UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

YOHANNA MAYELLE GOMES

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS ASSOCIADAS A SISTEMAS HEMODIALÍTICOS.

VITÓRIA (ES)

2019

YOHANNA MAYELLE GOMES

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS ASSOCIADAS A SISTEMAS HEMODIALÍTICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Ambiental, Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Sérvio Túlio A. Cassini

VITÓRIA (ES)

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial Tecnológica,

Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Gomes, Yohanna Mayelle, 1989-

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS ASSOCIADAS A SISTEMAS HEMODIALÍTICOS. - Yohanna Mayelle Gomes. – 2019.

XX f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Sérvio Túlio A. Cassini

Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico.

1. Hemodiálise. 2. água. 3. bactérias. 4. Antimicrobianos. I. Cassini, Sérvio Túlio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Tecnológico. IV. Título.

YOHANNA MAYELLE GOMES

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUAS ASSOCIADAS A SISTEMAS HEMODIALÍTICOS.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de doutorado em Engenharia Ambiental na área de Saneamento.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Sérvio Túlio A. Cassini
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

_____

Prof. Dr Ricardo Franci Goncalves
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

_____

Prof. Dr. Antonio Sergio Ferreira Mendonça
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

_____

Prof. Dra. Kênia Valeria dos Santos
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Externo

_____

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e as benções recebidas diariamente.

Agradeço a minha família por me proporcionar o privilégio de poder estudar e crescimento pessoal. Em especial, ao meu marido, Romenique Raton, pelo companherismo, força, estabilidade e apoio ao longo desses anos.

Ao prof. e orientador Dr. Sérvio Cassini pela oportunidade de trabalhar neste projeto, por sua paciência, disponibilidade, atenção e acreditar no meu potencial.

Agradeço a prof[a] Dra. Kênia dos Santos, pela colaboração, conselhos e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a atenção da banca examinadora, prof. Dr. Ricardo Franci, prof. Dr Antônio Sérgio, prof. Dr. Ricardo Schuenck e prof[a] Dra. Kênia dos Santos.

Ao prof. Dr. Rodrigo Cayô, por gentilmente realizar as análises de MALD-TOF.

A prof[a] Dra Regina Keller pelo apoio ao longo desses anos.

Agradeço as equipes das unidades de hemodiálise pela oportunidade de coleta e parceria ao longo desses anos, em especial ao Dr Alexandre, Josi, Cristiane e Winderson.

Ao prof. Dr. João Addad pelos ensinamentos e inspiração no desenvolvimento da tese.

Agradeço a colaboração de todos os colegas da pós-graduação e dos funcionários do Labsan. Em especial Lucas, pelo apoio das coletas, o cafezinho e ajuda com a vidraria.

Agradeço a minha aluna de iniciação científica, Bárbara Miguel, pela colaboração no desenvolvimento do projeto.

Sou extremamente grata ao Rodrigo Barcellos, sem você não teria desenvolvido metade do projeto. Obrigada meu amigo e padrinho por toda ajuda!

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a minha dedicação a este trabalho

Se me esqueci de alguém, por favor, me perdoem! Porque para a minha sorte, vocês são muitos!

Dedico este trabalho a todos os pacientes em tratamento hemodialítico

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi caracterizar a qualidade da água para hemodiálise e descrever microrganismos presentes na água. Foram utilizadas as metodologias de cromatografia iônica para determinar a concentração dos nutrientes na água, Elisa para detecção de microcistinas, MALD-TOF MS para identificação dos microrganismos isolados, testes de antibiograma em disco e concentração mínima inibitória, ação dos desinfetantes (UV, hipoclorito de sódio e ácido peracético) e análise de metagenômica para caracterização da comunidade bacteriana presente no sistema de tratamento da água. Foram identificados que os níveis de nitrato, fluoreto e BHT encontrados podem apresentar risco ao paciente em hemodiálise. Em uma amostra de água potável foi verificada a presença de microcistina. Dos isolados, a *Ralstonia sp.* foi a mais frequente. Cerca de 60% das bactérias isoladas apresentaram o padrão de multirresistência aos antimicrobianos, principalmente a colistina, gentamicina e aos carbapenêmicos. O sistema de tratamento da água foi capaz de remover 95% das sequências gênicas detectadas na água de entrada. As espécies mais prevalentes foram *Sphingomonas alpina, Curvibacter gracilis, Bradyrhizobium sp., Ralstonia picketti, Escherichia coli* , *Serratia liquefaciens* e *Serratia proteamaculans.* A presença de bactérias patogênicas emergentes e perfis de multirresistência detectadas neste estudo apontam a necessidade do monitoramento microbiológico da água para hemodiálise.

Palavras chaves: Hemodiálise; Água; Bactérias, Metagenômica e Antimicrobianos

ABSTRACT

The objective of the research was to characterize the water quality for hemodialysis and to describe microorganisms present in the water. Ion chromatography methodologies were used to determine nutrient concentration in water, Elisa for microcystins detection, MALD-TOF MS for identification of isolated microorganisms, antibiogram test discs and minimum inhibitory concentration, action of disinfectants (UV, hypochlorite of sodium and peracetic acid) and metagenomic analysis to characterize the bacterial community present in the water treatment system. It was identified that the levels of nitrate, fluoride and BHT found may present a risk to the patient on hemodialysis. In a drinking water sample the presence of microcystin was verified. Of the isolates, *Ralstonia sp.* was the most frequent. About 60% of the isolated bacteria showed a pattern of multidrug resistance to antimicrobials, mainly colistin, gentamicin and carbapenemics. The water treatment system was able to remove 95% of the gene sequences detected in the incoming water. The most prevalent species were *Sphingomonas alpina*, *Curvibacter gracilis*, *Bradyrhizobium sp.*, *Ralstonia picketti*, *Escherichia coli*, *Serratia liquefaciens* and *Serratia proteamaculans*. The presence of emerging pathogenic bacteria and multiresistance profiles detected in this study indicate the need for microbiological monitoring of water for hemodialysis.

Keywords: Hemodialysis; Water; Bacteria, Metagenomics and Antimicrobials

ISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Padrão de qualidade da água para hemodiálise 27

Tabela 1.2 - Sinais e sintomas relacionados a possíveis contaminantes presentes na água para hemodiálise 28

Tabela 1.3 - Perfil de resistência de isolados de clínicos e ambientais de *Ralstonia sp.* 40

Tabela 2.1 – Concentração média e desvio padrão de nitrato, fluoreto, cloreto, sulfato, sódio, potássio, cálcio e magnésio pré-tratamento de osmose inversa (Pré) e pós-tratamento de osmose inversa (Pós) nos centros de hemodiálise. 46

Tabela 2.2 – Valores médios e desvio padrão da quantificação de UFC/mL (Unidade Formadoras de Colônias)/mL de bactérias heterotróficas totais (BHT) de amostras de água provenientes do pré-tratamento de osmose inversa (Pré OI) e pós-tratamento de osmose inversa (Pós OI) nos centros de hemodiálise localizados na região metropolitana do Espírito Santo, Brasil. 48

Tabela 2.3 – Microrganismos isolados de amostras de água provenientes do pré-tratamento de osmose inversa (Pré OI), pós-tratamento de osmose inversa (Pós OI) e dialisato nos centros de hemodiálise localizados na região metropolitana do Espírito Santo, Brasil. 49

Tabela 3.1 – Suscetibilidade a antimicrobianos de 20 isolados de bactérias da água para hemodiálise usando teste de difusão em disco. 58

Tabela 3.2 – Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos e porcentagem de resistência dos isolados da água para hemodiálise. 59

Tabela 4.1 – Resumo das amostras de água coletadas no sistema de tratamento utilizado pela unidade de hemodiálise. 67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Esquema representativo do procedimento da hemodiálise 17
Figura 1.2 - Esquema representativo do procedimento da hemodiálise 17
Figura 1.3 - Representação do sistema de tratamento de água nas unidades de hemodiálise. 19
Figura 1.4 – Sistema do funcionamento do abrandador de água. 21
Figura 1.5 – Fluxograma do processo de osmose inversa. 22
Figura 1.6 – Mecanismo de ação dos antimicrobianos. 33
Figura 1.7 - Mecanismos que contribuem para a resistência adquirida a antimicrobianos em bactérias. 34
Figura 1.8 - Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos. 35
Figura 2. 1 – Representação dos pontos de coleta de água no sistema de tratamento utilizado pelas unidades de hemodiálise. 43
Figura 3. 1 – Representação da origem das cepas de bactérias isoladas do sistema de tratamento de água utilizado pelas unidades de hemodiálise. 54
Figura 3.2 – Ação dos agentes de desinfecção em isolados bacterianos de amostras de água para hemodiálise. 62
Figura 4.1 - Representação dos pontos de coleta de água no sistema de tratamento utilizado pela unidade de hemodiálise. 66
Figura 4.2 – Distribuição do número de sequencias genéticas da região V3 e V4 do RNAr e as espécies identificadas em amostras de água e filtro do sistema de tratamento de água para hemodiálise. 68
Figura 4.3 Abundancia relativa das espécies identificadas por análises de metagenômica em amostras de água e filtro do sistema de tratamento para hemodiálise. 69

LISTA DE SIGLAS

AMI	Amicacina
Anvisa	Agência nacional de vigilância sanitária
APS	Amplicilina/sulbactam
ATCC	*American type culture collection*
BGNNF	Bactéria Gram negativa não fermentadora
BHT	Bactérias heterotróficas totais
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	*Clinical & laboratory standards institute*
COL	Colistina
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
DOR	Doripenem
DRC	Doença crõnica renal
Elisa	Enzyme-linked immunosorbent assay
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
Labsan	Laboratório de saneamento ambiental
LVX	Levofloxacin
MALD-TOF	*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*
MDR	Multirresistente
MER	Meropenem
MH	Minociclina
MIC	Concentração inibitória minima
MS	*Mass spectrometry*
OI	Osmose inversa
PBS	*Phosphate buffered saline*
PIP	Piperacilina
PIT	Piperacilina/ tozobactam
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBN	Sociedade Brasileira de nefrologista
TOB	Tobramicina
TSA	*Trypticase soy agar*
UFC	Unidade formadora de Colônia
UH	Unidade de hemodiálise
UFES	Universidade federal do Espírito Santo
UV	Ultravioleta
XDR	Extensivamente resistentes

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14
OBJETIVOS 15
Objetivo Geral 15
Objetivos específicos 15
CAPÍTULO 1 16
REVISÃO DE LITERATURA 16
1.1 Sistemas hemodialíticos 16
1.2 Tratamento de água para hemodiálise 18
1.3. Legislação brasileira e internacional referente a qualidade de água destinada a hemodiálise 25
1.4. Problemas associados à hemodiálise 28
1.4.1 Bactérias associadas à hemodiálise 29
1.4.2 Mecanismos de ação dos antimicrobianos *31*
1.4.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos *33*
1.4.4 Ralstonia *37*
CAPÍTULO 2 41
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE 41
RESUMO 41
2.1 INTRODUÇÃO 41
2.2 METODOLOGIA 43
2.2.1 Amostragem 43
2.2.2 Análises de parâmetros físico-químicos 44
2.2.3 Análise de microcistina 44
2.2.4 Análises Microbiológicas 44
2.2.4.1 Detecção de coliformes totais e Escherichia coli 44
2.2.4.2 Quantificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) 44
2.4.3 Isolamento e Identificação dos microrganismos isolados 45
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
2.3.1 Parâmetros físico-químicos de qualidade de água 45
2.3.2 Detecção de microcistina 47
2.3.3 Parâmetros microbiológicos 48

2.3.4 Microrganismos isolados de amostras de água nas unidades de hemodiálise.....49
2.4 CONCLUSÕES 51
CAPÍTULO 3 52
AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE ÁGUAS DE HEMODIÁLISE FRENTE À AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES. 52
RESUMO.....52
3.1 INTRODUÇÃO.....52
3.2 METODOLOGIA 54
3.2.1 Origem dos isolados bacterianos.....54
3.2.2 Identificação dos microrganismos isolados 55
3.2.3 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos.....55
3.2.3.1 Método de difusão em disco 55
3.2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) 55
3.2.3.3 Classificação de suscetibilidade dos isolados bacterianos.....56
3.2.4 Desinfecção 56
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 57
3.3.1 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos.....57
3.3.2 Desinfecção 61
3.4 CONCLUSÕES 63
CAPÍTULO 4 64
ESTUDO METAGENÔMICO DAS BACTÉRIAS PRESENTES EM ÁGUAS DE HEMODIÁLISE. 64
4.1. INTRODUÇÃO.....64
4.2. METODOLOGIA 65
4.2.1 Amostragem 65
4.2.2 Concentração e extração do DNA.....66
4.2.3 Análises de metagenômica 67
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....67
4.4 CONCLUSÕES 71
CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES 72
REFERÊNCIAS.....73

INTRODUÇÃO

O número de casos de pessoas com doença renal crônica (DRC) tem aumentado nos últimos anos e, estima-se que acometa cerca de 10% da população mundial em idade adulta (Vos *et al.*, 2016). No Brasil, nos anos de 2002 a 2017, a prevalência aumentou cerca de 160%, sendo estimados 126 mil pacientes em diálise e com taxa de mortalidade de 19,9% ao ano (Thomé *et al.*, 2019). O tratamento por hemodiálise é o mais recomendado para os casos de DCR. A cada sessão de hemodiálise são consumidos em média 400 litros de água justificando a importância no monitoramento de padrões da qualidade da água para prevenir casos de pacientes contaminados (Silva *et al.*, 1996; Daugirdas, 2003; Hoenick *et al.*, 2006). O foco deste trabalho foi verificar a qualidade de água no sistema de tratamento utilizado pelas unidades de hemodiálise, o presente estudo está apresentado em quatro capítulos.

No capítulo 1 está descrito a revisão de literatura sobre a hemodiálise e padrões de qualidade da água utilizada em procedimentos hemodialíticos. O enfoque deste capítulo é o sistema de tratamento de água, propriedades de desinfetantes, contaminantes microbiológicos, características de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência de bactérias Gram negativas não fermentadoras (BGNNF) comumente descritas em amostras de água para hemodiálise.

O capítulo 2 é sobre o monitoramento da qualidade físico-química e microbiológica da água do sistema de tratamento em unidades de hemodiálise localizadas na região metropolitana da Grande Vitória. Além disso, a identificação de isolados de microrganismos da água, alguns descritos como patógenos oportunistas e que apresentam risco de infecção em pacientes com sistema imunológico comprometido.

No capítulo 3 é discutido o padrão de multi-resistência em BGNNF em ambientes hospitalares. Este estudo caracteriza o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Ralstonia sp.* e outras BGNNF pelos testes de disco de fusão e a concentração mínima inibitória (MIC) e a ação de agentes desinfetantes nestes isolados.

O capítulo 4 é o estudo de metagenômica de perfis bacterianos presentes no tratamento de água destinado à hemodiálise. A diversidade genética encontrada pela técnica demonstra a importância do estudo de análise do material genético, capaz de identificar

e quantificar espécies cultiváveis ou não de amostras ambientais. Como também, a dinâmica de espécies que passam pelo tratamento da água e do dialisato.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a qualidade de águas associadas a sistemas hemodialíticos.

Objetivos específicos

- Caracterização físico-química e microbiológica de águas utilizadas em sistemas hemodialíticos;
- Isolar e caracterizar bactérias associadas às águas do sistema hemodialítico;
- Descrever a variabilidade metagenômica de bactérias presentes no sistema hemodialítico.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Sistemas hemodialíticos

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva dos néfrons, resultado de lesões irreversíveis que diminui gradualmente a função renal global, sendo a hipertensão e diabetes as principais doenças associadas. A média de sobrevida do paciente com DRC é de quatro a cinco semanas, devido ao acumulo de excretas altamente tóxicas no corpo humano, porém, pode se aumentar a sobrevida por anos se o paciente for submetido a um procedimento dialítico. O tratamento convencional é hemodiálise, diálise peritoneal e o transplante renal (Guyton & Hall, 1998; Parmar, 2002; Pontoriero *et al.*, 2003).

Historicamente a hemodiálise iniciou na década de 40, durante a segunda guerra mundial, com o médico alemão W. J. Kolff, considerado por alguns como o pai da hemodiálise. Ele utilizou com sucesso o que viraria a ser a primeira máquina de diálise (hemodialisador) em um paciente com insuficiência renal aguda (Gottschalk & Fellner, 1997). O hemodialisador pode ser caracterizado como um rim artificial, onde ocorre a troca de substâncias entre o sangue conduzido para fora do organismo e o dialisato através de uma membrana semipermeável e o regresso do sangue depurado ao organismo. Desde o início da utilização desse equipamento, a sobrevivência dos pacientes tem aumentado significativamente (Vorbeck-Meister *et al.*, 1999; Bugno *et al.*, 2007).

A hemodiálise é um processo artificial de filtração do sangue, utilizada como tratamento aos pacientes que sofrem de doença renal crônica ou aguda e, consiste na remoção de líquidos e substâncias tóxicas do sangue. Durante o processo, o sangue é conduzido à máquina de diálise, que possui uma bomba e um sistema de dosagem de solução dialítica. A bomba é responsável por bombear o sangue do paciente aos capilares do dialisador, onde ocorrem as trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato, através de uma membrana semipermeável. Após ser retirado do paciente e filtrado pelo dialisador, o sangue é então devolvido ao paciente (figura 1.1).

