil de ser destruída pela ação de agentes sanitizantes; passam através dos filtros de membranas esterilizantes. Somente a ultrafiltração por Osmose Reversa remove consistentemente a endotoxina (COOPER, 2001).

A Osmose Reversa (Figura 1) retém entre 95 a 99% dos contaminantes químicos, praticamente todas as bactérias, fungos, algas e vírus, além de reter pirogênios e materiais protéicos de alto peso molecular (SILVA et al., 1996).

Figura 1. Membrana de Osmose Reversa



Fonte: OSMONICS, INC. – CORPORATE HEADQUARTERS

É crucial que a unidade de Osmose Reversa esteja funcionando corretamente, que a integridade da membrana seja mantida, e que seja periodicamente desinfetada (ANDERSON et al., 2002).

Sendo assim, a qualidade desta água estará comprometida se houver algum problema como: rotura da membrana da Osmose Reversa, deterioração progressiva ou colonização bacteriana (SILVA et al., 1996).

A esta água tratada, eletrólitos e outros compostos são então adicionados para preparar uma solução com composição química semelhante ao plasma sanguínea, chamada dialisato, desta forma subprodutos metabólicos tais como uréia e creatinina são removidos da corrente sanguínea do paciente por mecanismos de gradiente, difusão e ultrafiltração, através da membrana de diálise semipermeável do dialisator (ANDERSON et al., 2002).

Devido ao fato do sangue do paciente e o dialisato serem separados apenas por uma membrana semipermeável, a qualidade microbiológica da água de diálise e dialisato são extremamente importantes. Os microrganismos, devido ao seu tamanho, dificilmente atravessam a membrana semipermeável do dialisator; no entanto, a endotoxina (que possui peso molecular menor) liberada das bactérias Gram-negativas em crescimento, pode atravessar esta barreira (SILVA et al., 1996; ARVANITIDOU et al., 1999).

Assim, sistemas de tratamento de água inadequada e métodos de desinfecção ineficientes são os responsáveis pelos surtos de bacteremias e reações pirogênicas nos pacientes de Hemodiálise . Devido a ubiquidade natural de certas bactérias Gram-negativas em água utilizada para Hemodiálise e a possibilidade destes microrganismos se multiplicarem durante o tratamento dialítico, níveis mínimos de contaminação devem ser considerados (DOERN et al., 1982; PISANI et al., 2000).

Entre as bactérias Gram-negativas encontradas em sistemas de purificação de água incluem-se os gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* e *Alcaligenes*. Todas as partes do sistema de água podem contaminar-se com microrganismos, que podem formar biofilmes. Estes são descritos como uma coleção de bactérias presas em uma matrix gelatinosa constituída em grande parte de substâncias extracelulares secretadas pelas bactérias. Em essência, esta matrix gelatinosa gera um campo de força tridimensional que envolve, ancora e proporciona maior proteção aos microrganismos Os biofilmes aderem firmemente às superfícies sendo difícil de erradicar, uma vez estabelecidos (COOPER, 2001; DUNNE JR, 2002).

A remoção do cloro e também a presença de áreas com baixa circulação de água na rede de distribuição, tais como tanques e torneiras, deixam o sistema suscetível ao crescimento de biofilme (ARVANITIDOU et al., 1998; ZUNINO et al., 2002; HOENICH & LEVIN, 2003).

Na Hemodiálise, os sítios favoráveis para a formação de biofilme incluem : sistema de tratamento de água, rede de distribuição e o circuito hidráulico do monitor de diálise, devido a contaminação de bactérias provenientes da água, a presença de nutrientes orgânicos e o alto pH da solução tamponada de bicarbonato. Em adição, fatores físicos, tais como final de linhas, baixos fluxos e períodos sem fluxo, podem favorecer a formação de biofilmes (CAPPELLI et al., 2003).

Estruturas para o tratamento e distribuição de água impropriamente projetadas e monitoramento microbiológico deficiente favorecem o crescimento de biofilmes em vários pontos das canalizações e também nas máquinas de Hemodiálise (WEBER et al., 2004).

Estudo realizado por Rioufol et al. (1999) mostrou que nem o uso de desinfetantes químicos ou agentes físicos como o calor foram capazes de erradicar o biofilme, formado pela contaminação do monitor de diálise com *Pseudomonas aeruginosa*.

Os microrganismos em presença de materiais orgânicos na água e em dialisatos, induzem a formação de biofilme na tubulação das máquinas de diálise. Um estudo relata a detecção de biofilmes a partir de amostras de tubulações dentro das máquinas de diálise por onde passam água e dialisato; estas continham entre 1.000 a 1.000.000 bactérias viáveis e níveis de endotoxina de 1 a 12EU/cm² de tubulação. Os resultados deste estudo indicam que a formação de biofilme nas tubulações e nos filtros de linhas de diálise são comuns e servem como reservatório para uma contínua contaminação bacteriana (DASGUPTA, 2002).

A presença de biofilme é de grande preocupação devido a persistência bacteriana em diferentes pontos do sistema de Hemodiálise, a liberação contínua de componentes bacterianos e maior resistência durante os procedimentos de desinfecção (SILVA et al., 1996; DONLAN & COSTERTON, 2002; ZUNINO et al., 2002; SMEETS et al., 2003).

A eficiência na desinfecção é importante para a redução na contagem total de microrganismos. Se a sanitização é ausente ou inadequada, bactérias Gram-negativas e endotoxinas alcançarão níveis perigosos. A fim de manter baixas as concentrações de

endotoxinas, deve-se aplicar sanitizações periódicas para prevenir ou limitar a proliferação de biofilme dentro do sistema de água (COOPER, 2001; SCHWARTZ et al., 2003).

As bactérias que se desenvolvem em biofilmes, quando comparadas as bactérias plantônicas (fora do biofilme), são frequentemente mais resistentes a agentes de desinfecção contendo o cloro como princípio ativo (SCHWARTZ et al., 2003).

Uma variedade de microrganismos podem estar presentes nestes biofilmes, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos, os quais liberam compostos como as endotoxinas, e outros polissacarídeos estruturais na água (DASGUPTA, 2002; HOENICH & LEVIN, 2003).

A desinfecção inadequada do sistema de distribuição da água tem sido implicada como uma possível fonte para os surtos de infecções bacterianas relatados na Hemodiálise. 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; SANTOS 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). Septicemia em pacientes imunocomprometidos causada por *B. 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 da *Aeromonas hydrophila*, amplamente distribuída em ambientes aquáticos, podendo estar associada com uma variedade de manifestações clínicas em pacientes tratados por Hemodiálise. Trabalhos comprovam casos de bacteremia por *A. hydrophila* em pacientes renais crônicos e submetidos à Hemodiálise; isto se deve a contaminação de fluidos de diálise, contaminação de fluidos antissépticos podendo este microrganismo penetrar diretamente pela porta de entrada nas punções da fistula artério-venosa (LIN et al., 1996).

A ocorrência de septicemia entre os pacientes da Hemodiálise se agrava com o aumento da multi-resistência aos antimicrobianos e a capacidade de adquirir facilmente determinantes de resistência. Bactérias Gram-negativas multi-resistentes, incluindo as cepas *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter* spp. podem apresentar resistência aos antimicrobianos disponíveis (TOKARS, 2000; ARVANITIDOU et al., 2003).

A água utilizada para o reprocessamento dos dialisadores também pode ser fonte de contaminação. Em muitas investigações, complicações como bacteremia por Gram- negativos e reação pirogênica tem ocorrido em pacientes que reutilizam seus dialisadores (não ocorrendo em pacientes que utilizam dialisadores novos). As soluções germicidas usadas para o reprocessamento destes dialisadores são preparadas muitas vezes com água que apresenta altos níveis de endotoxinas e/ou bactérias (BECK-SAGUE et al., 1990; RUDNICK et al., 1995).

O procedimento de reutilização dos dialisadores, com o objetivo de reduzir a incidência da Síndrome do Primeiro Uso (hipersensibilidade ao óxido de etileno), caracteriza-se também como um problema de contaminação por bactérias e endotoxinas, pois as endotoxinas aderem as paredes internas das fibras capilares, não sendo removidas nem mesmo com o uso de substâncias bactericidas. Assim, a endotoxina que permaneceu aderida à membrana de diálise, pode ser liberada durante a próxima sessão, determinando os sintomas clínicos ao entrar na circulação sanguínea do paciente (SANTOS et al., 2000).

A endotoxina é a porção lipídica (Lipídeo A) do Lipopolissacarídeo (LPS); o Lipopolissacarídeo é um componente estrutural da membrana externa de bactérias Gram-negativas; é uma macromolécula composta por três regiões principais: lipídeo A, polissacarídeo central e antígeno O (ANDERSON et al., 2002).

A endotoxina é considerada um importante fator de virulência nas bactérias Gram-negativas. Elas são responsáveis por induzirem a “Síndrome do Choque Tóxico”, com ativação inespecífica do sistema imune e ativação da cascata do complemento (YOKOTA et al., 2000).

As endotoxinas são liberadas durante a multiplicação bacteriana ou lise celular e são relativamente termo-estáveis, sendo estáveis por uma hora à 121°C. Os sintomas da exposição a endotoxina em humanos são gerais e incluem febre, diarreia e vômito, hipotensão, coagulação intravascular, choque e morte. A febre é um sintoma extremamente comum, pois as endotoxinas estimulam as células do hospedeiro a liberar

proteínas conhecidas como pirogênios endógenos, os quais afetam a porção do hipotálamo responsável pela regulação da temperatura corporal. As endotoxinas são fracamente imunogênicas e não estimulam a resposta imune humoral suficiente para a produção de anticorpos neutralizantes (ANDERSON et al., 2002). Durante a septicemia por bactérias Gram-negativas, a endotoxina causa liberação excessiva de citocinas inflamatórias, levando à falência múltipla de órgãos e morte (DING & BOW HO, 2001).

A reação pirogênica (endotoxemia) é caracterizada por calafrios e febre, pode ser acompanhada por uma queda na pressão sanguínea e dificuldade respiratória; é mediada pelas citocinas, tal como a interleucina – 1. Um rápido aumento dos sintomas inicia em 1 a 3 horas após a exposição à endotoxina com o pico dos sintomas ocorrendo em 3 a 6 horas após. Efeitos da exposição a longo prazo são difíceis de definir (COOPER, 2001).

Existe uma boa correlação entre a concentração de endotoxina e bactérias no dialisato com a presença de sintomas típicos de reação pirogênica. Uma concentração bacteriana acima do valor limite estabelecido pela Portaria 82 (2000 UFC/ml), em geral, determina nível de endotoxina suficiente para gerar sintomas clínicos quando esta atravessa a membrana do dialisator que apresente mínimas rupturas (SANTOS et al., 2000).

De acordo com a AAMI (Association for the Advancement for Medical Instrumentation), a água e o dialisato devem ser monitorados para verificação de endotoxina bacteriana mensalmente. Um método confiável para a detecção de endotoxinas é de vital importância para os pacientes (BOHRER et al., 2001).

Limulus Amebocyte Lysate (LAL), é um teste amplamente utilizado para detecção de contaminação por endotoxina (COOPER, 2001) em muitos produtos farmacêuticos, industriais, implantes cirúrgicos, água para Hemodiálise e também alimentos, devido a sua grande sensibilidade (YOKOTA et al., 2000; DING & BOW HO, 2001).

O princípio biológico do teste do LAL decorre da coagulação do sangue observada em um caranguejo, denominado *Limulus polyphemus*, quando este entra em contato com bactérias Gram-negativas (SANTOS et al., 2000).

Sabe-se que, as células do caranguejo são extremamente sensíveis ao lipopolissacarídeo, e respondem pela degranulação de componentes após a estimulação mediada pelo LPS. Posteriormente descobriu-se que a reação é enzimática e que as

enzimas estão localizadas nos grânulos dos amebócitos do caranguejo. Quando a bactéria Gram-negativa invade a hemolinfa, as células detectam o LPS na sua superfície, e então liberam os conteúdos dos grânulos através de uma exocitose rápida. A liberação dos componentes granulares incluem dois biossensores de reação de coagulação, fator C e fator G. Estas serinas proteases são autocataliticamente ativadas pelo LPS e (1,3) B-D-glucana (IWANAGA & KAWABATA, 1998; SANTOS et al., 2000; DING & BOW HO, 2001). Estes últimos polímeros lineares de glicose são componentes estruturais da parede celular dos fungos e leveduras que podem interferir na reação do LAL (ANDERSON et al., 2002).