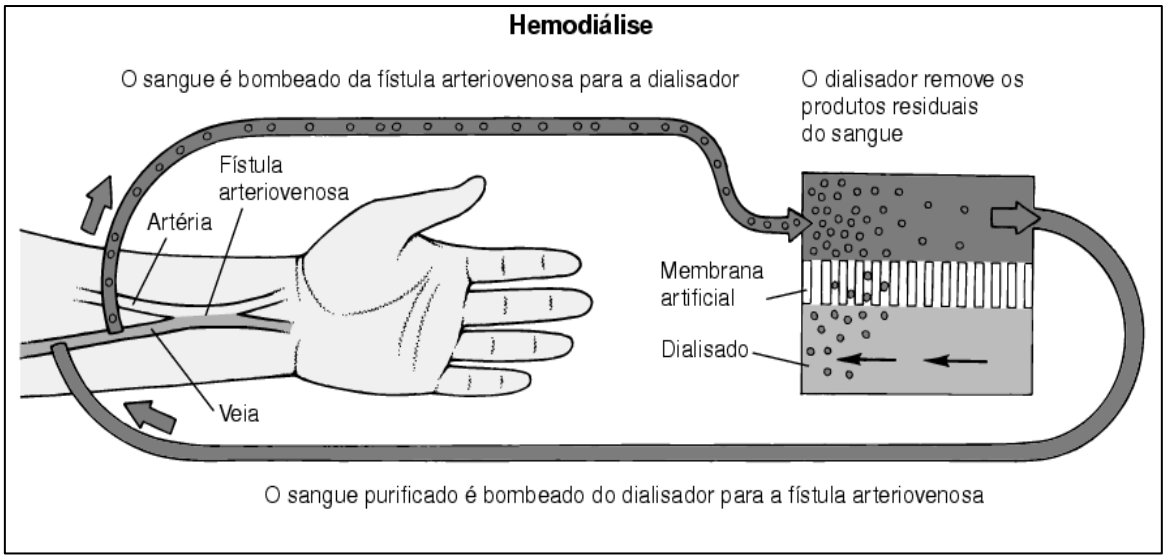

Figura 1.1 Esquema representativo do procedimento da hemodiálise
Fonte: http://www.manualmerck.net/images/p_628.gif

O processo de diálise peritoneal consiste na infusão da solução de diálise na cavidade peritoneal e posteriormente a drenagem do líquido (figura 1.2). Esta modalidade pode ser realizada na residência do paciente, desde que o paciente e/ou familiar receba treinamento adequado. Há dois tipos de diálise peritoneal; a Ambulatorial Contínua, realizada diariamente com frequência de quatro trocas durante o dia e pode ser realizada pelo paciente e/ou familiar e a Automatizada em que a troca de líquidos é realizada por uma máquina (FOOTE & MANLEY, 2008; SBN, 2019).

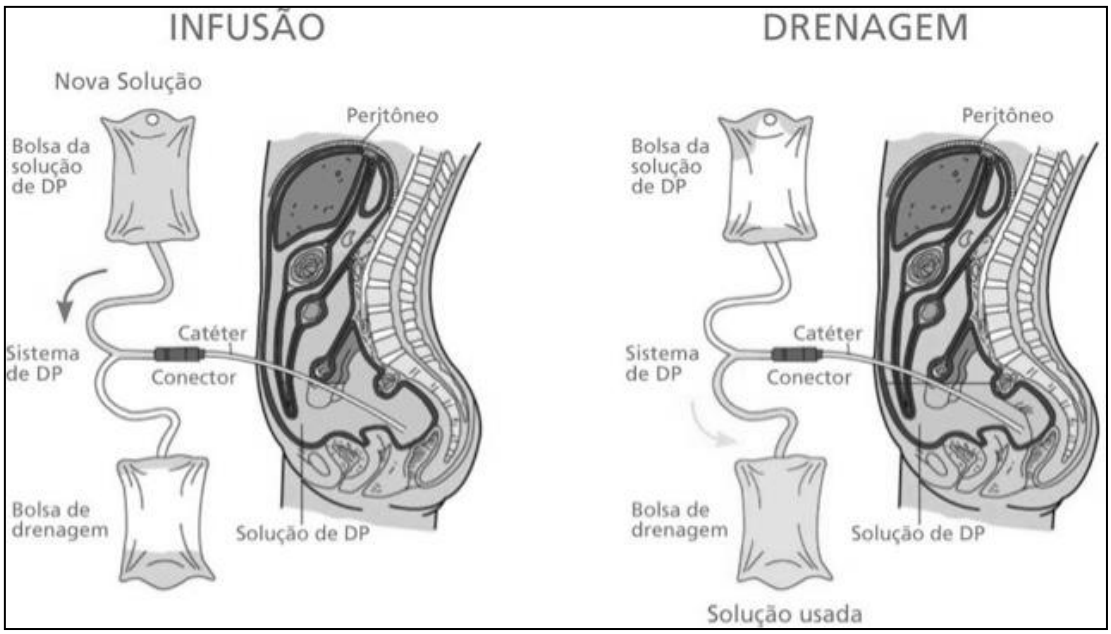

Figura 1.2 *Esquema representativo do procedimento de diálise peritoneal*
Fonte: https://br.depositphotos.com/141469458/stock-illustration -of-peritoneal-dialysis.html

Os serviços de diálise geralmente são ofertados na unidade de diálise, setor hospitalar de nefrologia especializado. Em alguns casos, em caráter de emergência, a hemodiálise pode ser realizada à beira do leito, denominando de diálise móvel. Ainda existe a opção da hemodiálise domiciliar, toda estrutra física presente na unidade de diálise é montada em menor escala na residência do paciente, opção crescente em países desenvolvidos (SESA, 2013; Ágar *et al.*, 2015).

O número de casos de pessoas com doença renal crônica (DRC) tem aumentado nos últimos anos e, estima-se que acometa cerca de 10% da população mundial em idade adulta (Vos *et al.*, 2016). No Brasil, nos anos de 2002 a 2017 a prevalência aumentou cerca de 160%, sendo estimados 126 mil pacientes em diálise e com taxa de mortalidade de 19,9% ao ano (Thomé *et al.*, 2019). Em geral, uma sessão convencional de hemodiálise possui duração média de três a quatro horas e frequência de três vezes por semana. A quantidade de água que um paciente utiliza por ano é aproximadamente 23.000 litros (Andreoli & Nadaleto, 2008; Nystrand, 2008).

Os pacientes que recebem longos tratamentos de hemodiálise estão sujeitos a um maior risco de adquirir uma septicemia que pode ser causada principalmente por cuidados inadequados com os cateteres, contaminação de fontes de água, de desinfetantes e de medicamentos, danos na integridade da membrana de diálise e reuso dos capilares na hemodiálise também foram identificados como fontes de infecção (ANSHS, 2004). Diante disso é necessário maior rigor na qualidade de água utilizada pelas UH, que devem se enquadrar a padrões mais seguros, que no Brasil é estabelecido pela Resolução de diretoria Colegiada (RDC) e possui um sistema de tratamento de água específico.

1.2 Tratamento de água para hemodiálise

A água é a matéria prima necessária para todos os tipos de tratamentos de hemodiálise. No entanto, é requerida a qualidade de água tipo I, de acordo com as normas preconizadas pela Farmacopéia Européia e da Farmacopéia dos Estados Unidos da América. A água potável não pode ser utilizada diretamente no tratamento devido à presença de substâncias consideradas tóxicas aos pacientes hemodialíticos (Ward, 2011). Geralmente a água utilizada é fornecida pela rede pública e o tratamento específico para a remoção destas substâncias nocivas é realizado nas unidades de

hemodiálise. O tratamento pode ser dividido em pré-tratamento, purificação e a distribuição da água (figura 1.3) (Silva *et al.*, 1996; Kasparek & Rodriguez, 2015).

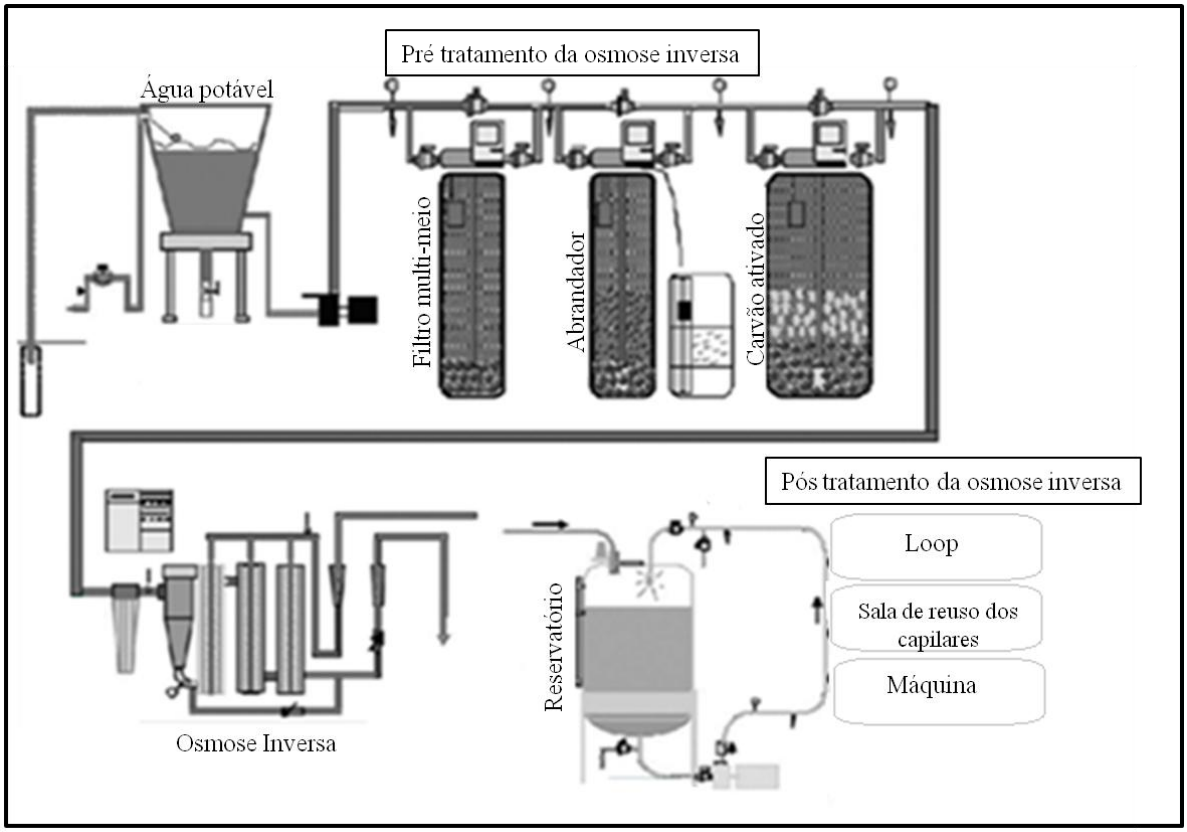

Figura 1.3 – Representação do sistema de tratamento de água nas unidades de hemodiálise.

O tipo do sistema do tratamento de água destinada à hemodiálise pode variar significativamente e a escolha estará condicionada a necessidades locais de pré-tratamento, a qualidade da água, o volume do produto necessário e a tecnologia de tratamento escolhida (Kasparek & Rodriguez, 2015). A eficiência deste tratamento também dependerá da capacidade dos componentes do equipamento, da natureza da água e de variações sazonais (Silva *et al.*, 1996). De modo geral, o sistema de tratamento de água para diálise deve ficar localizado em uma sala exclusiva, com instalações adequadas para o abastecimento, drenagem e energia elétrica. Esta sala deve ser bem organizada, limpa, seca e não deve haver vazamentos de água ou odores desagradáveis e as tubulações devem ser identificadas com a direção do fluxo da água (Kasparek & Rodriguez, 2015).

1.2.1 Pré-tratamento da água para hemodiálise

No Brasil, a água utilizada para o tratamento deve obedecer aos padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria MS 29014, 2011. O pré-tratamento da água realizado nas unidades de diálise é composto por filtros: mecânicos, carvão e abrandadores.

Os filtros mecânicos têm por função a remoção de partículas em suspensão com o objetivo de impedir a obstrução dos componentes do sistema de água à jusante, em especial as membranas da osmose inversa (OI). Os principais são: o filtro de areia, capaz de remover partículas entre 25 e 100 μm e, os filtros de membranas, capazes de remover partículas a partir de 0.25 μm. O risco associado aos filtros de areia é a possibilidade de colonização e crescimento de algas resultando o aumento da pressão interna e queda do fluxo de água e da filtragem (Silva *et al.*, 1996).

O papel dos abrandadores é a remoção de cálcio, magnésio e outros cátions polivalentes, íons responsáveis pela dureza da água. Os abrandadores contêm resinas que trocam sódio por cálcio e magnésio (figura 1.4). Esta etapa é importante, porque a água dura pode formar depósitos de calcário a jusante da membrana de OR e reduzir a qualidade da água do produto purificado. Se a concentração de íons de cálcio e magnésio for elevada a quantidade de sódio liberada pelo aparelho pode ser elevada, levando a riscos de hipernatremia para os pacientes (Silva *et al.*, 1996; Kasparek & Rodriguez, 2015). Após a passagem da água pelo abrandador foi possível detectar crescimento bacteriano na água, inclusive de *P. aeruginosa.* É recomendável a lavagem diária automatizada deste filtro, a fim de promover a eficácia do tratamento e o tempo de vida útil das membranas da OI (Bolasco, 2019) e, o monitoramento da dureza da água diariamente e o limite deve estar abaixo de 1ppm. Sendo que a dureza total da água não deve exceder 1 ppm. Isso deve ser verificado uma vez ao dia, de preferência no final do dia Ahmad, (2005).

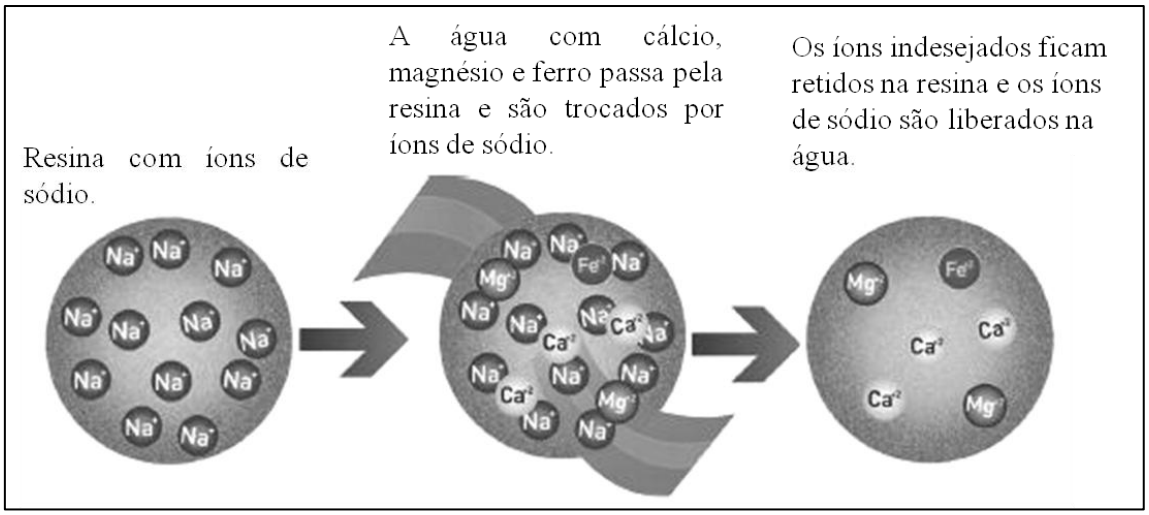

Figura 1.4 – Sistema do funcionamento do abrandador de água.
Fonte: http://www.revistatae.com.br/4782-noticias

Os filtros de carvão ativado têm por finalidade a remoção de cloretos, cloraminas e substâncias orgânicas, como herbicidas, pesticidas e solventes industriais (Silva *et al.*, 1996; Amato *et al.*, 2013). Os possíveis problemas associados a estes filtros, quando não mantidos adequadamente, é a contaminação por proliferação bacteriana devido à alta afinidade pela matéria orgânica que seus poros possuem (Silva *et al.*, 1996), além disso pode liberar partículas abrasivas. É recomendável o monitoramento do funcionamento do filtro e a limpeza periódica com cloro (Ahmad, 2005). O processo de filtração pelo carvão ativado é muito importante para o tratamento, pois a exposição ao cloro e cloramina pode prejudicar os pacientes e, além disto, compostos de cloro reativos podem danificar o membrana da OI (Kasparek & Rodriguez, 2015).

1.2.2 Osmose inversa (OI)

Na OI a água pura pode ser produzida a partir de uma solução salina através de uma membrana semipermeável, sendo necessário que a solução esteja a uma pressão superior à pressão osmótica relacionada à sua concentração salina e com isso inverter a condição da osmose (figura 1.5) (Silva *et al.*, 1996).

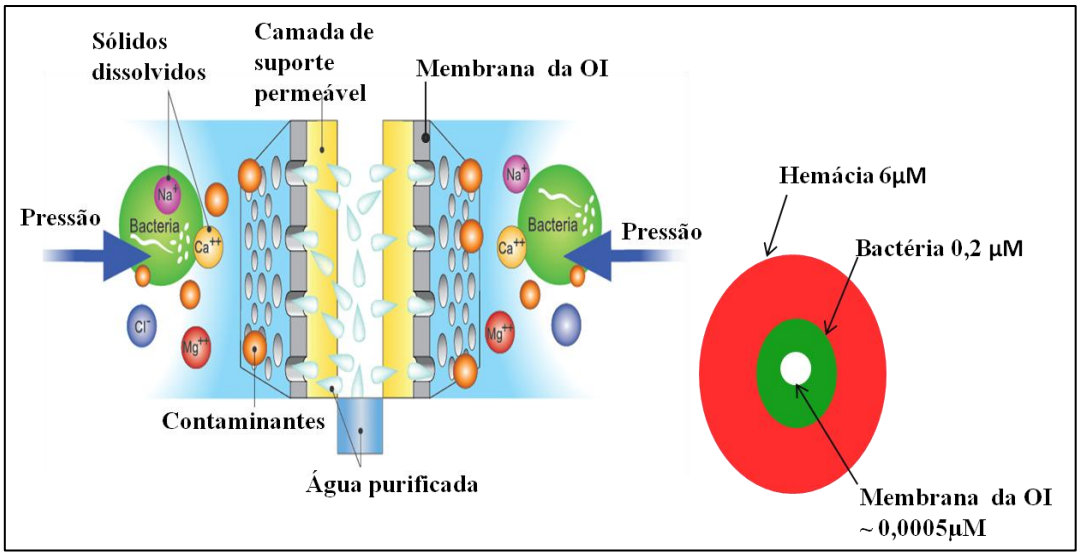

Figura 1.5 – Fluxograma do processo de osmose inversa.
Fonte: Modificado de http://www.desalite.com/detail/artikel/mengenal-lebih-jauh-reverse-osmosis

O processo de OI retém de 95 a 99% dos contaminantes químicos e biológicos da água, sendo principalmente utilizada para a remoção de bactérias, fungos, algas e vírus, e até o momento, é o método mais recomendado. Como processo final, a água sofre ação da luz ultravioleta com esterilização final, antes de ser utilizada em soluções (Leme & Silva, 2003).

Substâncias como cloro, cloraminas, pH da água, desinfetantes e bactérias presentes na água possuem o potencial de destruição da membrana (Ahmad, 2005). Podem ocorrer falhas no sistema, como a ruptura da membrana ou problemas no sistema de vedação, permitindo a passagem de contaminantes para água purificada (Fujioka *et al.*, 2018; Fujioka *et al.*, 2019). É recomendado o monitoramento da resistividade da água permeada pela OI, pois a se houver a presença de íons na água a condutividade elétrica deve aumentar, uma vez que a água pura é altamente resistente à corrente elétrica (Ahmad, 2005).

1.2.3 Reservatório

A água tratada pela OI deve ser armazenada em um tanque de material opaco, liso, impermeável, hermeticamente fechado e com fundo cônico. Não pode haver incidência direta de luz no tanque e deve ser de fácil acesso para inspeção, limpeza e desinfecção Este tanque deve possuir sistema automático de entrada de água, sistema fechado de recirculação contínua de água por 24 horas com regime turbulento e retorno do *loop* de

distribuição ao tanque, durante o funcionamento de todas as máquinas de diálise (RCD 11, 2014). A água deve estar sempre em circulação para prevenir a formação de biofilme (Silva *et al.,* 1996).

1.2.4 Distribuição

A distribuição da água purificada pode ocorrer de dois modos, sistema de alimentação direta ou indireta. O sistema de alimentação direta: a água purificada sai do sistema de OI e passa através de um filtro de endotoxina antes de prosseguir para o circuito de distribuição projetado para fornecer água purificada aos vários pontos de uso. A água purificada não utilizada é devolvida através do circuito para a entrada da bomba do sistema para ser reciclada novamente pela OI. O sistema indireto: a água purificada que sai do sistema de OI entra em um tanque de retenção especialmente projetado equipado com dispositivos de controle de nível de água. Estes dispositivos interagem com o sistema de OI, desligando-o e ligando automaticamente conforme a necessidade do nível de água apropriado. O tanque não deve ficar seco ou sobrecarregado. A água purificada no tanque de retenção é pressurizada pela bomba de reforço de distribuição, que direciona a água purificada para o filtro de endotoxina até as salas de distribuição da clínica. No sistema indireto a água não utilizada é devolvida para o tanque de retenção (Kasparek & Rodriguez, 2015).

1.2.5 Desinfecção do sistema de água para hemodiálise

A limpeza e desinfecção do sistema de distribuição e armazenamento da água para hemodiálise devem ser realizadas mensalmente como norma estabelecida pela RDC 11, 2014. A desinfecção pode ser física, utilizando irradiadores ultravioletas e água quente e/ou, por agentes químicos, como hipocloritos, ácido peracético, dióxido de cloro, formaldeído e ozônio (Cappelli *et al.,* 2006; Rutala & Weber, 2008; Gaibor *et al.,* 2019).

O agente desinfetante pode causar rachaduras na superfície das tubulações, tornando a limpeza da tubulação mais difícil e aumentando a necessidade de manutenção com custos maiores. Desinfetantes químicos apresentam como riscos, resíduos tóxicos que

podem ficar aderidos às paredes dos dispositivos de distribuição e armazenamento da água (Cappelli *et al.,* 2006).

O uso do ozônio tem sido considerado uma alternativa para desinfecção do sistema de tratamento de água para hemodiálise, pois apresenta como vantagem atividade bactericida, remoção de biofilmes e degradação de endotoxinas. A desvantagem associada ao uso do ozônio é devido à incompatibilidade com alguns materiais das tubulações, como por exemplo, o PVC. O ozônio possui alto poder oxidante e por isso, não é recomendado na desinfecção da OI, pois pode comprometer a estrutura das membranas (Tarrass *et al.,* 2010; Amato *et al.,* 2013).

Suman *et al.* (2013) demonstraram que concentrações subinibitórias de cloro em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter sp.* aumentaram a formação de biofilme. Enquanto que no estudo de Toté *et al.* (2010) o hipoclorito de sódio foi eficaz na remoção da massa e da matriz do biofilme em *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, os autores evidenciam a falta de padronização metodológica para avaliar biocidas e a susceptibilidade à biofilmes. O hipoclorito de sódio foi efetivo na concentração de 500 ppm (Borges *et al.,* 2007) porém, esta concentração possui alto poder corrosivo, sendo necessário o enxague do sistema após 30 minutos de exposição ao cloro (Silva *et al.,* 1996).

O abastecimento de água pública utiliza a cloração para redução dos microrganismos na água, porém da origem aos compostos organoclorados, como exemplo os trihalometanos que são cancerígenos, a concentração destes subprodutos é regulada na água potável. Diante disso, o tratamento de água para hemodiálise remove esses compostos com a ação do filtro de carvão ativado, que deve ser realiza antes da OI para não sobrecarregar as membranas (Cappelli & Inguaggiato, 2004).

O excesso de cloro no dialisato é nocivo aos pacientes, casos de surtos por cloraminas foram relatados por de Oliveira *et al.,* (2009), em que o problema foi solucionado com a troca dos filtros de carvão e por Calderaro & Heller, (2001) pela falta do enxague adequado após a desinfecção por cloro no tanque de armazenamento de água.

O formaldeído é um desinfetante eficaz na maioria das espécies bacterianas, exceto em espécies de micobactérias. O uso do formaldeído gera uma fumaça irritante, que pode

apresentar risco a saúde dos funcionários quando a concentração no ar exceder limites de segurança (Tang *et al.,* 2009).

O ácido peracético é amplamente utilizado na desinfecção no sistema de tratamento de água e no reaproveitamento dos deslizadores para a hemodiálise (Cappelli *et al.,* 2006; Edens *et al.,* 2017). A decomposição deste desinfetante gera ácido acético, água, oxigênio e peróxido de hidrogênio que não apresentam toxicidade ao meio ambiente (Tomazelli & Santos, 2000). O ácido peracético é eficiente no controle de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (Svidzinski *et al.,* 2007) e, também foi eficaz na remoção de biofilmes formados por isolados de *Candida sp* do sistema de distribuição de água para hemodiálise (Pires et al., 2013). Quando comparado ao cloro possui maior eficiência na remoção de biofilme em tubulações de água para hemodiálise (Isakozawa *et al.,* 2016).

Em relação aos agentes físicos, a água quente pode danificar materiais plásticos, porém, tem sido sugerida como tratamento eficaz na eliminação bacteriana nos sistemas de água para hemodiálise. A radiação UV possui efeito bactericida, porém, não é eficaz na eliminação de endotoxinas e sua eficiência depende da pureza da água, do tempo e do fluxo de exposição e sua vida útil diminui com o tempo de uso (Cappelli *et al.,* 2006; Gaibor *et al.,* 2019).

1.3. Legislação brasileira e internacional referente a qualidade de água destinada a hemodiálise

No Brasil é a Portaria de n° 2.914 de 2011 que estabelece procedimentos de controle e de vigilância da qualidade de água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Nesta portaria, o controle microbiológico é realizado pelo monitoramento de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*. Além destes parâmetros microbiológicos, prevê-se o monitoramento de cianobactérias tóxicas e a concentração de cianotoxinas livres na água de consumo humano, sendo a concentração de 1 $\mu g\ L^{-1}$ para microcistinas, cilindropermopsinas e 3$\mu g\ L^{-1}$ para as saxitoxinas. Em caso de presença de cianotoxinas na saída do tratamento, é obrigatória à comunicação imediata às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis. A RDC n° 11, de março de 2014, estabelece requisitos de boas práticas de funcionamento de unidades de serviço de

hemodiálise e concentrações limites como parâmetros da qualidade da água de diálise (tabela 1.1).

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency - EPA*) regula todos os sistemas que atendam 500 ou mais domicílios, e suas leis requerem estrita aderência ao *Safe Drinking Water Act* (EPA, 2012). Esta lei refere o nível máximo permitido de contaminantes na água potável (tabela 1). Já os padrões para água destinados a hemodiálise são estabelecidos pela *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI). O Brasil utiliza os parâmetros estabelecidos pela AAMI como base para a criação da RDC, não havendo diferenças significativas nos parâmetros químicos.

Em relação aos padrões microbiológicos da água de diálise e dialisato a RDC 11, 2014 estabelece: A concentração permitida de endotoxinas de 0,25 a 0,5 ng/mL; Ausência de coliformes totais/ 100 mL; Avaliação de bactérias heterotróficas totais, sendo permitidos valores abaixo de 100 UFC/mL para a água tratada de diálise, 200 UFC/mL no dialisato e de 50 UFC/mL para o nível de ação. Ao comparar a legislação brasileira com a legislação internacional, é possível verificar que em alguns países, os parâmetros microbiológicos são mais exigentes. Por exemplo, a Sociedade Japonesa de terapia de diálise e as diretrizes de melhores práticas europeias estabelecem que as BHT (Bactérias heterotróficas totais) devem estar menores que 100 UFC/mL e o nível de máximo de endotoxina de 0,05 EU/mL e 0,25 EU/mL, respectivamente.

Tabela 1.1 - Padrão de qualidade da água para hemodiálise

Contaminante	EPA - Máximo para água potável (mg/L) (Lista Condensada)	Portaria de n° 2.914 de 2011 Máximo para água potável (mg/L) (Lista Condensada)	AAMI - Concentração máxima para Água de Hemodiálise (mg/L)	RDC 11 de 2014 - Concentração máxima para Água de Hemodiálise (mg/L)
Cálcio	Não Regulado	Não Regulado	2 (0.1 mEq/L)	2,000
Magnésio	Não Regulado	Não Regulado	4 (0.3 mEq/L)	4,000
Potássio	Não Regulado	Não Regulado	8 (0.2 mEq/L)	8,000
Sódio	Não Regulado	200,000	70 (3.0 mEq/L)	70,000
Antimônio	0,006	0,005	0,006	0,006
Arsênio	0,005	0,010	0,050	0,005
Bário	2,000	0,700	0,100	0,100
Berílio	0,004	Não Regulado	0,0004	0,0004
Cádmio	0,005	0,005	0,001	0,001
Cromo	0,100	0,050	0,014	0,014
Chumbo	0,015	0,010	0,005	0,005
Mercúrio	0,002	0,001	0,0002	0,0002
Selênio	0,050	0,010	0,090	0,09
Prata	0,100	Não Regulado	0,005	0,005
Alumínio	0,05 a 0,2	0,200	0,010	0,010
Cloramina	4,000*	4,00	0,100	Não Regulado
Cloro Livre	4,00*	≤0,4 a 6 (valor dependente de pH)	0,500	0,1000 (total)
Bronze	1,300**	Não Regulado	0,100	Não Regulado
Fluoreto	2,0* a 4,0	1,500	0,200	0,200
Nitrato (como Nitrogênio)	10,000	10,000	2,000	2,000
Sulfato	250,000*	250,000	100,000	100,000
Tálio	0,002	Não Regulado	0,002	0,002
Zinco	5,000*	5,000	0,100	0,100

1.4. Problemas associados à hemodiálise

A água de diálise contaminada pode apresentar inúmeros problemas à saúde do paciente, podendo levar à anemia, alterações na pressão arterial, equilíbrio ácido-base sanguíneo, problemas neurológicos e doença ósseas. Os possíveis sintomas clínicos com o uso da água inadequadamente purificada ou dialisado contaminado são mostrados na tabela 1.2. Os principais contaminantes são substâncias químicas, microrganismos e toxinas (Amato, 2013).

Tabela 1.2 - Sinais e sintomas relacionados a possíveis contaminantes presentes na água para hemodiálise

Sinais e sintomas	Possíveis Contaminantes
Anemia	Alumínio, cloraminas, cobre e zinco
Doença Óssea	Alumínio e flúor
Hemólise	Cloraminas , cobre e nitratos
Hipertensão	Cálcio e sódio
Hipotensão	Bactérias, endotoxinas e nitratos
Acidose metabólica	pH baixo e sulfatos
Fraqueza muscular	Cálcio e magnésio
Náuseas, vômitos	Bactérias, cálcio, cobre, endotoxinas, pH baixo, magnésio, nitratos, sulfato e zinco
Deterioração neurológica e encefalopatia	Alumínio

Há vários relatos de morte e prejuízos à saúde de pacientes associados ao tratamento inadequado da água para diálise, como exemplo, a contaminação por cloro e cloraminas na água utilizada no reprocessamento de capilares, acarretando surto de reações hemolíticas em 16 pacientes em um hospital em Minas Gerais. A contaminação ocorreu durante o processo de desinfecção por hipoclorito e não houve o enxague correto do sistema durante uma reforma no hospital (Calderaro & Heller, 2001).

Na cidade de Caruaru (PE), no ano de 1996 mais de 50 pessoas vieram a óbito em tratamento de hemodiálise devido à utilização de água contaminada por cianotoxinas. A cianotoxina encontrada foi a microcistina–LR, que possui efeito hepatotóxico e apresenta uma ação mais potente quando aplicada diretamente na corrente sanguínea, do que quando ingerida. No ano de 2001, Hilborn *et al.*, (2013) relataram um caso de contaminação do dialisato por microcistinas no estado do Rio de Janeiro. A contaminação se originou de florações tóxicas de cianobactérias em reservatórios de água de captação, que servem de abastecimento para as clínicas de diálise. O tratamento

de água realizado pelas unidades de diálise do Rio de Janeiro estudados por Hilborn *et al.,* (2013) e Soares *et al.,* (2006) não foram eficientes na remoção da toxina, assim produzindo água contaminada para a produção do dialisato. Neste caso, foi detectada a concentração de 0,4 µg/L de MC na água potável e uma concentração média de 0,33 ng/mL no soro sanguíneo de pacientes dialíticos expostos.

1.4.1 Bactérias associadas à hemodiálise

O procedimento de hemodiálise é realizado por um acesso vascular, que acaba expondo o paciente a contaminações por microorganismos que podem estar presentes na pele, cateter (equipo de acesso vascular), equipamentos de diálise e também na solução do dialisato (Bugno *et al.,* 2007; Buzzo *et al.,* 2010; Esmanhoto *et al.,* 2013; Chandra *et al.,* 2016.). As infecções são a causa mais frequente de reinternações e também a segunda causa de morte entre os pacientes crônicos em tratamento por hemodiálise (Jaber, 2005).

Dentre os microorganismos responsáveis pelas infecções sanguíneas aos pacientes hemodialíticos, o *Staphylococcus aureus* é a causa mais frequente, o que pode estar associado ao uso do catetere venoso. Esta bactéria é classificada como Gram positiva, faz parte da microbiota da pele humana e também possuem a capacidade de colonizar o cateter e formar biofilmes (Dasgupta, 2002; Esmanhoto *et al*., 2013; Isidre *et al.,* 2017). A pele humana é considerada a principal fonte de contaminação por *S. aureus*. As bactérias presentes na pele podem migrar ao longo da superfície, colonizando a extremidade distal, resultando em infecções. Além disso, estes microrganismos podem colonizar a parte interna do cateter, onde podem permanecer aderidos à superfície e formar biofilmes, e assim, permitir a infecção local e a disseminação hematogênica (Saxena *et al.,* 2005; Grothe *et al.,* 2010).