O teste do LAL se apresenta em três diferentes metodologias; um teste semi-quantitativo – Teste do Coágulo – onde a presença de endotoxina é observada pela formação de um sólido gel; e outros dois testes quantitativos – Cromogênico e Turbidimétrico – onde a cor ou turbidez desenvolvida pelo reagente é diretamente proporcional à presença de endotoxina na amostra (BOHRER et al., 2001; ANDERSON et al., 2002).

2 REFERÊNCIAS

ABBOTT, KC. and AGODOA, LY. Etiology of bacterial septicemia in chronic dialysis patients in the United States. **Clinical Nephrology** 56 (2001) 124 – 131.

ABDULRAHMAN, IS.; AL – MUEILO, SH.; BOKHARY, HA.; LADIPO, GOA.; AL – RUBAISH, A. A prospective study of hemodialysis access – related bacterial infections. **Journal of Infection and Chemotherapy** 8 (2002) 242 – 246.

ANDERSON, WB.; SLAWSON, RM.; MAYFIELD, CI. A review of drinking – water – associated endotoxin, including potential routes of human exposure. **Canadian Journal of Microbiology** 48 (2002) 567 – 587.

ANDERSON, WB.; MAYFIELD, CI.; DIXON, DG.; HUCK, PM. Endotoxin inactivation by selected drinking water treatment oxidants. **Water Research** 37 (2003) 4553 – 4560.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; KATSINAS, C.; PANGIDIS, P.; CONSTANTINIDIS, T.; KATSOYANNOPOULOS, V.; VAYONAS, G. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. **Nephrology Dialysis Transplantation** 13 (1998) 949 – 954.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; ASKLEPIDIS, N.; KANETIDIS, D.; PAZARLOGLOU, M.; KATSOYANNOPOULOS, V.; VAYONAS, G. Endotoxin concentration in treated water of all hemodialysis units in Greece and inquisition of influencing factors. **Journal of Nephrology** 12 (1999) 32 – 37.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram–negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology** 95 (2003) 180 – 185.

Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American national standard for hemodialysis systems. In: **AAMI Standards and Recommended Practices**. Volume 3: Dialysis. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; (1990) 27 – 58.

AZEVEDO, SMFO.; CARMICHAEL, WW.; JOCHIMSEN, EM.; RINEHART, KL.; LAU, S.; SHAW, GR.; EAGLESHAM, GK. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology** 181 – 182 (2002) 441 – 446.

BECK – SAGUE, CM.; JARVIS, WR.; BLAND, LA.; ARDUINO, MJ.; AGUERO, SM.; VEROSIC, G. Outbreak of Gram-negative bacteremia and pyrogenic reactions in a hemodialysis center. **American Journal of Nephrology** 10 (1990) 397 – 403.

BOHRER, D.; HÖRNER, R.; NASCIMENTO, PC.; ADAIME, M.; PEREIRA, ME.; MARTINS, AF.; HARTZ, SA. Interference in the limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 26 (2001) 811 – 818.

CAPPELLI, G.; SERENI, L.; SCIALOJA, MG.; MORSELLI, M.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A.; BELLESIA, M.; INGUAGGIATO, P.; ALBERTAZZI, A.; TETTA, C. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **Nephrology Dialysis Transplantation** 18 (2003) 2105 – 2111.

COOPER, JF. Bacterial growth and Pyrogenic reactions. **LAL Times** 8 (2001) 1 – 5.

DASGUPTA, MK. Biofilms and infection in dialysis patients. **Seminars in Dialysis** 15 (2002) 338 – 346.

DING, JL and BOW HO. A new era in pyrogen testing. **Trends in Biotechnology** 19 (2001) 277 – 281.

DOERN, GV.; BROGDEN, BE.; DiFEDERICO, JD.; EARLS, JE.; QUINN, ML. Quantitative microbiological monitoring of hemodialysis fluids: evaluation of methods and demonstration of lack of test relevance in single-pass hemodialysis machines with automatic dialysate proportioning with reverse osmosis – treated tap water. **Journal of Clinical Microbiology** 16 (1982) 1025 – 1029.

DONLAN, RM. and COSTERTON, JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews** 15 (2002) 167 – 193.

DUNNE JR, WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews** 15 (2002) 155 – 166.

HOENICH, NA. and LEVIN, R. The implications of water quality in hemodialysis. **Seminars in Dialysis** 16 (2003) 492 – 497.

IWANAGA, S. and KAWABATA, S. Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab. **Frontiers in Bioscience** 3 (1998) 973 – 984.

KAITWATCHARACHAI, C.; SILPAPOJAKUL, K.; JITSURONG, S.; KALNAUWAKUL, S. An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study. **American Journal of Kidney Diseases** 36 (2000) 199 – 204.

LIN, SH.; SHIEH, SD.; LIN, YF.; DE BRAUWER, E.; LANDUYT, HWV.; GORDTS, B.; BOELAERT, JR. Fatal *Aeromonas hydrophila* bacteremia in a hemodialysis patient treated with deferoxamine. **American Journal of Kidney Diseases** 27 (1996) 733 – 735.

MAGALHÃES, M.; DOHERTY, C.; GOVAN, JRW.; VANDAMME, P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection** 54 (2003) 120 – 123.

PISANI, B.; SIMÕES, M.; PRANDI, MAG.; ROCHA, MMM.; GONÇALVES, CR.; VAZ, TMI.; IRINO, K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz** 59 (2000) 51 – 56.

PORTARIA nº 82, de 3 de Janeiro de 2000. Ministério da Saúde, Brasil.

RIOUFOL, C.; DEVYS, C.; MEUNIER, G.; PERRAUDT, M.; GOULLET, D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. **Journal of Hospital Infection** 43 (1999) 203 – 209.

RUDNICK, JR.; ARDUINO, MJ.; BLAND, LA.; CUSICK, L.; McALLISTER, SK.; AGUERO, SM.; JARVIS, WR. An outbreak of pyrogenic reactions in chronic hemodialysis patients associated with hemodialyzer reuse. **International Society for Artificial Organs** 19 (1995) 289 – 294.