O segundo grupo mais importante no desenvolvimento de infecções sanguíneas são as bactérias Gram negativas, principalmente o grupo das bactérias Gram Negativas Não Fermentadoras (BGNNF). Este grupo é caracterizado por não fermentar glicose, utilizando-a apenas na via oxidativa, são aeróbicas obrigatórias, não esporuladas, possuem baixas exigências nutricionais, são capazes de sobreviver por períodos extensos e podem se multiplicar em ambientes aquosos, termotolerantes, são bactérias ambientais e também altamente produtoras de endotoxinas (Koneman *et al.,* 2008; Esmanhoto *et al.,* 2013). Os principais gêneros frequentemente encontrados nas águas

destinada a hemodiálise são as *Pseudomonas sp., Acinetobacter sp., Burkholderia sp., Rlastonia sp. e Stenotrophomonas sp*. (Morin, 2000; Arvanitidou, 2003; Bugno *et al.*, 2007; Montanari *et al.*, 2009; Peresi *et al.*, 2011; Al-Naseri *et al.*, 2013; Vincenti *et al.*, 2014; Coulliete & Ardunino, 2013; Okunola & Olaitan, 2015; Rafee *et al.*, 2016 e Ortiz & Rios-González, 2017), sendo considerados patógenos oportunistas em ambientes hospitalares, provocando infecções principalmente em pacientes nefropatas crônicos em hemodiálise (Esmanhoto *et al.*, 2013).

As *Enterobactérias* também aparecem como um grupo causador de bacteremias em pacientes dialíticos. Este grupo é classificado como bacilos Gram negativos fermentadores de glicose, oxidase negativa e catalase positiva, anaeróbios facultativos e não formadoras de esporos. Crescem bem em ágar MacConkey, pois não são inibidos pelos sais biliares presentes no meio. A família contém mais de 40 gêneros, os principais de importância médica são *Escherichia sp, Enterobacter sp, Klebsiella sp.* entre outros, sendo também encontrados como contaminantes na água destinada a hemodiálise (Murray *et al.*, 2000; Braimoh *et al.*, 2014*;* Rafee *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2016; Jamil *et al.*, 2016; Kaarup *et al.*, 2016).

Embora as infecções por bactérias Gram positivas em pacientes em hemodiálise seja a mais frequente, são as Gram negativas que apresentam maior mortalidade, pois apresentam maiores taxas de resistência a antimicrobianos, especialmente as espécies *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacea, Acinetobacter, Enterobacter spp, Klebsiella spp., Serratia spp e Escherichia coli* (Esmanhoto *et al.*, 2013).

Existem poucos estudos na literatura referente à resistência aos antimicrobianos em bactérias presente na água destinada a hemodiálise. A pesquisa realizada por Paresi *et al.*, (2011) em oito unidades de terapia renal de quatro municípios de São Paulo, isolaram 38 cepas de *Pseudomonas sp.* em amostras de água tratadas para diálise, destas uma foi classificada com resistência intermediária a gentamicina e outra bactéria com resistência a aztreonam e ticarcilina/ácido clavulânico. Vicenti *et al.*, (2014) pesquisaram a presença de BGNNF em amostras de água provenientes de vários ambientes hospitalares, inclusive em unidade de hemodiálise. A bactéria de maior prevalência foi a *P. aeruginosa*, porém considerando apenas as amostras provenientes de UH foram detectados 12 cepas de *Ralstonia pickettii* resistentes a colistina, imipenem, cefepima e ciprofloxacina, 11 cepas de *P. fluorescens* com quatro cepas

multirresistentes, cinco de *P. aeruginosa* em que nenhuma apresentou resistência e quatro de *S. maltophilia,* sendo duas consideradas multirresistentes. O estudo não discriminou apenas os isolados provenientes de UH ao apresentar os resultados em relação as resistência de quais antimicrobianos. Oumokhtar *et al.,* (2013) realizaram um estudo em um centro de hemodiálise no Marrocos, e encontraram a presença de *Pseudomonas sp, Ochrobactrum antropi* e *Burkholderia cepacia* em amostras de água de hemodiálise, das 37 cepas de *Pseudomonas sp* isoladas, 80% foram resistentes à tetraciclina e co-trimoxazol, 30% à ceftazidima e não foi observada resistência à colistina e imipenem. Há evidências crescentes de que genes de resistência a antimicrobianos em organismos patogênicos surgiram no ambiente (Wright, 2010) sendo assim é necessário à investigação a resistência antimicrobiana desses organismos em ambientes aquáticos a fim de estabelecer padrões de vigilância à saúde.

1.4.2 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de ação nas bactérias. Os antimicrobianos podem agir das seguintes formas:

Inibição da síntese da parede celular (figura 1.6 A), como por exemplo, os β-lactêmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos) e os glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). Os β-lactâmicos atuam inibindo a síntese da camada do peptidioglicano, principal constituinte da parece celular bacteriana. Isto ocorre devido o anel β-lactâmamico imitar porção D-alanil D-alanina da cadeia peptídica da bactéria. A porção D-alanil D-alanina funciona como substrato para a atividade da transpeptidase, processo responsável pelo fortalecimento da parede celular. Assim, ocorre a ruptura da camada de peptidoglicano e como consequência à lise da bactéria. A vancomicina atua na inibição da ligação entre a subunidade D-alanil ao PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) e, assim inibe a síntese da parede celular (Hooper, 2001; Tenover, 2006; Kapoor *et al.,* 2017).

Interferências nas propriedades da membrana celular do microrganismo (figura 1.6 B). Exemplos, as polimixinas se ligam a porção lipídica do lipopolissacarídeo da membrana celular bacteriana causando a desintegração da membrana (Falagas *et al.,* 2010). A daptomicina causa a despolarização da membrana e leva a morte celular (Tenover, 2006).

Inibição da síntese proteica, realizada pela ação dos antimicrobianos nas subunidades 30s e 50s do RNA ribossômico (RNAr) e do RNA transportador (RNAt) das bactérias (figura 1.6 C). Assim como, os aminoglicosídeos (exemplos; gentamicina, tobramicina e amicacina) que interagem com o RNAr 16S da subunidade 30S por meio de ligações de hidrogênio. As tetraciclinas (exemplos; tetraciclina, clortetraciclina, e minociclina), atuam no RNAr 16S da subunidade ribossômica 30S para impedir a ligação do RNAt. Os macrolideos (azitromicina, eritromicina, espiramicina e miocamicina) se ligam a subunidade 50S do ribossomo e impedem as reações de transpeptidação e translocação. O clorafenicol se liga à subunidade 50S do RNAr 16S e impede a ligação do RNAt ao ribossomo e assim impedindo a síntese de proteínas. A oxazolidinona é um antimicrobiano sintético que inibe a síntese proteica por meio da ligação do RNAr da subunidade 50S, suprime a inibi o 70S e interagem com o RNAt (Anvisa, 2007; Etebu & Arikekpar, 2016; Kapoor *et al.,* 2017).

Inibição da síntese dos ácidos nucleicos, que podem agir no processo de replicação e/ou transcrição bacteriana (figura 1.6 D). As fluoroquinolonas (exemplos; levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e gemifloxacina) inibem a enzima DNA girase e quebra as fitas duplas do DNA bacteriano durante a replicação (Hooper, 2001; Tenover, 2006; Kapoor *et al.,* 2017). Os nitroimidazólicos, o metronidazol é principal representante, apresentam um grupo nitro que age como receptor de elétrons, assim libera compostos tóxicos e radicais livres que atuam na inativação do DNA (Anvisa, 2007).

Inibição da síntese de metabolitos essenciais (figura 1.6 E), como exemplo, a ação das sulfonamidas (exemplos; sulfadiazina e sulfametoxazol) e o trimetoprim que bloqueiam o caminho para a síntese de ácido fólico, e assim inibe a síntese de DNA. As sulfonamidas e o trimetoprim atuam de forma sinérgica, as sulfonamidas inibem a di-hidropteroato sintase e o trimetoprim age em um estágio posterior da síntese de ácido fólico e inibe a enzima diidrofolato redutase (Tenover, 2006; Anvisa, 2007; Kapoor *et al.,* 2017).

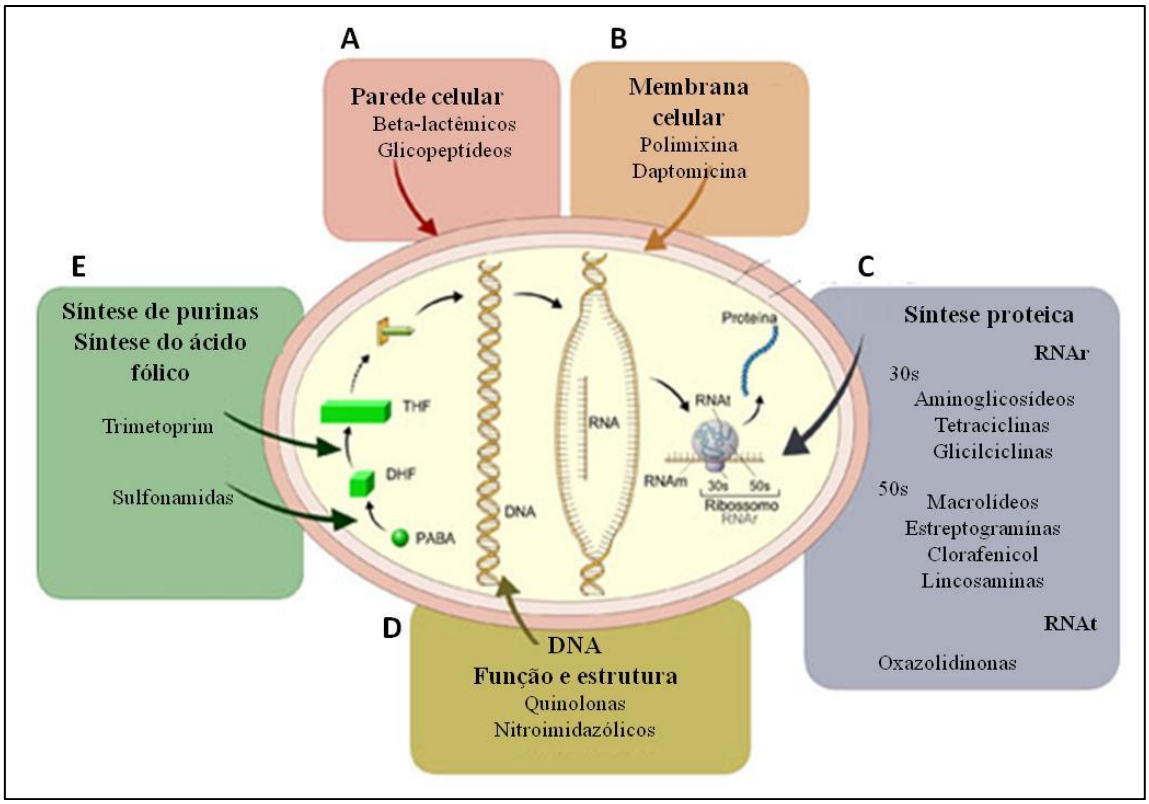

Figura 1.6 – Mecanismo de ação dos antimicrobianos.
Fonte: Modificado de Anvisa, 2007.

1.4.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos ocorre pela produção de enzimas inativadoras ou por mecanismos não enzimáticos. As bactérias podem apresentar resistência intrínseca, relacionada a propriedades físico-químicas bacteriana em resposta a exposição aos antimicrobianos sem que haja alteração genética. Exemplo de resistência intrínseca é a capacidade de bactérias Gram-negativas serem resistentes a diversos antimicrobianos devido à incapacidade desses agentes de atravessar a membrana externa. Este caso é evidenciado pela ação da vancomicina que age inibindo a reticulação de peptidoglicanos, geralmente eficiente em bactérias Gram positivas, porém não indicadas para bactérias Gram-negativas, pois não consegue ultrapassar a barreira externa e acessar esses peptídeos no periplasma (Wright, 2011; Blair *et al.*, 2015; Rhodes & Schweize, 2016).

A resistência adquirida é a aquisição de uma nova característica que atua contra o antimicrobiano. Os mecanismos que contribuem para a resistência aos antimicrobianos nas bactérias podem ser via conjugação plasmidial, transdução por bacteriófago, transformação por DNA livre no meio externo e mutação no DNA cromossômico

(figura 1.7) (Alekshun & Levy, 2007; Ruppé *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2016; Rhodes & Schweize, 2016).

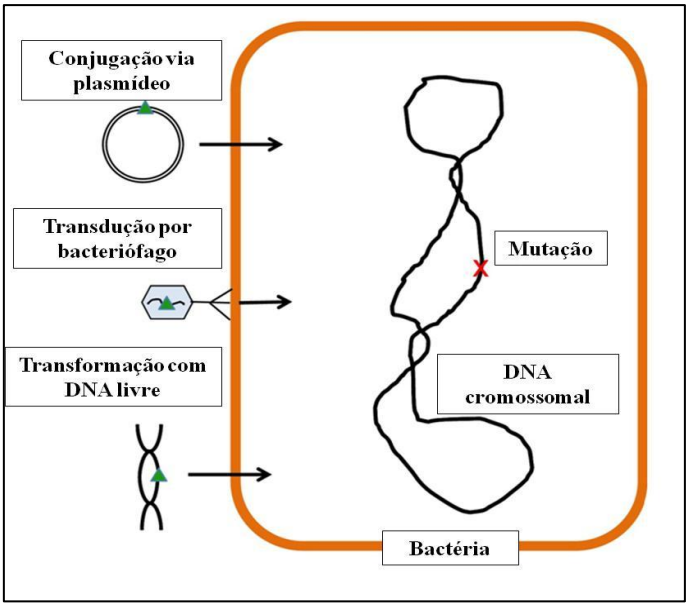

Figura 1.7 - Mecanismos que contribuem para a resistência adquirida a antimicrobianos em bactérias.
Fonte: Adaptado de Rhodes & Schweize, (2016).

A resistência bacteriana pode se desenvolver por diversos mecanismos que altera a ação dos antimicrobianos, tais como; bomba de efluxo; redução da captação do antimicrobiano; sequestro do fármaco por proteínas específicas; superprodução do substrato alvo de antimicrobiano via aumento da transcrição ou multiplicação de genes; mecanismo *bypass*, metabolismo de substituição de um alvo suscetível por um alvo resistente; por mutação ou modificação enzimática por transferência de grupo e inativação por clivagem ou modificação química (figura 1.8). Quaisquer destes mecanismos apresentam desafios para escolha do antimicrobiano ao tratamento da infecção (Rhodes & Schweize, 2016).

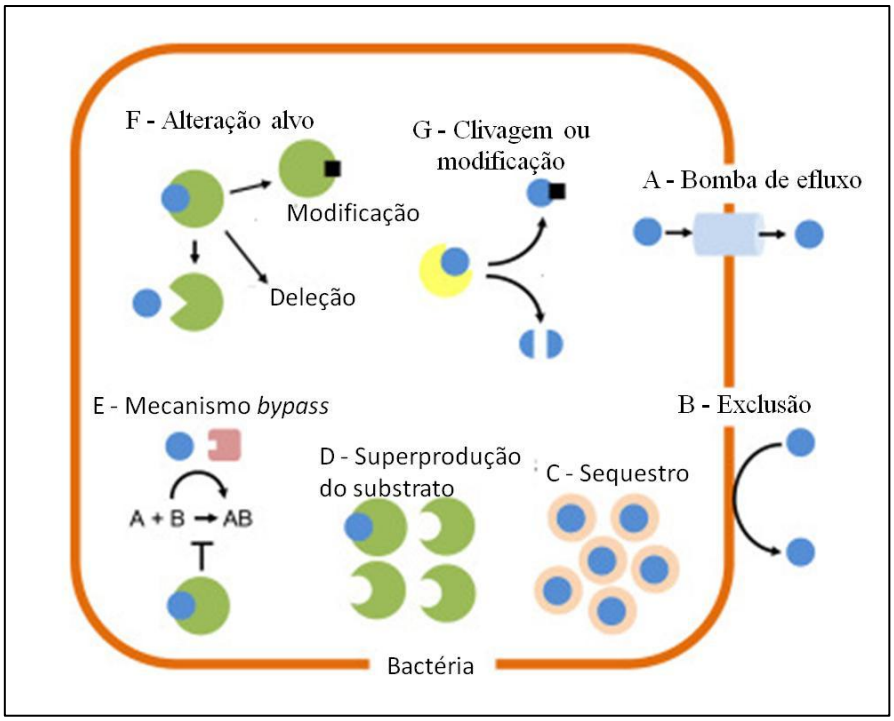

Figura 1.8 - Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos.
Fonte: Fonte: Adaptado de Rhodes & Schweize, (2016).

Os mecanismos de defesa aos antimicrobianos não estão amplamente descritos entre as espécies de BGNNF, estudos presentes na literatura evidenciam as características de resistência das espécies *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias do *complexo Burkholderia* e *Acinetobacter baumannii* (McGowan, 2006; Enoch *et al.*, 2007; Schweizer, 2012; Ruppé *et al.*, 2015; Rhodes & Schweize, 2016; Bassetti *et al.*, 2018).

As bombas de efluxo, localizadas na membrana citoplasmática, funcionam para transportar de forma ativa os antimicrobianos antes que estes atinjam os seus objetivos de destruir a bactéria. A bomba de efluxo pode ser específica ao apresentar afinidade a um amplo espectro de fármacos (Blair *et al.*, 2015; Kapoor *et al.*, 2017). A super-expressão de múltiplas bombas de efluxo foram descritas para *A. baumannii*, regulada por diversos genes sendo alguns ainda desconhecidos. A super-expressão das bombas aumentou a resistência a antimicrobianos como as fluoroquinolonas e cloranfenicol (Geisinger *et al.*, 2019). Espécies do complexo *Burkholderia* também apresentam diversos genes associados à bomba de efluxo, sendo a expressão do AmrAB-OprA responsável por conferir resistência intrínseca aos aminoglicosídeos e macrólidos (Rhodes & Schweize, 2016).