SANTOS, F.; SANTOS, AG.; BIERNAT, JC.; SOUZA, MEL.; RAUBACH, A.; AGUIRRE, A.; ANTONIAZZI, VR.; SCORSATTO, K.; SEIBEL, I.; DEMIN, SS.; HICKMANN, AC.; OLIVEIRA, FP.; BORBA, EV.; SIMON, S.; SANTOS, SS. Detecção de endotoxina pelo teste do *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) em unidades de hemodiálise. Porto Alegre – RS. Brasil. Medicina on line – **Revista Virtual de Medicina** 1 (2000).

SCHWARTZ, T.; HOFFMANN, S. and OBST, U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. **Journal of Applied Microbiology** 95 (2003) 591 – 601.

SIDNEY, LMO.; VILANI, C.; OLIVEIRA, CA.; CARDOSO, VL.; XAVIER, AMF. Aplicação da osmose inversa para ser utilizada em hemodiálise. **II Congresso de Engenharia de Processos do Mercosul** (1999) SC – Brasil.

SILVA, AMM.; MARTINS, CTB.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; ROMÃO JR, JE. Revisão / Atualização em diálise: água para hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 18 (1996) 180 – 188.

SMEETS, E.; KOOMAN, J.; SANDE, FVD.; STOBBERINGH, E.; FREDERIK, P.; CLAESSENS, P.; GRAVE, W.; SCHOT, A.; LEUNISSEN, K. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. **Kidney International** 63 (2003) 1574 – 1576.

TOKARS, JI. Infections due to antimicrobial-resistant pathogens in the dialysis unit. **Blood Purification** 18 (2000) 355 – 360.

WEBER, V.; LINSBERGER, I.; ROSSMANITH, E.; WEBER, C.; FALKENHAGEN, D. Pyrogen transfer across high and low flux hemodialysis membranes. **International Society for Artificial Organs** 28 (2004) 210 – 217.

YOKOTA, H.; KIYONAGA, H.; KANIWA, H.; SAISHO, N. Adsorption of endotoxin on glass in the presence of rhIL – 11. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 22 (2000) 757 – 761.

ZUNINO, P.; BELTRÁN, L.; ZUNINO, L.; MÉNDEZ, H.; PERCOVICH, V.; ROCCA, R.; ANTONELLI, B. Microbiological quality of hemodialysis water in a three year multicenter study in Uruguay. **Journal of Nephrology** 15 (2002) 374 – 379.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a qualidade microbiológica da água e dialisatos utilizados para diálise em uma Unidade de Hemodiálise em Ponta Grossa-PR, acompanhando todo o sistema de tratamento de água.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica das amostras de água e dialisatos, determinando a Contagem Total de Bactérias Heterotróficas presentes, correlacionando com os valores permitidos pela Portaria do Ministério da Saúde 82/00.
- Pesquisar a presença de Coliformes Totais e Fecais nas amostras de água e dialisatos.
- Analisar o perfil de aderência das bactérias isoladas em placas de poliestireno, avaliando a possibilidade das mesmas de formarem biofilme nas instalações da Unidade de Hemodiálise.
- Pesquisar quantitativamente a presença de Endotoxina nas amostras de água e dialisatos, correlacionando com os valores permitidos pela Portaria do Ministério da Saúde 82/00.
- Determinar o perfil de resistência das bactérias Gram-negativas isoladas das amostras de água e dialisatos, aos antibióticos de uso clínico.
- Verificar a atividade bactericida dos desinfetantes, ácido peracético (APC) a 0,2% utilizado no reprocessamento dos dialisadores e hipoclorito de sódio a 0,05% utilizado na desinfecção das tubulações do sistema de tratamento de água.

4 ARTIGO: Microbiological quality of water and dialysate in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil

C. R. M. Borges¹; K. M. S. Lascowski¹; N. Rodrigues Filho²; J. S. Pelayo¹

¹ Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

² Dialysis Unit – Nefromed Ponta Grossa-PR, Brazil

Abbreviated running title: Microbial contamination in hemodialysis

Correspondence to: Jacinta S. Pelayo, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Cx. P. 6001, 86051-970, Fax: +55 43 3371-4788, Londrina, PR, Brasil (e-mail: jspelayo@sercomtel.com.br).

ABSTRACT

Aims: The objective of the study was to determine the microbiological quality of samples of water and dialysate in a hemodialysis unit.

Methods and Results: Seventy-two samples of water and 72 of dialysate were collected in the period of November, 2003 to April, 2004. The following microbiological analyses were performed: test for total and fecal coliforms, which produced negative results for all the samples; counts of total heterotrophic bacteria, where three samples of water and two of dialysate showed levels higher than those permitted by national standards; and endotoxin assay which revealed high quantities only in samples of water that preceded reverse osmosis. Non-fermenting Gram-negative bacteria were identified in 54 samples of dialysate and in 26 of water, in which the majority of the microorganisms belonged to the genera *Pseudomonas* (32.5%), *Burkholderia* (25%) and *Acinetobacter* (17.5%). The test for adhesion to an inert surface showed that various bacteria were capable of forming biofilms. Some bacteria were resistant to sodium hypochlorite at a concentration of 500 ppm for 10 min (27%) and to three or more antibiotics (60%).

Conclusions: Water and dialysate can be a source of infection for patients who need hemodialysis.

Significance and Impact of Study: An adequate system for water treatment, disinfection of the hemodialysis system and microbiological monitoring of the water and dialysate are necessary to reduce bacteremia and pyrogenia outbreaks, to improve the quality of the hemodialysis service and to protect the health of patients.

Keywords: water, dialysate, hemodialysis, Gram-negative bacteria, endotoxin, antibiotic.

INTRODUCTION

Patients submitted to dialysis treatment are at greater risk of acquiring systemic infections (Abbott and Agodoa 2001). These patients are exposed non selectively to volumes of water that vary between 18,000 and 36,000 liters per year. Therefore, all the low molecular weight substances present in the water have direct access to the blood circulation of the patient (Silva *et al.* 1996).

Inadequate systems for treating water and inefficient methods of disinfection are responsible for the majority of outbreaks of bacteremia and pyrogenia in patients in hemodialysis. The greater incidence is of non fermenting Gram-negative bacteria, which can multiply rapidly, even in sterile water. In hemodialysis solutions, this bacterial growth can be more rapid due to the presence of glucose and bicarbonate, which would lead to high levels of endotoxin (Pisani *et al.* 2000; Santos *et al.* 2000). Moreover, samples of treated water and dialysate can be a source of infection by bacteria resistant to various antibiotic agents in clinical use (Berns and Tokars 2002).

The procedure of re-utilizing dialyzers for the purpose of reducing the incidence of first use syndrome (hypersensitivity to ethylene oxide) is also characterized by a problem with contamination by bacteria and endotoxins. Endotoxemia is probably responsible for the clinical symptoms observed in bacteremia by Gram-negatives, causing septic shock and resulting in a high rate of mortality. The presence of endotoxin is determined in endotoxin units per ml (EU ml⁻¹) or ng ml⁻¹; in terms of equivalence, 1 ng ml⁻¹ corresponds to 5 EU ml⁻¹, whereby this is the maximum limit in water utilized for the preparation of dialysate, conforming with current standards (Premaratne *et al.* 1995; Portaria 82/2000; Santos *et al.* 2000).

According to the Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI), water and dialysate should be monitored monthly for bacterial endotoxins.

Bacterial contamination in the treatment systems and in the distribution of water can lead to the formation of biofilms. The presence of biofilms in the hemodialysis system is of concern because of bacterial persistence at different points of the system, continuous release of bacteria and their components and development of greater resistance during disinfection procedures (Silva *et al.* 1996; Zunino *et al.* 2002; Smeets *et al.* 2003).

In this study, our objective was to determine the microbiological quality of water and dialysate utilized in a hemodialysis unit in Ponta Grossa-PR.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Samples were collected during the period of November, 2003 to April, 2004, including 72 samples of water and 72 of dialysate. The samples were collected weekly, that is, 4 of dialysate take turns with machines and 4 of water from the following points:

- municipal water supplies (MWS)
- water after treatment with filters (TF)
- water after ultrafiltration with reverse osmosis (RO)
- water utilized for the reprocessing of dialyzers (RD)

The samples used for microbiological testing were collected aseptically in sterile flasks. The samples destined for endotoxin analysis were collected aseptically in pyrogen-free disposable syringes (BD Plastipak®) and stored at -20°C .

Determination of Total and Fecal Coliforms

Total and fecal coliforms were determined by utilizing the most probable number (MPN) method, according to that described in the APHA. (2000), with some modifications. Aliquots of 10 ml, 1 ml and 0.1 ml of sample of water and dialysate were added to tubes containing sodium lauryl sulfate broth (BioBrás, Brazil), and the tubes incubated at 37°C for a period of 24-48 h. The samples that showed gas formation were utilized for calculating the MPN of total coliforms and also plated on MacConkey agar (MC) (BioBrás, Brazil) to determine the presence fecal coliforms. After incubation at 37°C for 24 h, colonies isolated on MC plates were identified by the biochemical tests EPM, Mili and Simon's citrate (Toledo *et al.* 1982a, 1982b). The tubes showing gas formation and the presence of *Escherichia coli* were utilized for determining the MPN of fecal coliforms. The tubes that only showed turbidity were also plated on MC to test for non fermenting bacteria. The colonies that grew in MC were submitted to the following biochemical tests: oxidase, motility and oxidation-fermentation (OF). Oxidative bacteria were identified by the API 20 NE system (bioMérieux, France).

Counts of Total Heterotrophic Bacteria

Counts of these microorganisms were performed using the method proposed by the APHA (2000). Aliquots of 0.1 ml of sample and of a 10-fold dilution were seeded in duplicate by the surface technique in standard counting medium (plate count agar – PCA) (Difco, USA). The plates were then incubated at 37°C for 24-72 h. The dilution selected for counting was that producing 30 to 300 colony forming units per ml (CFU ml⁻¹).

Endotoxin analysis

All samples (with the exception of MWS) were quantitatively examined for the presence of endotoxin. Endotoxin concentrations were determined by the chromogenic *Limulus amoebocyte lysate* (LAL – Pyrochrome®, Associates of Cape Cod). The reagent, supplied in lyophilized form was reconstituted with 3.2 ml Pyrochrome buffer, and the control standard endotoxin (CSE) was reconstituted with endotoxin – free water, according to the manufacturer's instructions. The following CSE dilutions were made: 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 and 0.03 EU ml⁻¹ in order to obtain the assay curve, and different incubation ratios were tested. The same volume of sample (50 ul) and LAL color reagent were mixed in duplicate in the wells of a microtitration plate and placed in an incubator (Dynamic Incubator – ABBOTT) at 37°C for 30 or 40 min. Afterward, 20 ul of 50% (v/v) acetic acid solution was added to the wells to stop the reaction. The absorbance of the solution was read at 405 nm in a plate reader (PR 2100 – Sanofi Pasteur).

Adhesion to inert surface

The adhesion assay performed employed the method described by Stepanović *et al.* (2000). Bacterial isolates were grown overnight at 37°C in tryptic soy broth (TSB) (BioBrás, Brazil), supplemented with 2% D(+) glucose (Difco, USA) (TSBG). The cultures were diluted 1:200 in TSBG and 200 ul of this suspension were transferred in quadruplicate to sterile 96-well polystyrene plates (NUNC, Naperville, IL) and incubated for 24 h at 37°C. Negative control wells contained TSBG only. The content of each well was then aspirated off and the wells were washed three times with 250 ul of phosphate-buffered saline (PBS – pH 7.2). The attached bacteria were fixed with 200 ul of methanol p.a (Merck, Germany) per well and after 15 min plates were emptied and left to dry. The

plates were stained for 5 min with 0.2 ml of 2% (w/v) Hucker crystal violet (Vetec, Brazil) per well. Excess stain was rinsed off by placing the plate under running tap water. The plates were air-dried and the optical density (O.D.) of each well was measured at 550 nm with a Micro ELISA Autoreader (MuLtiScan EX, LabSystem, Uniscience). The cut-off O.D. (O.D._c) was defined as three standard deviations above the mean O.D. of the negative control. The isolates were classified as follows: non-adherent (O.D. ≤ O.D._c), weakly adherent (O.D._c < O.D. ≤ 2 x O.D._c), moderately adherent (2 x O.D._c < O.D. ≤ 4 x O.D._c) and strongly adherent (4 x O.D._c < O.D.).