As moléculas dos antimicrobianos podem ter acesso às bactérias por difusão mediada por porinas, pela bicamada da membrana ou por auto-absorção. No caso das bactérias Gram negativas a entrada do fármaco ocorre por porinas na membrana externa, como o caso de β-lactâmicos e quinolonas. A diminuição de porinas leva a diminuição da entrada do antimicrobiano na bactéria caracterizando um mecanismo de resistência. Em bactérias como *Pseudomonas sp*. e *Acinetobacter sp* a diminuição da expressão de porinas leva a resistência a medicamentos mais novos, exemplos os carbapenêmicos e cefalosporinas, em que normalmente a resistência é mediada pela degradação enzimática (McGowan, 2006; Blair *et al.*, 2015; Kapoor *et al.*, 2017).

Algumas bactérias apresentam enzimas ß-lactamases capazes de hidrolisar o anel ß-lactâmico e assim inibir a atividade do fármaco, conferindo resistência, por exemplo, as penicilinas, cefalosporinas, monobactamas e carbapenêmicos. A capacidade de produzir ß-lactamases pode ser de maneira intrínseca ou adquirida. Foram descritos β-lactamases adquiridas e intrínsecas em *A. baumannii* (AmpC cromossômica, OXA-51) (Zhang *et al.*, 2013*)*, em *B. cepacia* (PenA e PenB) *(*Abbott & Peleg, 2015).

Casos de infecção por BGNNF vêm mostrando importância epidemiológica como patógenos oportunistas emergentes, principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido (Deliberali *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2014; Ryan & Pembroke, 2018). Muitas espécies de BGNNF apresentam resistência intrínseca a múltiplos antimicrobianos e a capacidade de adquirir mecanismos de resistência adicionais. Apresentam como mecanismos de resistência a superprodução de beta-lactamases intrínsecos, hiperexpressão de bombas de efluxo, modificações de alvo e alterações de permeabilidade. Infecções por essas bactérias, principalmente em ambiente hospitalar, representam um desafio na escolha medicamentosa. Opções de antimicrobianos para tratamento de infecções por BGNNF resistentes a carbapenemicos são escassas e a crescente resistência à colistina demonstra a urgência de novos antimicrobianos (Enoch *et al.*, 2007; Ruppé *et al.*, 2015; Agarwal *et al.*, 2017).

1.4.4 *Ralstonia*

A *Ralstonia pickettii* foi descrita inicialmente como *Pseudomonas pickettii* (Verschraegen *et al.*, 1985). Depois foi reclassificada ao gênero *Burkholderia* e em 1995 foi criado o gênero *Ralstonia*, em homenagem a E. Ralston, primeiro cientista que a descreveu (Yabuuchi *et al.* 1995). Este grupo é composto por bactérias Gram negativas não fermentadoras, aeróbicas, catalase e oxidase positiva (Ryan *et al.*, 2011; Ryan & Adley, 2014).

Atualmente estão descritas 18 espécies neste gênero (http://www.bacterio.net/ralstonia.html), geralmente isoladas da água e solo, apresentam baixa virulência, porém nos últimos anos têm se tornado um patógeno oportunista emergente (Ryan & Adley, 2014). Dentre estas, a *R. pickettii* é a espécie mais prevalente associada a vários casos de infecção em pacientes com sistema imunológico comprometido (Chen *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2017; Nasir *et al.*, 2019; Thet *et al.*, 2019) e, as espécies de *R. mannitolilytica* (Owusu *et al.*, 2019) e *R. insidiosa* (Fang *et al.*, 2019) também foram descritas como causas de bacteremias.

As infecções por *Ralstonia* têm sido relatadas com maior frequencia em pacientes com doença renal crônica em tratamento hemodialítico (Tejera *et al.*, 2016; Shankar *et al.*, 2018; Thet *et al.*, 2019) e pacientes com fibrose cística (Perry *et al.*, 2015; Green *et al.*, 2017; Prior *et al.*, 2017). Foram descritos diversos sintomas, desde assintomático, bacteremia, sepse, endocardite a alguns casos que evoluíram ao óbito (Orme *et al.*, 2015).

As metodologias convencionais de identificação bacteriana em amostras clínicas não são eficientes na detecção de *Ralstonia sp.*. As bactérias do complexo *Burkholderia cepacea*, *Pseudomonas* e *Ralstonia* apresentam muitas semelhanças fenotípicas e por métodos de identificação bioquímica podem ser confundidas (Coenye *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2014). O método de identificação de BGNNF mais confiável é o sequenciamento do gene 16S rRNA (Bosshard *et al.*, 2006). A identificação destes microrganismos por MALDI-TOF MS tem sido sugerida, pois o método apresenta uma alternativa precisa e econômica em relação às técnicas moleculares e possui maior precisão na identificação quando comparadas aos métodos bioquímicos (Alby *et al.*, 2013; AbdulWahab *et al.*, 2015; Prior *et al.*, 2017).

O MALDI-TOF é uma técnica que detecta diretamente o perfil de proteínas das bactérias, pelo método de ionização suave que permite a dessorção de peptídeos e proteínas de microrganismos cultivados inteiros. Os íons são separados e detectados de acordo com sua massa e assim é produzido um perfil de picos de íons para cada cepa bacteriana que será comparada ao banco de dados de bactérias e assim determinada a espécie (Ryan *et al.,* 2014).

Os casos de infecção por *Ralstonia* têm sido associados à transmissão pela água em ambientes hospitalares, pois estes microrganismos possuem capacidade de sobreviver e multiplicar em fontes de água com baixo teor de nutrientes, tais como água de alta pureza, frascos de hemocultura, soluções de remédios e no dialisato para hemodiálise (Ryan & Adley, 2014; Chen *et al.,* 2017; Thet *et al.,* 2019). Além disso, a *R. pickettii* possui a capacidade de passar por filtros de 0,45 e 0,2 μm, comumente utilizados para a esterilização da água e por isso a contaminação tem sido associada a fabricação de medicamentos (Ryan *et al.,* 2006). Indivíduos da espécie de *R. picketti* apresentam ampla diversidade de distribuição ambiental e também relacionadas a casos clínicos, porém o estudo de Ryan *et al.* (2011) indica que esta espécie é genotipicamente e fenotipicamente homogênea e não apresentam diferenças significativas entre os isolados ambientais dos isolados clínicos.

A *R. picketti* e *R insidiosa* foram descritas com a capacidade de formação de biofilme (Adley *et al.,* 2005; Dombrowsky *et al.,* 2013; Liu *et al.,* 2014). Dombrowsky *et al.* (2013) relataram o desenvolvimento da fomação de biofilme por *R. pickettii* em tubulações de PVC com passagem de água para diálise, os autores concluíram que o carbono residual da água purificada é suficiente para o desenvolvimento desta bactéria e que o PVC-C é um material inadequado para distribuição de água tratada para diálise. Liu *et al.* (2014) com experimento de formação de biofilme constatou que a *R. insidosa* foi capaz de promover o aumento do biofilme de cepas de *E. coli.* A formação de biofilme por *Ralstonia* pode promover o crescimento de bactérias com maior potencial patogênico, apresentando maior risco de contaminação da água.

A capacidade de produzir biofilme provavelmente garante a estas bactérias à sobrevivência no ambiente, proteção contra o sistema imune do hospedeiro e, ainda contribui para o aumento da resistência aos antimicrobianos e agentes de desinfecção (Brindle *et al.,* 2017; Basso *et al.,* 2019).

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos por *Ralstonia* ainda são desconhecidos. Foram descritos apenas os genes BLA $_{OXA-22}$ responsável por conferir resistência bacteriana às benzilpenicilina, cloxacilina e algumas cefalosporinas e BLA $_{OXA-60}$ que está relacionado à resistência aos carbapenemicos, principalmente o imipenem (Nordmann *et al.,* 2000; Girlich *et al.,* 2006). Não existe uma terapia padronizada para o tratamento de infecções por *Ralstonia*, por isso a necessidade de entender melhor o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos destes organismos. Na tabela 1.3 podem ser vistos os resultados dos testes aos antimicrobianos dos estudos dos últimos anos.

Tabela 1.3 - Perfil de resistência de isolados de clínicos e ambientais de *Ralstonia sp.*

Autor	Origem dos isolados	Teste	Espécies (n)	% de resistência								
				CAZ	CIP	CLO	COL	GEN	IMP	LEV	PIP	PIT
Gales *et al.*, 2005	Clínico	MIC	*R. picketti* (16)	65% R	12,5% R				6,3% R	6,3% R		6,3% R
Sader & Jones, 2005	Clínico	MIC	*R. picketti* (39)	35,9% R				59% R	5,1% R	5,1% R	10,3% R	7,7% R
Ryan e Adley, 2014	Clínico e ambiental	MIC	*R. picketti* (53)	9,4 R				99,9% R			2% R	
			R. insidiosa (15)	S				100% R			S	
		Disco	*R. picketti* (53)	9%				91% R			S	
			R. insidiosa(15)					93% R			S	
Vicente et al., 2014	Ambiental	Disco	*R. picketti* (16)	S	R		R		R			
Tejera *et al.*, 2016	Clinico e ambiental	MIC	R. picketti (1)	R	S			S	S	S		S
Birlutiu *et al.*, 2017	Clínico	-	R. picketti (1)	I	S		R	R	S		S	
Green *et al.*, 2017	Clínico	Disco	*R. mannitolilytica* (14)	92, 8% R		100% R	92,8% R					
Basso *et al.*, 2019	Clínico	MIC	*R. picketti* (01)	R	S			S	S	S	R	R
			R. mannitolilytica (01)	R	S			R	R	S	S	S
Fang *et al.*, 2019	Clínico	MIC	*R. insidiosa* (2)	50% I	S			R	50% R	S		S

Legenda: R: resistente; S: suscetível; I: intermediário. Caz: Ceftazidima; Cip: ciprofloxacin; Clo: clorafenicol; Col: colistina; Gen: gentamicina; Imp: imipenem; Lev: levofloxacin; Pip: piperacilina; Pit: Piperacilina/tozobactam. Teste de antimicrobianos, MIC: Concentração inibitória mínima e Disco, teste por difusão em disco.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA PARA HEMODIÁLISE

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi à avaliação de parâmetros microbiológicos da água e dialisato em quatro unidades de hemodiálise localizadas na região sudeste do Brasil. Foram avaliados os parâmetros físico-químicos: pH, condutividade elétrica, turbidez, alcalinidade, cloro livre concentração dos íons nitrato, fluoreto, cloreto, sulfato, sódio, potássio, cálcio e magnésio. Quantificação de microcistinas e parâmetros microbiológicos: Coliformes totais, bactérias heterotróficas totais (BHT) e o isolamento e identificação de microrganismos em amostras de água pré, pós-tratamento por osmose inversa e dialisato. Os níveis de nitrato, fluoreto e BHT encontrados nas amostras de água podem apresentar risco ao paciente em hemodiálise. Foi identificada a presença de uma amostra de água potável com a presença de microcistinas. Microrganismos foram identificados ao longo do sistema de tratamento de água para hemodiálise, sendo a *Ralstonia sp.* a mais frequente. A presença de bactérias patogênicas emergentes detectadas neste estudo aponta a necessidade do monitoramento microbiológico da água para hemodiálise.

Palavras-chave: Hemodiálise, tratamento de água e dialisato.

2.1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva dos néfrons, resultado de lesões irreversíveis que diminui gradualmente a função renal global. O tratamento recomendável para estes pacientes são os procedimentos de diálise (Guyton & Hall, 1998; Parmar, 2002; Pontoriero *et al.,* 2003). De acordo com os últimos resultados divulgados pela sociedade brasileira de nefrologia (SBN), foi estimado em 2016, mais de 120 mil pacientes com DRC em tratamento dialítico, sendo que nos anos de 2011 a 2016, houve um acréscimo de 31,5 mil pacientes (Sesso *et al.,* 2017).

A hemodiálise é um processo artificial de filtração sanguínea, em que durante o processo, ocorrem trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato (água tratada mais soluções concentradas de eletrólitos, tampão e glicose). Neste processo, são utilizados cerca de 400 litros de água por sessão que dura em média quatro horas, sendo o tratamento normalmente realizado três vezes semanalmente por paciente. A barreira entre o sangue e o dialisato é realizada por uma membrana semipermeável, aos quais contaminantes de baixo peso molecular, presentes na água, podem ter acesso direto à corrente sanguínea como se tivessem sido administradas por injeção endovenosa (Silva *et al.*, 1996; Daugirdas, 2003; Hoenick *et al.*, 2006). Exemplo foi à tragédia em uma clínica em Caruaru, PE, de 1996, que levou a morte de 52 pacientes devido à presença de cianotoxinas na água utilizada na hemodiálise. Um exemplo contundente na relação da qualidade de água e saúde pública.

Os contaminantes microbiológicos podem ser encontrados na água, geralmente sua presença está associada às falhas no sistema de tratamento e distribuição de água para hemodiálise. Entre os mais frequentes, destacam-se as bactérias gram-negativas (Bugno *et al.*, 2007; Koneman *et al.*, 2008; Montanari *et al.*, 2009; Glorieux *et al.*, 2012; Oumokhtar et al., 2013; Okunola & Olaitan, 2016), que podem estar associadas às infecções em pacientes hemodialítico (Strateva *et al.*, 2012; Tejera *et al.*, 2016; Thet *et al.*, 2019).

No Brasil, a RDC 11 de 13 de março de 2014 é a legislação específica que dispõe as concentrações limites, como parâmetros da qualidade da água de diálise. A água que chega aos centros de hemodiálise é proveniente do sistema de abastecimento municipal e deve atender aos padrões de qualidade estabelecidos pela Portaria MS 2914, de 12 de dezembro de 2011 e a RDC N° 11, de 13 de março de 2014 em relação aos padrões de água potável.

Considerando a importância da hemodiálise e a estimativa crescente de novos pacientes hemodialíticos, faz-se necessário o controle da qualidade do tratamento, sendo a água o principal componente, portanto, o objetivo da pesquisa foi a avaliação de parâmetros microbiológicos de água e dialisato em quatro unidades de hemodiálise localizadas na região sudeste do Brasil.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Amostragem

As amostras de água destinadas a procedimentos hemodialíticos foram obtidas de quatro unidades de hemodiálise localizadas na região metropolitana do estado do Espírito Santo. A coleta de água foi realizada em seis pontos da estação de tratamento de água de cada unidade de hemodiálise (figura 2.1). Foram definidos, o ponto 1 (P1): entrada de água de abastecimento potável, o ponto dois (P2): pré-tratamento (após filtro, abrandadores e deionizador) como amostras de água pré-tratamento de osmose inversa (Pré OI), o ponto três (P3): reservatório de água, o ponto quatro (P4): água utilizada na sala de reuso dos capilares, o ponto cinco (P5): Retorno da água tratada para o *loop* e o ponto seis (P6): dialisato que sai da máquina de hemodiálise.

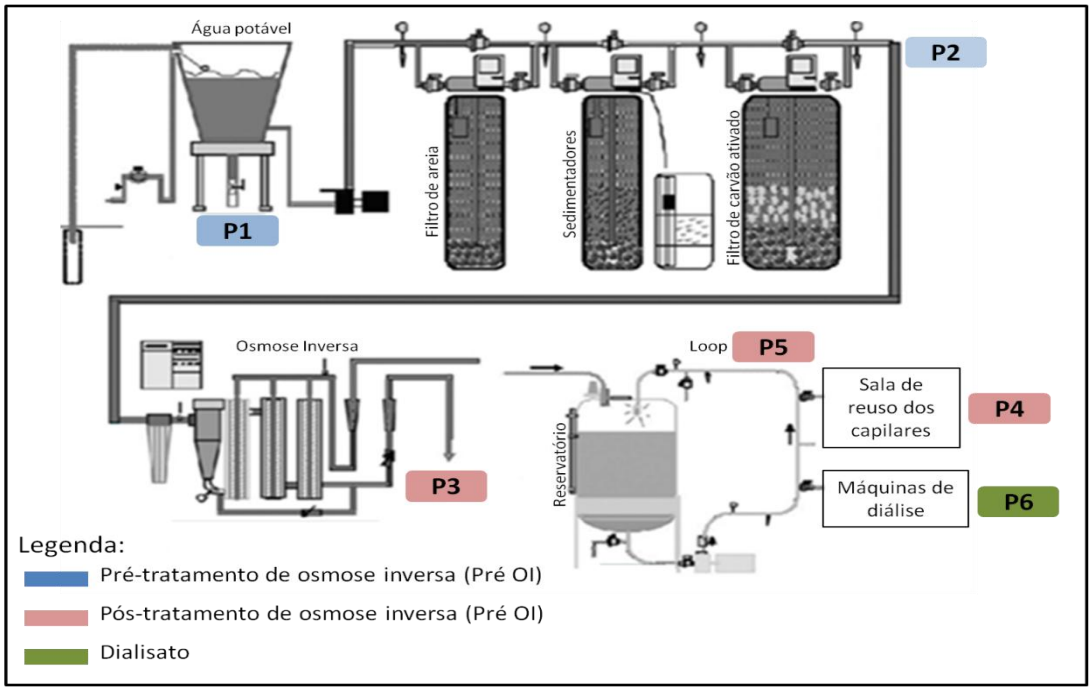

Figura 2. 1 – Representação dos pontos de coleta de água no sistema de tratamento utilizado pelas unidades de hemodiálise.

Foram coletadas 88 amostras de água, sendo 30 amostras de água Pré OI, 63 amostras de água Pós OI e 15 amostras de dialisados dos sistemas de tratamento de água das unidades de hemodiálise nos anos de 2015 a 2017. A unidade de diálise A não possui estrutura física (dispositivo de torneira) para a realização da coleta no ponto do loop (P5).

Todas as amostras foram colhidas assepticamente em fracos de polietileno higienizados para posterior análise de parâmetros físico-químicos e para a análise microbiológica foi

utilizado frasco de vidro âmbar esterilizados. As amostras foram colhidas em duplicatas e mantidas sob-refrigeração até o seu processamento no laboratório (LABSAN-UFES).

2.2.2 Análises de parâmetros físico-químicos

O pH e condutividade elétrica foram medidos utilizando os equipamentos DIGIMED DM22 e CONDUCTIVITY METER- CD850, pelo método Potenciométrico. A turbidez foi determinada pelo equipamento TURBIDÍMETRO HACTCH, pelo método Nefolométrico. A alcalinidade foi realizada seguindo as orientações do método 2320 B, Titulométrico APHA, (2005) e cloro residual realizado pelo kit Hanna®, conforme as orientações do fabricante. A determinação da concentração dos íons nitrato, fluoreto, cloreto, sulfato, sódio, potássio, cálcio e magnésio foram realizados pelo método de cromatografia de íons, no equipamento IC BASIC PLUS 883- METROHM®, com o uso das colunas METROSEP A Supp 5 – 150 x 4.0 mm e METROSEP C 4 – 150 X 4.0 mm, para Ânions e Cátions respectivamente.

2.2.3 Análise de microcistina

A detecção e quantificação de microcistina foram realizadas pelo teste de *Elisa* utilizando-se kit comercial Beacon®, seguindo as recomendações do fabricante.

2.2.4 Análises Microbiológicas

2.2.4.1 Detecção de coliformes totais e Escherichia coli

As análises de coliformes totais e *Escherichia coli* foram realizadas utilizando a técnica de substrato cromo-fluorogênico, com sistema de detecção de presença/ausência (P/A.), conforme metodologia descrita por Cassini *et al.* (2010).

2.2.4.2 Quantificação de bactérias heterotróficas totais (BHT)

A quantificação de bactérias heterotróficas totais (BHT) foi realizada por semeadura de uma alíquota da amostra de água por *pour plate* em meio de cultura ágar caseína, incubada por 48 horas a 35 ± 0,5°C. Após a incubação, foi realizada a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), com o auxílio do equipamento contador de colônias (Phoenix cp 600).

2.4.3 Isolamento e Identificação dos microrganismos isolados

O volume de 5mL de amostra de água foi adicionado à 50 mL de caldo caseína e incubado por até 48 horas a 35 ± 0,5°C e depois com o auxilio de uma alça bacteriológica, foi retirado uma alíquota de 10µL da cultura e semeado em TSA e incubado 35 ± 0,5°C por 48 horas. Os microrganismos que cresceram foram repicados para os meios TSA, MacConkey e Cetrimide por esgotamento, a fim de obter colônias puras para o teste de identificação bioquímica.

A identificação das espécies de microrganismos isolados foi realizada por espectrometria de massa por ionização por dessorção a laser com matriz assistida (MALDI-TOF MS) usando espectrômetro de massa *Microflex LT* e software *Biotyper* 3.3 (*Bruker Daltonics*, Bremen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As infraestruturas do tratamento da água para hemodiálise ficam localizadas no interior das unidades, em um local isolado, de acesso restrito e separado do salão de hemodiálise. O tratamento da água realizado pelas unidades baseia-se no método de OI e tem por objetivo tratar a água potável tornando-a apta para o uso em procedimento hemodialítico, conforme os parâmetros microbiológicos e físico-químicos descritos pela RDC nº 11/2014 (BRASIL, 2014). Além do tratamento de OI, a unidade D possui o tratamento de desinfecção por ozônio no reservatório de água de abastecimento.

2.3.1 Parâmetros físico-químicos de qualidade de água

As amostras de água Pré OI apresentaram pH próximos à neutralidade, turbidez menores que 4 NTU e cloro residual entre 0,5 e 0,2 mg/L, valores de acordo ao padrão de qualidade de água de diálise definido pela RDC 11/2014. A concentração dos íons cloreto, sulfato, sódio, potássio, cálcio e magnésio (tabela 2.1) dissolvidos nas amostras de água pré e pós-tratamento de OI encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela MS 2914/2011 para água potável e RDC 11/2014 para água de hemodiálise.

Tabela 2.1 – Concentração média e desvio padrão de nitrato, fluoreto, cloreto, sulfato, sódio, potássio, cálcio e magnésio pré-tratamento de osmose inversa (Pré) e pós-tratamento de osmose inversa (Pós) nos centros de hemodiálise.

(mg/L)	Unidades de hemodiálise								VMP** (mg/L)	
	A		B		C		D			
	Osmosis inverse									
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	MS 2914	RDC 11
Nitrato	2,49 ± 1,66	0,18 ± 0,12	16,63 ± 14,63	4,29 ± 3,37	23,04 ± 21,03	8,57 ± 7,32	10,7 ± 9,58	0,53 ± 0,46	10	2
Fluoreto	0,67 ± 0,17	0,16 ± 0,13	2,16 ± 1,93	0,22 ± 0,2	2,94 ± 2,62	0,62 ± 0,44	2,47 ± 2,42	0,12 ± 0,08	1,5	0,2
Cloreto	9,36 ± 0,55	0,62 ± 0,38	35,99 ± 34,64	2,64 ± 2,54	46,52 ± 45,20	5,58 ± 5,09	36,5 ± 35,9	0,66 ± 0,48	250	
Sulfato	10,5 ± 3,33	0,61 ± 0,43	30,37 ± 30,11	0,42 ± 0,37	23,22 ± 18,64	0,21 ± 0,13	25,1 ± 22,0	0,15 ± 0,03	250	100
Sódio	7,84 ± 3,02	0,87 ± 0,18	7,89 ± 3,48	1,12 ± 0,21	4,72 ± 3,15	2,02 ± 0,56	4,41 ± 4,30	0,45 ± 0,24	200	70
Potássio	1,69 ± 0,48	0,10 ± 0,08	1,96 ± 0,58	0,09 ± 0,07	1,24 ± 0,86	0,12 ± 0,05	3,28 ± 3,07	0,36 ± 0,20		8
Magnésio	1,13 ± 0,56	0,01 ± 0,01	1,19 ± 0,40	0,04 ± 0,05	0,55 ± 0,53	13,2 5 ± 0,97	0,54 ± 0,53	0,09 ± 0,07		4
Cálcio	4,55 ± 2,29	0,17 ± 0,10	5,21 ± 3,29	0,10 ± 0,09	3,87 ± 2,58	0,08 ± 0,07	2,91 ± 2,22	0,06 ± 0,02		2

Legenda: MS 2914/11 – Ministério da Saúde, Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 para água potável. RDC 11/2014 - Resolução da Diretoria Colegiada n° 11, de 13 de março de 2014, Padrão de qualidade da água para hemodiálise, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. * Valo máximo permitido.

A concentração de nitrato acima do valor permitido para água potável pela MS 2914/2011 foi verificada em amostras de água provenientes das clínicas B, C e D. A maior concentração de nitrato foi de 12 mg/L em amostras de água coletadas na unidade de diálise C. Níveis elevados de nitrato a água potável foram relacionados à complicações de metahemoglobinemia, câncer colorretal, doenças da tireoide e defeitos do tubo neural (Ward *et al.*, 2018). Mesmo em água com nível de nitrato abaixo do recomendado para ingestão, houve relação com a metahemoglobina no sangue (Zeman *et al.*, 2011).

O excesso de nitrato-N na água pós osmose inversa foi verificado nas unidades de diálise B e C (tabela 1) com valores de 2,4 e 4,6 mg/L, respectivamente. As possíveis causas e sintomas relacionados à contaminação da água por nitrato para o paciente hemodialítico são a hipotensão, náuseas, vômitos e diarreia. A concentração de 21mg/L está relacionada à toxicidade ao nitrato à hemodiálise (Amato *et al.*, 2013). Suzuki *et al.* (2019), encontraram níveis de nitrato na água de diálise abaixo dos padrões estabelecidos pela RDC 11/2014 e mesmo assim, o aumento da concentração do nitrato foi associado à anemia em pacientes hemodialíticos.

Em relação ao íon fluoreto, foi verificada a concentração acima do permitido para água potável pela MS2914/2011 em amostras provenientes das clínicas B, C e D. As maiores concentrações de fluoreto foram aproximadamente 6,5 mg/L nas amostras de água pré osmose inversa. Yousefi *et al.*(2019) associaram a concentração de flúor na água potável à pessoas com hipertensão.

Os maiores níveis de fluoreto em amostras de água pós osmose inversa foram encontrados nas unidades de diálise B e C, sendo a maior concentração de 1,5 mg/L em amostra de água na unidade C. O excesso de flúor pode causar doença óssea em pacientes hemodialíticos (Cordy *et al.*, 1974) e além disso, a reação do alumínio com o flúor gera o fluoreto de alumínio que é altamente tóxico ao sistema renal (Silva & Moreira, 2009). A concentração de fluoreto associada à toxicidade em hemodiálise é de 1 mg/L (Amato *et al.*, 2013).

2.3.2 Detecção de microcistina

A presença de microcistina foi detectada em apenas uma amostra de água pré OI da unidade A com concentração de 4,13µg/L. Outros pontos de coleta de água foram analisados e foi verificada a remoção da toxina, dentro do limite de detecção do método, após o tratamento de carvão ativado.

Almeida *et al.* (2016) observaram que o carvão ativado possui menor taxa de remoção de microcistina em concentração superior à 3,83 ± 0,36 µg/L. O presente trabalho detectou a concentração de toxina próxima a este limite de remoção. Desta forma, aumenta a preocupação à saúde do paciente caso a toxina consiga persistir no sistema de tratamento da água e chegar ao paciente em hemodiálise.

Hilborn *et al.* (2013) relataram um caso de exposição de 44 pacientes à dialisato contaminado por microcistina no estado do Rio de Janeiro, Brasil, no ano de 2001. A concentração de microcistina na água potável foi de 0,4 µg/L e concentração média de 0,33 ng/mL no soro sanguíneo de pacientes dialíticos expostos (Soares *et al.*, 2006; Hilborn *et al.*, 2013). Desta forma, é imprescindível o monitoramento constante da presença da toxina e a eficiência do tratamento na água utilizada para hemodiálise, a fim de evitar que futuros eventos de exposição à microcistina ocorram a pacientes hemodialítico.

2.3.3 Parâmetros microbiológicos

Todas as amostras de água do presente estudo não apresentaram coliformes, portanto, estando dentro dos padrões estabelecidos pela RDC N° 11, de 13 de março de 2014, que requer a ausência de coliformes em 100 mL do volume amostral.

A quantificação de bactérias heterotróficas totais variou de níveis não detectáveis a cerca de 1,5 x 10^3 UFC/mL (tabela 2.2). As amostras de água foram provenientes de pontos diversos do sistema de tratamento de água realizado pelas unidades de diálise, desde a água de entrada ao dialisato.

Tabela 2.2 – Valores médios e desvio padrão da quantificação de UFC (unidade formadoras de colônias)/mL de bactérias heterotróficas totais (BHT) de amostras de água provenientes do pré-tratamento de osmose inversa (Pré OI) e pós-tratamento de osmose inversa (Pós OI) nos centros de hemodiálise localizados na região metropolitana do Espírito Santo, Brasil.

Amostras de água	Unidade de hemodiálise					
	A	B	C	D	VMP*	Nível de ação
	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	UFC/mL	
Pré OI	292 ± 233	797 ± 600	24 ± 5	5 ± 3	500*	
Pós OI	500 ± 435	340 ± 227	26 ± 11	4 ± 1	100**	50**
Dialisato	32 ± 20	375 ± 320	2 ± 1	35 ± 28	200**	50**

Legenda: VMP: Valor máximo permitido; * valor máximo permitido pela MS 2914/11 – Ministério da Saúde, Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 para água potável. ** Padrão de qualidade da água para hemodiálise de acordo com a RDC 11/2014 - Resolução da Diretoria Colegiada n° 11, de 13 de março de 2014, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Durante o tratamento da água para a hemodiálise, o cloro é removido, facilitando o desenvolvimento de bactérias. A remoção de compostos durante o tratamento da água que pode causar irregularidades no circuito hidráulico e facilitar a formação de biofilme

(Hoenich e Levin, 2003). Os deionizadores são outro possível ponto de contaminação microbiológica. A contaminação bacteriana pode ocorrer devido à capacidade das resinas principalmente aniônicas se ligarem à matéria orgânica e, assim, permitir a prolirefação bacteriana. (Coulliette & Arduino, 2013). A OI é um tratamento avançado de tratamento de água, que permite a remoção de constituintes de baixo peso molecular, com eficiência de cerca de 99,9%, permitindo a passagem de bactérias para o permeado, que pode estar associada à integridade da membrana ou ao sistema de vedação (Fujioka *et al.,* 2018; Fujioka *et al.,* 2019). Park & Hu, 2010, relataram o crescimento bacteriano e produção de biofilme da água permeada por OI.

2.3.4 Microrganismos isolados de amostras de água nas unidades de hemodiálise

Foram isoladas oito espécies de bactérias e uma de fungo nas amostras de água e dialisato (tabela 2.3). A maioria das espécies de bactérias isoladas pertence ao grupo de Gram negativas não fermentadoras, com exceção a *Serratia marcescens,* uma Gram negativa fermentadora. As bactérias Gram-negativas, principalmente as não fermentadoras, são os contaminantes microbiológicos mais relatados em águas destinadas à hemodiálise (Gomila *et al.,* 2005; Montanari *et al.,* 2009; Chen *et al.,* 2017; Vincenti *et al.,* 2014; Nazemi *et al.,*2016; de Jesus *et al.,* 2017).

Tabela 2.3 – Microrganismos isolados de amostras de água provenientes do pré-tratamento de osmose inversa (Pré OI), pós-tratamento de osmose inversa (Pós OI) e dialisato nos centros de hemodiálise localizados na região metropolitana do Espírito Santo, Brasil.

Amostras de água	Unidade de hemodiálise			
	A	B	C	D
Pré OI	*Brevudimonas aurantiaca*		*Ralstonia pickettii*	
Pós OI	*Ralstonia insidiosa*	*Ralstonia pickettii*		
	Burkholderia vietnamiensis	*Ralstonia insidiosa*	*Ralstonia insidiosa*	*Ralstonia pickettii*
	Herbarspirillum sp.	*Moraxella sp*	*Ralstonia pickettii*	
Dialisato		*Nesterenkonia lawsekhoensis*		
		Serratia marcescens		
		Candida orthopsilosis		

A espécie *Ralstonia picketti* esteve presente em todas as unidades de hemodiálise estudadas. A *Ralstonia sp* pode ser encontrada em diferentes tipos de água tratada para abastecimento, como em ambiente hospitalar, água de distribuição, uso industrial e até em água ultra pura, portanto, sendo capaz de sobreviver em ambientes de baixo teor de nutrientes (Kulakov *et al.*, 2002; Adley et al., 2006; Ryan & Adley, 2014; Vaz-Moreira *et al.*, 2017). Além disso, esta espécie possui a capacidade de desenvolver biofilme em tubulações de PVC (Dombrowsky *et al.*, 2013). As águas utilizadas para procedimentos hemodialíticos possuem baixas concentrações de nutrientes e são distribuídas em tubulações de PVC. A *Ralstonia sp* já foi descrita em amostras de água para hemodiálise por Lima *et al.* (2005), Oumokhtar *et al.* (2013) e Chen *et al.* (2017).

A *Ralstonia sp* é considerada um patógeno oportunistas emergente (Ryan & Adley, 2014) e casos de infecção desta bactéria têm sido relatados em pacientes hemodialíticos (Strateva *et al.*, 2012; Tejera *et al.*, 2016; Thet *et al.*, 2019). Thet et al. (2019) relataram surto de infecção bacteriana em sete pacientes de um centro de hemodiálise, sendo que em quatro pacientes a bactéria identificada foi a *R. pickettii*. Os autores atribuíram o surto à contaminação da água, principalmente no reservatório, por haver alta contagem de BHT e apontaram o risco potencial do reuso dos dialisadores.

A presença das bactérias *Serratia marcescens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Brevudimonas aurantiaca*, *Moraxella sp* e *Herbarspirillum sp.* na água apresentam risco para hemodiálise. Foi relatado por Novosad *et al.* (2019) surto multicêntrico em pacientes em hemodiálise provocado por *Serratia marcescens*. Um surto de bacteremia em pacientes renais crônicos provocada pela *Burkholderia sp.*, sendo identificada como fonte de contaminação membranas da OI usadas no tratamento da água (Magalhães *et al.*, 2003). A Brevudimonas sp. é relatada como patógeno oportunista emergente, com relatos de infecção a diversos pacientes hospitalizados (Ryan & Pembroke, 2018). Um relato de caso de peritonite provocado por *Moraxella Osloensis* foi descrito por Adapa *et al*. (2018) em um paciente em diálise peritonial. Um caso fatal por *Herbaspirillum seropedicae* foi descrito por Suwantarat *et al.* (2015), em que a bactéria estava presente no cateter de hemodiálise. A *Nesterenkonia lawsekhoensis* não foi associada há infecções em pacientes em hemodiálise.