Disinfectant bactericidal activity

The following disinfectants were tested: sodium hypochlorite solution (Qboa, Industria Anhembí, Brazil) at a concentration of 500 ppm (parts per million) and peracetic acid solution (APC 5%, Baxter, Brazil) at a concentration of 2000 ppm. The assay was performed in duplicate according to Litsky and Litsky (1968), with some modifications. The isolates were added to 3 ml TSB and incubated for 24 h at 37°C. After the incubation period, these cultures were standardized according to the turbidity with tube N° 1 of the MacFarland scale to obtain a suspension with 10⁸ microorganisms ml⁻¹. A 1.0 ml aliquot of this culture was added to 4.0 ml disinfectant. The tubes were manually agitated for 1 min and left at room temperature for 10 min in the assay performed with sodium hypochlorite and 8 h with peracetic acid. Aliquots of this mixture were poured onto tryptic soy agar (TSA) (BioBrás, Brazil) plates with neutralizer and then incubated for 24-48 h at 37°C. After incubation, colonies were counted.

Drug sensitivity tests

These tests were performed on Muller-Hinton agar (Difco, USA) using the disk diffusion technique by *NCCLS*. (1999). The antibiotics studied were: amikacin, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, tetracycline, ticarcillin/clavulanic acid, tobramycin and trimethoprim. All the antibiotics were purchased from Laborclin (Laborclin, Brazil).

RESULTS

Among the samples tested, none showed the presence of total or fecal coliforms. With respect to total heterotrophic bacteria counting, only three samples of water (two after reverse osmosis and one utilized in the reprocessing of dialyzers) and two of dialysate showed counts higher than the limit permitted by national standards (Portaria 82/2000).

Of the 72 samples of water collected at different points of the water treatment system, 26 showed contamination with non fermenting Gram-negative bacteria. One sample was contaminated with two different types of microorganisms (data not shown). Of the 72 samples of dialysate, 54 were contaminated with non fermenting Gram-negative bacteria. Four of these samples showed contamination by two different microorganisms (data not shown). Table 1 lists the different microorganisms isolated from the samples of water and dialysate .

In relation to the test for adhesion to inert surface, 29 (36.25%) samples showed strong adherence, 34 (42.5%) moderate adherence and 17 (21.25%) weak adherence. Table 2 lists the genera and species of microorganisms that showed the highest frequency in our study, along with their pattern of adhesion to inert surface.

All the bacteria isolated were sensitive to peracetic acid; this product is utilized at a concentration of 2000 ppm for 8-24 h for the disinfection and sterilization of dialyzers. However, 27% of the bacteria isolated were resistant to sodium hypochlorite at a concentration of 500 ppm for 10 min. This disinfectant is used monthly to disinfect the water distribution system in the dialysis unit. Of the species most frequently isolated, 53.3% of *P. aeruginosa*, 25% of *A. haemolyticus* and 10% of *B. cepacia* were resistant to sodium hypochlorite.

Table 3 displays the percentages of samples resistant and moderately sensitive to the antibiotics tested. Only one sample (*P. stutzeri*) was sensitive to all the antibiotics tested. Sixty percent of the samples isolated had a profile of resistance to three or more antibiotics. *P. Aeruginosa* showed 80% resistance to tetracycline and chloramphenicol and 40% to imipinem. Ticarcillin/clavulanic acid and ciprofloxacin were the antibiotics that showed the least number of resistant samples. Various isolates had moderate sensitivity to several antibiotics.

Endotoxin analysis revealed that the quantity present in the samples of water and dialysate conform to the levels permitted by national standards (Portaria 82/2000).

Table 1. Non fermenting Gram-negative bacteria isolated from water and dialysate samples

Microorganism	N° of isolates					TOTAL
	MWS*	TF	RO	RD	Dialysate	
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	3	5		6	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	3	0	12	15
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0	1	0	0	6	7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	0	0	2	2
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Pseudomonas oryzae</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	1	1	10	12
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Vibrio metschnikovii</i>	0	0	0	0	3	3
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Chryseomonas luteola</i>	0	1	0	0	3	4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	0	0	0	0	3	3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	0	1	0	1	2
<i>CDC gr. IV C-2</i>	1	0	0	0	1	2
<i>Ralstonia pickettii</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Chromobacterium violaceum</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0	0	0	0	1	1
TOTAL	1	7	11	7	54	80

*MWS, municipal water supplies; TF, water after treatment with filter; RO, water after ultrafiltration with reverse osmosis; RD, water from reprocessing of dialyzers

Table 2. Prevalence of the principal microorganisms isolated from samples of water and dialysate and the profile of adhesion to inert surface

Microorganism	Number of samples isolated			Adhesion to inert surface		
	Water	Dialysate	Total	Strong	Moderate	Weak
<i>Burkholderia cepacia</i>	14	6	20	3	10	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	12	15	4	6	5
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2	10	12	9	2	1
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	6	7	2	4	1

Table 3. Number of resistant or moderately sensitive isolates among non fermenting Gram negative bacterial isolates from dialysate and hemodialysis water.