A *Candida orthopsilosis* foi o único isolado fúngico deste estudo. A presença de fungos em amostras de água para hemodiálise foram relatadas por Arvanitidou *et al.* (2000);

Mahmoudabadi *et al.* (2010); Pires *et al.* (2011), Figel *et al.* (2013); Okunola & Olaitan, (2016); Montanari *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2018). A frequência de leveduras, como espécies do gênero Candida, foi mais frequente em amostras de dialisato, quando comparadas à outras amostras de água do sistema de tratamento para hemodiálise (Arvanitidou *et al.,* 2000). Além disso, há formação de biofilme em solução de diálise (Oliveira *et al.,* 2018). Casos de infecção provocada por *Candida sp* em pacientes em hemodiálise foram descritos por Ourives *et al.* (2016) e Shu *et al.* (2017).

2.4 CONCLUSÕES

O monitoramento da qualidade de água em centros de hemodiálise é necessário para avaliar e garantir a segurança do paciente submetido a procedimentos hemodiálicos. Neste estudo, a água utilizada na hemodiálise apresentou valores acima do recomendado pela RDC 11, 2014 para níveis de concentração do nitrato-N e do fluoreto. Além disso, os microrganismos estiveram presentes nas amostras de água potável até o dialisato. Bactérias patogênicas emergentes, tais como a *Ralstonia sp*. e *Brevudimonas sp.*, encontradas neste estudo demonstram preocupação e risco à saúde dos pacientes hemodialíticos.

Observação:

Este manuscito será submetido à revista Acta Scientiarum. Biological Sciences.

Avaliação da Capes

CIÊNCIAS AMBIENTAIS: B1

ENGENHARIAS I: B2

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE ÁGUAS DE HEMODIÁLISE FRENTE À AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES.

RESUMO

As infecções em pacientes hemodialíticos por bactérias multirresistentes têm se tornando uma preocupação mundial. Bactérias Gram negativas não fermentadoras de origem ambiental têm sido associadas às infecções de pacientes hemodialíticos. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e agentes de desinfecção de bactérias isoladas da água tratada e do dialisato em quatro unidades de tratamento de hemodiálise no Espírito Santo, Brasil. O perfil de resistência bacteriana foi determinado pelo teste de disco de fusão e pela concentração mínima inibitória. O teste de desinfecção bacteriana foi realizado com a exposição UV (570 nm), hipoclorito de sódio e ácido peracético. Cerca de 60% das bactérias isoladas apresentaram o padrão de multirresistência aos antimicrobianos, principalmente a colistina, gentamicina e aos carbapenêmicos. Os isolados foram suscetíveis ao ciprofloxacin, levofloxacin e piperacilina/tozobactam. A desinfecção por ácido peracético foi mais eficaz na eliminação bacteriana. O monitoramento da suscetibilidade antimicrobiana e desinfecção do sistema de água são necessários para garantia da qualidade dos serviços de hemodiálise.

Palavras-chave: Hemodiálise, água, resistência a antimicrobianos e desinfecção.

3.1 INTRODUÇÃO

O número de pessoas com problemas renais que necessitam do tratamento de hemodiálise vêm aumentando progressivamente no Brasil, com taxa de incidência de 610 pacientes por milhão de habitantes (Thomé *et al.*, 2019). Casos de infecção na corrente sanguínea são comuns em pacientes hemodialíticos, com elevado risco de evolução para bacteremia, sendo considerada a segunda principal causa de mortalidade neste grupo (Suzuki *et al.*, 2016).

Em um estudo caso-controle no Brasil em hemoculturas de pacientes em hemodiálise a presença de cerca de 70% de bactérias Gram-positivas, 25% de bactérias Gram-negativas sendo 13% correspondente ao grupo de não fermentadores e apenas 1% de fungos. (Fram *et al*., 2015). A infecção por bactérias Gram-positivas está geralmente associada ao uso de cateter venoso, o microrganismo mais prevalente é o *Staphylococcus aureus* sendo comumente encontrado na pele (Suzuki *et al*., 2016; Villalon *et al.,* 2018; Noor *et al.,* 2019). A incidência de infecções por bactérias Gram-negativas em pacientes em hemodiálise variou de 35 a 66% em diferentes estudos (Rojas-Moreno *et al.,* 2016; Villalon *et al.,* 2018; Noor *et al.,* 2019; Zhang *et al.,* 2019). As bactérias Gram-negativas não fermentadoras (BGNNF) vêm mostrando importância epidemiológica como patógenos oportunistas emergentes, principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido (Ryan *et al.,* 2014; Ryan & Pembroke, 2018).

Casos de bacteremia causados por BGNNF em pacientes hemodialíticos têm sido reportados na literatura e a água de diálise considerada uma possível fonte de contaminação (Strateva *et al.,* 2012; Tejera et al., 2016; Novosad *et al.,* 2019; Thet *et al.,* 2019). A água para hemodiálise passa pelo tratamento que envolve um conjunto de sistema de filtração e a osmose inversa (Kasparek & Rodriguez, 2015), porém é possível identificar a presença bacteriana na água tratada, principalmente de BGNNF (Montanari *et al.,* 2009; Glorieux *et al.,* 2012; Oumokhtar *et al.,* 2013; Okunola & Olaitan, 2016). Falhas no processo de desinfecção do sistema de tratamento da água, distribuição e nos reusos de dialisadores têm sido associadas a surtos de bacteremia (O Edens *et al.,* 2017; Novosad *et al.,* 2019).

A multi-resistência a antimicrobianos é um problema crescente em ambientes hospitalares (Mo *et al.,* 2016) principalmente em pacientes que necessitam de hemodiálise (Pop-Vicas *et al.,* 2008). A água tem sido considerada um local de disseminação de genes de resistência a antimicrobianos e reservatório de bactérias multi-resistente (Baquero *et al.,* 2008). Os casos de infecção por BGNNF apresentam grande preocupação devido à ampla capacidade de resistência (Boattini *et al.,* 2018; Scheich *et al.,* 2018; Whistler *et al.,* 2019) a diversas classes de antimicrobianos e, assim dificultando as opções terapêuticas (Enoch *et al.,* 2007). A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em água hospitalar tem sido relatada na literatura (Arvanitidou *et al.,* 2003; Oumokhtar *et al.,* 2013; Vincenti *et al.,* 2014), assim apresentando risco aos pacientes e alertando a necessidade de monitoramento ambiental.

No Brasil a água utilizada para hemodiálise possui padrões de qualidade estabelecidos pela RDC 11, 2014, quanto a concentrações de químicos, endotoxinas e contagem de bactérias heterotróficas totais, porém não há exigência na identificação de bactérias e padrões de resistência a antimicrobianos. Portanto, o presente estudo tem como objetivo determinar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e agentes de desinfecção de bactérias isoladas da água tratada e do dialisato em quatro unidades de tratamento de hemodiálise no Espírito Santo, Brasil.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Origem dos isolados bacterianos

No presente estudo foram selecionados 20 isolados bacterianos, sendo 8 de *Ralstonia pickettii*, 8 *Ralstonia insidiosa*, 1 de *Brevudimonas aurantiaca*, *1 Burkholderia vietnamiensis*, 1 *Herbarspirillum sp.*, 1 *Moraxella sp.*(Figura 3.1). As cepas bacterianas foram isoladas da água do sistema de tratamento de quatro unidades de serviços à hemodiálise.

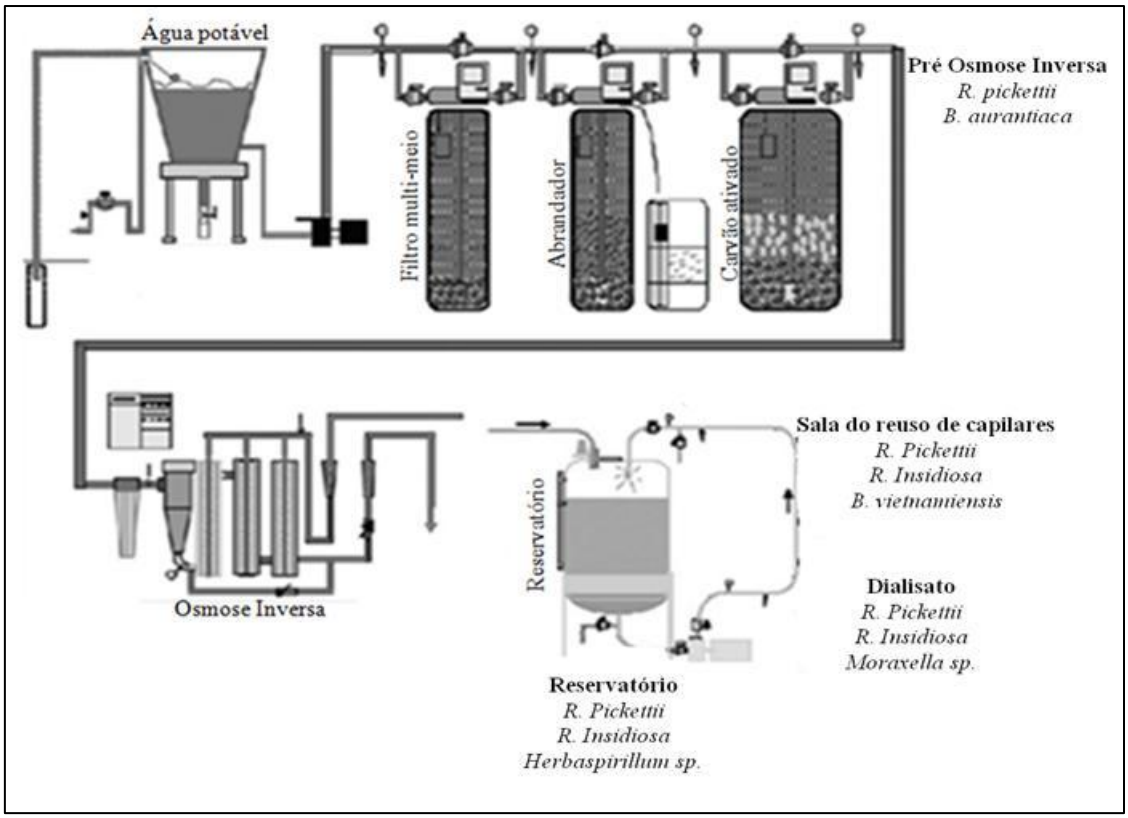

Figura 3. 1 – Representação da origem das cepas de bactérias isoladas do sistema de tratamento de água utilizado pelas unidades de hemodiálise.

3.2.2 Identificação dos microrganismos isolados

A identificação das espécies de microrganismos isolados foi realizada por espectrometria de massa por ionização de dessorção a laser com matriz assistida (MALDI-TOF MS) usando espectrômetro de massa Microflex LT e software Biotyper 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.3 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos

3.2.3.1 Método de difusão em disco

As cepas bacterianas foram suspensas em caldo Mueller- Hinton com turvação compatível a 0,5 da escala MacFarland. Com um *Swab* estéril, foi realizada uma semeadura continua em três a quatro direções na superfície da placa de Ágar Mueller-Hinton. Os discos contendo os antimicrobianos foram adicionados na superfície desta placa, incubados a 35ºC por 18-24 horas em aerobiose. A leitura foi realizada pela medida do halo de sensibilidade ao redor dos discos de antimicrobianos, com auxílio de um paquímetro. Não há pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (*Clinical and laboratory Standards Institute*) aos isolados deste estudo, portanto os valores de referência utilizados foram da *Pseudomonas sp* aos antimicrobianos amicacina (AMI30); ceftazidima (CAZ 30), ciprofloxacina (CIP 5), cefepime (CPM 30), doripenem (DOR 10), gentamicina (GEN 10), Imipenem (IPM 10), levofloxacin (LVX 5), meropenem (MER 10), piperacilina/ tozobactam (PIT 110), tobramicina (TOB 10). Os antimicrobianos amplicilina/sulbactam (APS 20), ceftriaxona (CRO 30), minociclina (MH 30) a referência utilizada foi a *Acinetobacter spp.* Os valores obtidos do isolado *B. vietnamiensis* foi comparado ao complexo *Burkholderia cepacea* para os antimicrobianos ceftazidima, clorafenicol, levofloxacin e meropenem fornecidos pelo CLSI, (2017). Em todos os testes foram utilizados como controle da qualidade as cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 23226) e *P. aeruginosa* (ATCC19429).

3.2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados bacterianos foi determinada pelo teste de diluição em caldo (Macrodiluição e Microdiluição), descrito por NCCLS, (2003), utilizou-se microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi), caldo Müeller-Hinton

ajustado com cátions (Kasvi) e a cultura bacteriana a concentração de 10^5 UFC/mL. Foram utilizados os antimicrobianos ceftazidma, clorafenicol, colistina, doripenem, gentamicina, imipenem, levofloxacin, piperacilina e piperacilina/tozobactam adquiridos da Sigma Chemical®.

As microplacas com os antimicrobianos e isolados foram incubados a 35°C por 24 horas. A leitura dos resultados a suscetibilidade foi definida a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento bacteriano. Em todos os testes foram utilizados as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle de qualidade.

A interpretação dos resultados em resistente, intermediário ou suscetível foi realizada de acordo com a tabela 2B-5 para Outras Não-Enterobacteriaceae, exceto para os antimicrobianos colistina e doripenem que foi utilizado à tabela 2B-1 referente à *Pseudomonas aeruginosa* CLSI, (2017).

3.2.3.3 Classificação de suscetibilidade dos isolados bacterianos

A classificação dos isolados em multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes a antimicrobianos (XDR) e não multirresistentes (não MDR) foi realizada de acordo com Magiorakos *et al*. (2012). A referência utilizada foi a *Pseudomonas aeruginosa*, pois há carência de informações dos táxons presentes neste estudo. Nesta classificação, as cepas com intermediárias foram consideradas resistentes, pois de acordo com a premissa de Vincenti *et al.* (2014) as cepas intermediárias teriam maior facilidade em evoluir para resistência do que para sucetibilidade ao antimicrobiano. A classificação em multiresistente utilizou os dados do método de difusão de discos para todos os antimicrobianos com exceção da colistina, em que foi utilizado o resultado referente ao teste de MIC.

3.2.4 Desinfecção

A atividade bactericida da radiação UV germicida, hipoclorito de sódio e o ácido peracético foram realizadas em suspensões bacterianas a A625 = 0,1 em soluções de PBS (0,1 M, pH= 7.4) de culturas com crescimento de 24 horas.

A desinfecção por radiação foi realizada por uma lâmpada UV germicida com intensidade 0,018 mW/cm^2, sob a qual placas de petri com 15mL de suspensão bacteriana ficaram expostas aos tempos de 0, 15, 30, 45, 75, 90 e 105 segundos.

Para testar o efeito do cloro foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio 10 $mg.L^{-1}$, preparada a partir de água sanitária (Cloro Aracruz Eireli), utilizada nas unidades de diálise deste estudo. A concentração de hipoclorito de sódio inicial foi aproximadamente a 5mg/L. Uma solução de tiossulfato de sódio a 1,5% (*p*/*v*) foi usada para neutralizar o efeito do cloro em diferentes tempos de exposição de 0, 1, 3, 5, 10, 15 e 20 min.

O efeito do ácido peracético foi testado usando uma solução a 0,01% preparada a partir de uma reserva a 3,5% (Farmarin, Brasil) utilizada pelas unidades de diálise deste estudo. As suspensões bacterianas foram expostas aos tempos de 0, 15s, 30s, 1 min, 2 min, 4 min, 8 min e 16 min. Uma solução de tiossulfato de sódio a 1,5% (*p*/*v*) foi usada para neutralizar o efeito do ácido peracético.

Após os testes de desinfecção uma alíquota de 100µL foi coletada a cada tempo de exposição, diluída quando necessário em meio PBS e plaqueada em TSA, incubada a 35°C e a leitura realizada em 24, 48 e 36 horas de crescimento. As bactérias selecionadas para os testes de desinfecção foram *Ralstonia pickettii* (A), *Ralstonia insidiosa* (B), *Brevudimonas aurantiaca* (C) e Moraxella sp. (D).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos

Dos 14 antimicrobianos testados pelo método de disco de fusão os isolados apresentaram maior resistência ao doripenem e a gentamicina seguido do tobramicina e imipenem (tabela 3.1). A resistência das bactérias *Ralstonia picketti* e *Ralstonia insidiosa* foram relatadas na literatura para os antimicrobianos da categoria dos aminoglicosídeos e carbapenêmicos. (Strateva *et al.,* 2012; Ryan & Adley, 2013; 2014; Birlutiu *et al.,* 2017; Fang *et al.,* 2019).

Tabela 3.1 – Suscetibilidade a antimicrobianos de 20 isolados de bactérias da água para hemodiálise usando teste de difusão em disco.