<i>Microorganism (n)</i>	<i>Antibiotic</i>	<i>N° of resistant isolates (%)</i>	<i>N° of moderately sensitive isolates (%)</i>
<i>Burkholderia cepacia</i> (20)	Amikacin	7 (35)	4 (20)
	Cefepime	4 (20)	2 (10)
	Ceftazidime	2 (10)	1 (5)
	Ciprofloxacin	2 (10)	1 (5)
	Chloramphenicol	8 (40)	4 (20)
	Gentamicin	9 (45)	1 (5)
	Imipenem	5 (25)	0 (0)
	Tetracycline	8 (40)	1 (5)
	Ticarcillin/clavulanic acid	1 (5)	1 (5)
	Trimethoprim	0 (0)	0 (0)
	Tobramycin	6 (30)	3 (15)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (15)	Amikacin	5 (33.3)	1 (6.6)
	Cefepime	6 (40)	1 (6.6)
	Ceftazidime	3 (20)	0 (0)
	Ciprofloxacin	1 (6.6)	4 (26.6)
	Chloramphenicol	12 (80)	1 (6.6)
	Gentamicin	5 (33.3)	1 (6.6)
	Imipenem	6 (40)	0 (0)
	Tetracycline	12 (80)	0 (0)
	Ticarcillin/clavulanic acid	2 (13.3)	2 (13.3)
	Trimethoprim	3 (20)	2 (13.3)
	Tobramycin	4 (26.6)	1 (6.6)
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (7)	Amikacin	2 (28.6)	0 (0)
	Cefepime	1 (14.3)	0 (0)
	Ceftazidime	0 (0)	0 (0)
	Ciprofloxacin	0 (0)	0 (0)
	Chloramphenicol	2 (28.6)	2 (28.6)
	Gentamicin	1 (14.3)	0 (0)
	Imipenem	0 (0)	0 (0)
	Tetracycline	1 (14.3)	0 (0)
	Ticarcillin/clavulanic acid	0 (0)	0 (0)
	Trimethoprim	1 (14.3)	0 (0)
	Tobramycin	2 (28.6)	0 (0)
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (12)	Amikacin	8 (66.6)	2 (16.6)
	Cefepime	4 (33.3)	1 (8.3)
	Ceftazidime	3 (25)	1 (8.3)
	Ciprofloxacin	1 (8.3)	0 (0)
	Chloramphenicol	8 (66.6)	3 (25)
	Gentamicin	2 (16.6)	4 (33.3)
	Imipenem	2 (16.6)	0 (0)
	Tetracycline	4 (33.3)	2 (16.6)
	Ticarcillin/clavulanic acid	2 (16.6)	0 (0)
	Trimethoprim	4 (33.3)	0 (0)
	Tobramycin	9 (75)	1 (8.3)
Other Gram – negatives (26)	Amikacin	16 (61.5)	1 (3.85)
	Cefepime	4 (15.4)	1 (3.85)
	Ceftazidime	5 (19.2)	3 (11.5)
	Ciprofloxacin	0 (0)	5 (19.2)
	Chloramphenicol	20 (77)	2 (7.7)
	Gentamicin	10 (38.5)	4 (15.4)
	Imipenem	7 (27)	0 (0)
	Tetracycline	10 (38.5)	3 (11.5)
	Ticarcillin/clavulanic acid	0 (0)	5 (19.2)
	Trimethoprim	5 (19.2)	5 (19.2)
	Tobramycin	14 (53.8)	2 (7.7)

DISCUSSION

Patients with renal insufficiency submitted to hemodialysis are exposed to large volumes of water, with a greater predisposition to contamination (Pisani *et al.* 2000; Hoenich and Levin 2003).

According to national standards (Portaria 82/2000), the water utilized for hemodialysis can have a total heterotrophic bacteria count of up to 200 CFU ml⁻¹ and the dialysate up to 2000 CFU ml⁻¹. Based on our results, only three samples of water and two of dialysate showed counts above that permitted.

Despite that the samples of dialysate mentioned above had endotoxin levels lower than 5 EU ml⁻¹ (maximum limit permitted by Portaria 82/2000), the number of heterotrophic bacteria permitted by national standards in the dialysate is of concern because the composition of the dialysate favors the growth of microorganisms which could release large amounts of endotoxin.

Assays for endotoxin confirmed the necessity of treating water by reverse osmosis, since the samples of water before this treatment were the only ones that showed elevated quantities of endotoxin (values between 2 and 4 EU ml⁻¹) which were reduced considerably after treatment (0.2 to 0.25 EU ml⁻¹).

About 90% of the bacteria found in water and dialysate in hemodialysis units are Gram-negative. *P. aeruginosa* and *B. cepacia* have been the species most frequently isolated (Pisani *et al.* 2000; Santos *et al.* 2000).

P. aeruginosa is known as an etiologic agent of nosocomial infections, which is transmitted with ease among immuno-compromised patients, besides spreading drug resistance (Pisani *et al.* 2000).

B. cepacia is notoriously resistant to disinfectants and antiseptics; it is widely distributed in nature and can cause opportunistic infections in immuno-compromised individuals (Kaitwatcharachai *et al.* 2000; Magalhães *et al.* 2003).

Of the bacteria isolated in the present study, 32.5% were *Pseudomonas* spp., 25% *B. cepacia* and 17.5% *Acinetobacter* spp. Other genera were isolated, but to a lower frequency. We can see that the majority of the isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. were derived from samples of dialysate while those of *B. cepacia* were derived from water (Table1).

Among the outbreaks of infections by Gram-negative bacteria reported in hemodialysis units, inadequate disinfection of the water treatment system and distribution has been mentioned as a possible source of such outbreaks (Pisani *et al.* 2000; Arvanitidou *et al.* 2003; Magalhães *et al.* 2003). The hemodialysis unit studied here has a routine monthly disinfection of the water distribution system, utilizing sodium hypochlorite at 500 ppm for 10 min, for the purpose of preventing increased numbers of bacteria and impeding the formation of biofilms (Tanaka *et al.* 1999).

One worrisome finding was the number of samples with *P. aeruginosa* (53.3%) resistant to the process utilized for the disinfection of the water distribution system. We suggest the use of a higher concentration of disinfectant or a longer time of contact.

Bacteria resistant to the process of disinfection utilized at hemodialysis units can adhere to tubing and form biofilms. Based on the results of the test for adhesion to an inert surface, 36.25% of the isolates had the capacity to adhere strongly to plastic and 42.5% of them at least moderately, demonstrating the predisposition that these isolates have to form biofilms.

The relevance in the formation of biofilms is in its greater resistance to disinfection processes and the constant presence of microorganisms, with the release of cellular

components such as endotoxins, characterizing a focus of contamination (Rioufol *et al.* 1999; Dasgupta, 2002; Cappelli *et al.* 2003).

The bacterial isolates from both water and dialysate showed resistance to various antibiotics. Based on our findings (Table 3), *P. aeruginosa* showed a high resistance to chloramphenicol (80%) and tetracycline (80%), and *A. haemolyticus* to amikacin (66.6%), chloramphenicol (66.6%) and tobramycin (75%). The other bacterial isolates were resistant to tobramycin (53.8%), amikacin (61.5%) and chloramphenicol (77%).

The present study suggests that water and dialysate constitute a source of infection from various species of non fermenting Gram-negative bacteria that also display multi-resistance to antibiotics. Therefore, an adequate water treatment system, the efficient disinfection of hemodialysis equipment and dialyzers, and the microbiological monitoring of water and dialysate are key points to maintaining the quality of the renal replacement therapy service offered to patients with chronic renal disease.

Acknowledgments

We thank Dr. A. Leyva for his help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Abbott, K.C. and Agodoa, L.Y. (2001) Etiology of bacterial septicemia in chronic dialysis patients in the United States. *Clinical Nephrology* **56**, 124-131.
- American Public Health Association. (2000) Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. Edited by Clesceri, I.; Greenberg, AE.; Eaton, AD. Washington, D.C.
- 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. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 180-185.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American national standard for hemodialysis systems. In: AAMI Standards and Recommended Practices. Volume 3: Dialysis. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; (1990) 27 –58.
- Berns, J.S. and Tokars, J.I. (2002) Preventing bacterial infections and antimicrobial resistance in dialysis patients. *American Journal of Kidney Disease* **40**, 886-898.
- Cappelli, G., Sereni, L., Scialoja, M.G., Morselli, M., Perrone, S., Ciuffreda, A., Bellesia, M., Inguaggiato, P., Albertazzi, A., Tetta, C. (2003) Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**, 2105-2111.
- Dasgupta, M.K. (2002) Biofilms and infection in dialysis patients. *Seminars in Dialysis* **15**, 338-346.
- Hoening, N.A. and Levin, R. (2003) The implications of water quality in hemodialysis. *Seminars in Dialysis* **16**, 492-497.

Litsky, B.Y. and Litsky, W. (1968) Investigations on decontamination of hospital surfaces by use of disinfectant detergents. *American Journal of Public Health Nations Health*. **58**, 534-543.

Kaitwatcharachai, C., Silpapojakul, K., Jitsurong, S., Kalnauwakul, S. (2000) An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study. *American Journal of Kidney Diseases* **36**, 199-204.

Magalhães, M., Doherty, C., Govan, J.R.W., Vandamme, P. (2003) Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *Journal of Hospital Infection* **54**, 120-123.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2004) Villanova, Pa.

Pisani, B., Simões, M., Prandi, M.A.G., Rocha, M.M.M., Gonçalves, C.R., Vaz, T.M.I., Irino, K. (2000) Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Revista Instituto Adolfo Lutz* **59**, 51-56.

Portaria nº 82, de 3 de Janeiro de 2000. Ministério da Saúde, Brasil.

Premaratne, S., May, M.L., Nakasone, C.K., Mcnamara, J.J. (1995) Pharmacokinetics of endotoxin in a *Rhesus* macaque septic shock model. *Journal of Surgical Research* **59**, 428-432.

Rioufol, C., Devys, C., Meunier, G., Perraud, M., Gouillet, D. (1999) Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *Journal of Hospital Infection* **43**, 203-209.

Santos, F., Santos, A.G., Biernat, J.C., Souza, M.E.L., Raubach, A., Aguirre, A., Antoniazzi, V.R., Scorsatto, K., Seibel, I., Demin, S.S., Hickmann, A.C., Oliveira, F.P., Borba, E.V., Simon, S., Santos, S.S. (2000) Detecção de endotoxina pelo teste do *Limulus*

Amebocyte Lysate (LAL) em unidades de hemodiálise. *Medicina on line – Revista Virtual de Medicina* 1.

Silva, A.M.M., Martins, C.T.B., Ferraboli, R., Jorgetti, V., Romão Jr, J.E. (1996) Revisão / Atualização em diálise: água para hemodiálise. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* **18**, 180-188.

Smeets, E., Kooman, J., Sande, F.V.D., Stobberingh, E., Frederik, P., Claessens, P., Grave, W., Schot, A., Leunissen, K. (2003) Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. *Kidney International* **63**, 1574-1576.

Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. (2000) A modified microtiter plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* **40**, 175-179.

Tanaka, N., Fujisawa, T., Daimon, T., Fujiwara, K., Yamamoto, M., Abe, T. (1999) The cleaning and disinfecting of hemodialysis equipment using electrolyzed strong acid aqueous solution. *International Society for Artificial Organs* **23**, 303-309.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. (1982a) EPM: modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano-desaminase. *Revista de Microbiologia* **13**, 309-315.

Toledo, M.R.F., Fontes, C.F., Trabulsi, L.R. (1982b) MILI: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina-descarboxilase. *Revista de Microbiologia* **13**, 230-235.

Zunino, P., Beltrán, L., Zunino, L., Méndez, H., Percovich, V., Rocca, R., Antonelli, B. (2002) Microbiological quality of hemodialysis water in a three year multicenter study in Uruguay. *Journal of Nephrology* **15**, 374-379.

CONCLUSÕES

1. Dentre as 144 amostras analisadas (72 de água e 72 de dialisato), nenhuma apresentou presença de coliformes totais e fecais.
2. Quanto à contagem total de bactérias heterotróficas, apenas três amostras de água e duas de dialisato apresentaram contagem acima do valor limite permitido pela Portaria 82/2000.
3. Foram identificadas bactérias Gram-negativas não fermentadoras em 54 amostras de dialisatos e em 26 de água, sendo que a maioria dos microrganismos pertencia aos gêneros: *Pseudomonas* (32,5%), *Burkholderia* (25%) e *Acinetobacter* (17,5%).
4. O teste de adesão à superfície inerte, mostrou que várias bactérias são capazes de formar biofilme.
5. Todas as bactérias isoladas foram sensíveis ao ácido peracético na concentração de 2000 ppm por 8 horas (processo utilizado para a desinfecção e esterilização dos dialisadores).
6. Vinte e sete por cento das bactérias isoladas foram resistentes ao hipoclorito de sódio na concentração de 500 ppm por 10 minutos (processo utilizado para fazer a desinfecção do sistema de distribuição de água). Das espécies mais frequentemente isoladas, 53,3% de *P. aeruginosa*, 25% de *A. haemolyticus* e 10% de *B. cepacia* foram resistentes ao hipoclorito de sódio.
7. Apenas uma amostra (*P. stutzeri*) foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Sessenta por cento das amostras isoladas apresentaram um perfil de resistência a três ou mais antimicrobianos. Várias amostras apresentaram sensibilidade moderada a vários antimicrobianos.
8. A pesquisa de endotoxina revelou que a quantidade presente nas amostras de água e dialisatos estão em conformidade com os níveis permitidos pela Portaria 82/2000.

9. Um adequado sistema de tratamento de água, desinfecção do sistema de hemodiálise e monitoramento microbiológico da água e dialisatos é necessários para a redução de surtos de bacteremia e pirogenia, melhorando a qualidade do serviço de hemodiálise e protegendo a saúde dos pacientes.