Antimicrobiano mg.ml-1	Cepas bacterianas						Total de cepas resistentes n= 20
	Ralstonia pickettii n=8		*Ralstonia insidiosa* n=8		Outras BGNNF n=4		
	Resistente	Intermediário	Resistente	Intermediário	Resistente	Intermediário	
AMI 30			37,5%	12,5%			15,0%
APS 20				12,5%			
CAZ 30	25,0%	37,5%	12,5%	12,5%	25,0%		20,0%
CIP 5					25,0%		5,0%
CPM 30		12,5%	25,0%	12,5%	50,0%		20,0%
CRO 30					25,0%		5,0%
DOR 10	**50,0%**		**75,0%**				**50,0%**
GEN 10	25,0%		**87,5%**		25,0%		**50,0%**
IPM 10	37,5%	25,0%	37,5%				30,0%
LVX 5							
MER 10	**50,0%**		12,5%	50,0%			20,0%
MH 30							
PIT 110		25,0%		37,5%	25,0%		5,0%
TOB 10	25,0%		**87,5%**				45,0%

Obs: A referência dos pontos de corte de resistência utilizada foi à tabela 2B-1 do CLSI, (2017) para *Pseudomonas aeruginosa* dos antimicrobianos amicacina (AMI30); ceftazidima (CAZ 30), ciprofloxacina (CIP 5), cefepime (CPM 30), doripenem (DOR 10), gentamicina (GEN 10), Imipenem (IPM 10), levofloxacin (LVX 5), meropenem (MER 10), piperacilina/ tozobactam (PIT 110), tobramicina (TOB 10). A tabela 2B-2 do CLSI, (2017) para *Acinetobacter spp* foi utilizada para os antimicrobianos amplicilina/sulbactam (APS 20), ceftriaxona (CRO 30), minociclina (MH 30).

Todos os isolados resistentes à gentamicina pelo teste de difusão em disco também mostraram o mesmo padrão teste MIC. O perfil de resistência a colistina foi apresentada em 95% dos isolados (tabela 3.2). Não houve diferença significativa na classificação de isolados resistentes pelos métodos de difusão em disco e MIC, possíveis diferenças podem ser explicadas pelo uso dos pontos de corte referente às *Pseudomoas spp*., *Acinetobacter ssp* e *Burkholderia cepacea* para o método de disco de difusão e a referencia da tabela de Outras Não-Enterobacteriaceae utilizada para o método de concentração mínima inibitória descrito pelo CLSI, (2017).

Tabela 3.2 – Concentração inibitória mínima dos antimicrobianos e porcentagem de resistência dos isolados da água para hemodiálise.

Antimicrobiano	Ponto de corte de resistência	Faixa µg.ml-1	Isolados resistentes			Total de cepas resistentes n= 20
			Ralstonia picketti n=*8*	*Ralstonia insidiosa* n=*8*	Outras BGNNF n=4	
Ceftazidma	≥ 32	0,5 - 64		25,0%		10,0%
Clorafenicol	≥ 32	1 - 128	12,5%	25,0%		15,0%
Ciprofloxacin	≥ 4	<0,125				
Colistina	≥ 4*	0,2 - 32	87,5%	100,0%	100,0%	**95,0%**
Doripenem	≥ 8*	0,06 - >32	50,0%	62,5%		45,0%
Gentamicina	≥ 16	<0,1 - 64	25,0%	87,5%	25,0%	**50,0%**
Imipenem	≥ 16	0,2 - 32	12,5%	50,0%	100,0%	45,0%
Levofloxacin	≥ 8	<0,1 - 16				
Piperacilina	≥ 128	1 - 128			50,0%	10,0%
Piperacilina/ Tozobactam	≥ 128/4	0,5/4 - 128/4				

Obs: A referência dos pontos de corte de resistência utilizada foi à tabela 2B-5 do CLSI, (2017) para Outras Não-Enterobacteriaceae, * exceto para os antimicrobianos colistina e doripenem que foi utilizado à tabela 2B-1 referente à *Pseudomonas aeruginosa* CLSI, (2017).

O padrão de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos e carbapenêmicos pode ser explicada pela presença dos genes cromossomais de β-lactamase, amplamente distribuídos nas espécies de *R. picketti*, destes foram descritos os genes BLA $_{OXA-22}$ responsável por conferir resistência bacteriana às benzilpenicilina, cloxacilina e algumas cefalosporinas e BLA $_{OXA-60}$ que está relacionada à resistência aos carbapenemicos, principalmente o imipenem (Nordmann *et al.*, 2000; Girlich *et al.*, 2006). Além disso, Ryan & Adley, (2013) encontraram no genoma de isolados de *R. pickettii* genes semelhantes aos encontrados em *Burkholderia pseudomallei* relacionados a bomba de efluxo de múltiplas drogas, um mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos.

Neste estudo o isolado de *B. vietnamiensis* foi sensível aos aminoglicosídeos. Jassem *et al.* (2011) identificaram que vários isolados são suscetíveis aos aminoglicosídeos, porém existe a capacidade de resistência por indução de efluxo de drogas ativas. Todas as outras BGNNF apresentaram resistência ao imipenem. A enzima metalo-β-lactamases possui a capacidade de hidrolisar beta-lactâmicos e o imipenem, e essa enzima tem sido descritas em espécies *Burkholderia sp* e *Brevundimonas sp.* (Shibata *et al.*, 2003; Almuzara *et al.*, 2012).

A colistina é um antimicrobiano indicado contra bactérias resistentes aos carbapenemicos, utilizado apenas como último recurso (Falagas *et al*., 2005), porém as espécies do gênero Ralstonia (com exceção da *R. eutropha*), *Moraxella sp*., *Burkholderia sp.* são intrinsecamente resistentes à colistina (Vaneechoutte *et al*., 2004; Olaitan *et al.,* 2014; Rhodes *et al.,* 2016; Kieffer *et al.,* 2017). A resistência à colistina foram descritas para *Brevundimonas sp*. (Ryan & Pembroke, 2018) e *Herbaspirilum sp.* (Liu *et al.,* 2018).

Foi descrito em *Moraxella sp*. a presença da enzima (transferase de fosfoetanolamina lipídica PEtN) responsável por alterações físicas na membrana externa da bactéria que confere a resistência a colistina (Stogios *et al*., 2018). Wei *et al.* (2018) relataram genes cromossomais de resistência a colistina em *M. osloensis* que apresentaram similaridade genética aos genes plasmídiais de enterobactérias, evidenciando a resistência transferível à colistina. A Moraxella sp. pode ser um potencial reservatório genético para mobilização de plasmídeos (Kieffer *et al.,* 2017). A resistência à colistina por variantes gênicas móveis possui ampla distribuição em bactérias não patogênicas presentes no ambiente aquático, sugerindo que a presença destes plasmídeos possa estar relacionada a algum sistema de defesa contra predação e/ou resistência a antimicrobianos naturais (Khedher *et al.,* 2019).

Neste estudo 90% dos isolados bacterianos apresentaram suscetibilidade aos antimicrobianos ciprofloxacin, levofloxacin e piperacilina/tozobactam. Resultados semelhantes também foram observados por Vicenti *et al.* (2014) em isolados de *R. pickettii* da água para hemodiálise. Em relatos de casos de infecção por Ralstonia têm sido utilizado os antimicrobianos ampicilina-sulbactam, ceftazidima, piperacilina-tazobactam, trimetoprim-sulfametoxazol e meropenem (Tejera *et al.,* 2016; Lim & Lee, 2017; Basso *et al.,* 2019; Thet *et al.,* 2019). De acordo com Ryan & Adley, (2013) o sulfametoxazole/trimetoprim e o ciprofloxacin são os antimicrobianos mais indicados para o tratamento de infecções por *R. picketti* e *R. insidiosa*. Além disso, esses autores verificaram o mesmo padrão de suscetibilidade em isolados clínicos e ambientais, indicando à fonte de contaminação das infecções a água purificada (Ryan & Adley, 2013).

Os isolados foram classificados em 60% como multirresistentes aos antimicrobianos testados, não foi observado nenhum padrão de extensivamente resistentes a

antimicrobianos. Infecções por *Ralstonia sp* resistentes a diversos antimicrobianos e a necessidade de tratamento com antimicrobianos de amplo espectro pode contribuir com a evolução de cepas cada vez mais resistentes e assim dificultando a escolha de opção terapêutica (Stelzmueller *et al.*, 2006).

3.3.2 Desinfecção

A exposição à radiação UV por 15 segundos promoveu redução de 1 a 8 logs, sendo o isolado *Moraxella sp.* o mais suscetível a radiação. Para redução total das bactérias foram necessários 45 segundos de exposição (Figura 3.2 a). O estudo de Ferro *et al.* (2019) com isolados de *Ralstonia pickettii* expostas a 150 segundos a radiação UV não foi o suficiente para eliminar todos os microrganismos. Assim, sugerindo que a suscetibilidade a radiação UV pode ser diferenciada entre as estirpes de *Ralstonia pickettii*. A luz UV germicida é indicada para o pré-tratamento da água, sendo eficaz na morte de bactérias, porém possui baixo efeito na remoção de endotoxinas (Cappelli *et al.*, 2006).

A desinfecção por hipoclorito de sódio, na concentração de 10 $mg.L^{-1}$, no primeiro minuto de contato reduziu de 2 a 4 logs de UFC/mL dos isolados bacterianos testados, a redução completa só ocorreu após 15 minutos de contato (Figura 3.2b). A curva de ação do cloro à *Ralstonia picketti* foi similar ao encontrado no estudo de Ferro *et al.* (2019). Borges *et al.* (2007) avaliaram a ação de hipoclorito de sódio em isolados bacterianos da água de hemodiálise, a uma concentração 50 vezes maior ao do presente estudo, e encontraram espécies de *Pseudomonas aeruginosa* , *Acinetobacter haemolyticus* e *Burkholderia cepacia* resistentes a desinfecção.

O hipoclorito de sódio é amplamente utilizado na desinfecção do sistema de água para hemodiálise e o processo de enxague do composto é de extrema importância para garantir a qualidade da água. Um surto de reações hemolíticas em 16 pacientes foi provocado pela contaminação de cloro e cloraminas devido falhas no enxague após desinfecção por hipoclorito de sódio (Calderaro & Heller, 2001). O ácido peracético foi o mais eficaz para a desinfeção dos micorganismos testados, a concentração de 0,01% foi suficiente para reduzir 8 logs UFC/mL de todos os isolados testados (Figura3.2 c). A ação do ácido peracético consiste na remoção de proteínas pela atividade do peróxido de hidrogênio e a remoção do carbonato realizada pelo ácido acético.

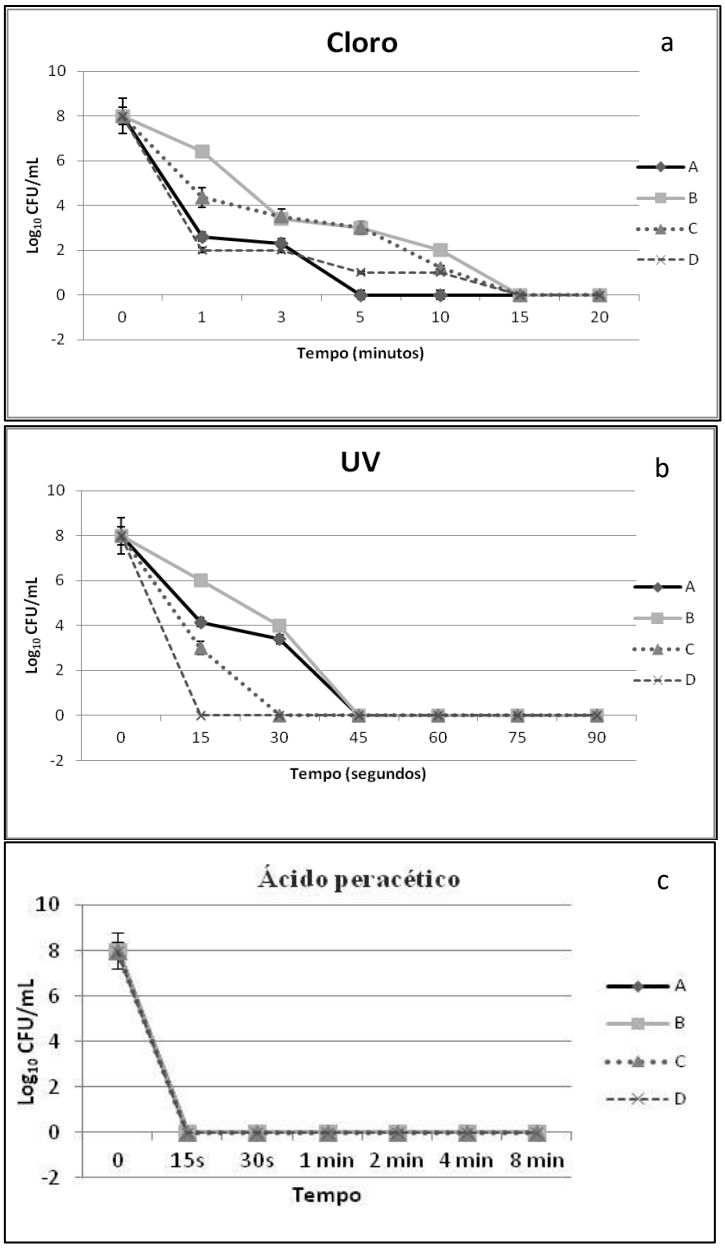

Figura 3.2 – Ação dos agentes de desinfecção em isolados bacterianos de amostras de água para hemodiálise.

Os isolados de *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia insidiosa*, *Brevudimonas aurantiaca* e *Moraxella sp*. foram sensíveis a desinfecção por UV, hipoclorito de sódio e ácido peracético. A *Ralstonia sp.* é resistente a ação dos desinfetantes hospitalares clorexidina e lactato de etacridina e a *Brevundimonas diminuta* pode sobreviver ao peróxido de hidrogênio + ácido peracético (Ryan & Adley, 2014).

Dos três agentes de desinfecção testados neste estudo o ácido peracético se mostrou mais eficaz na eliminação bacteriana. Além disso, a taxa de remoção de biofilme por ácido peracético foi superior quando comparado à ação do hipoclorito de sódio em tubulações de água para hemodiálise (Isakozawa *et al.*, 2016). O ácido peracético

possui como vantagem os seus produtos de decomposição ser ácido acético, água, oxigênio e peróxido de hidrogênio, não tóxico ao meio ambiente (Tomazelli & Santos, 2000). Não há relatos de associação de tolerância cruzada aos antimicrobianos e, além disso, o ácido peracético pode inativar beta-lactâmicos e assim auxiliar na redução da pressão seletiva (Zhang *et al.,* 2017; Kampf, 2018).

O controle da desinfecção no sistema de tratamento de água para hemodiálise é de extrema importância, pois vários casos de infecções por BGNNF em pacientes hemodialíticos possuem relação com a água contaminada (Strateva *et al.,* 2012; Tejera *et al.,* 2016; Novosad *et al.,* 2019; Thet *et al.,* 2019). Além disso, é necessária a manutenção da limpeza e desinfecção do sistema de tratamento de água para minimizar o risco de formação de biofilmes (Campelli & Moraes, 2015; Isakozawa *et al.,* 2016).

3.4 CONCLUSÕES

A presença de isolados bacterianos com potencial patogênico em amostras de água para hemodiálise evidência a preocupação a saúde dos pacientes. Neste estudo, encontramos isolados de BGNNF multiresistentes com espécies consideradas oportunistas emergentes. Os antimicrobianos mais eficazes foram o ciprofloxacin, levofloxacin e piperacilina/tozobactam. Os isolados *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia insidiosa*, *Brevudimonas aurantiaca* e *Moraxella sp*. foram suscetíveis aos tratamentos de desinfecção UV, hipoclorito de sódio e ácido peracético. A pesquisa do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias emergentes se faz necessária para auxiliar na escolha de opção terapêutica mais adequada, uma vez que as infecções por BGNNF estão associada a contaminações ambientais. A desinfecção do sistema de tratamento de água para hemodiálise e o monitoramento microbiológico da água e do dialisado são fundamentais para a manutenção da segurança ao paciente hemodialítico.

Observação:

Este manuscito será submetido à revista INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS.
Avaliação da Capes
CIÊNCIAS AMBIENTAIS: B2

CAPÍTULO 4

ESTUDO METAGENÔMICO DAS BACTÉRIAS PRESENTES EM ÁGUAS DE HEMODIÁLISE.

4.1. INTRODUÇÃO

O número de casos de pessoas com doença renal crônica (DRC) tem aumentado nos últimos anos e, estima-se que acometa cerca de 10% da população mundial em idade adulta (Vos *et al*., 2016). No Brasil, nos anos de 2002 a 2017 a prevalência aumentou cerca de 160%, sendo estimados 126 mil pacientes em diálise e com taxa de mortalidade de 19,9% ao ano (Thomé *et al.*, 2019).

A hemodiálise e a diálise peritoneal são métodos utilizados na terapia renal substitutiva em pacientes com DRC, sendo a hemodiálise responsável por 90% dos tratamentos. Durante o processo, o sangue é conduzido pela máquina de diálise aos capilares do dialisador, onde ocorrem trocas de substâncias entre o sangue e o dialisato (água tratada com soluções concentradas de eletrólitos, tampão e glicose) através de uma membrana semipermeável, e posteriormente o sangue filtrado retorna ao paciente (Sheth & Sheth, 2017). A cada sessão, com duração média de 4 horas, são utilizados cerca de 120 litros de água tratada para hemodiálise (Ali-Taleshi, 2016).

No Brasil, a água utilizada para hemodiálise deve obedecer aos padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria MS 29014, 2011 e para o uso em hemodiálise aos padrões definidos pela RDC 11, 2014. O tratamento da água realizado nas unidades de diálise é composto por filtros: mecânicos, carvão ativado, abrandadores, deionizadores e a osmose inversa. Após o processo de filtração a água fica armazenada em tanques e distribuída por tubos de cloreto de polivinila (PVC) para toda a unidade de hemodiálise (Kasparek & Rodriguez, 2015).

O tratamento por osmose inversa é responsável por remover cerca de 99,9% dos contaminantes da água, porém há registros do permeado conter substâncias tóxicas e microrganismos nocivos aos pacientes em diálise (Montanari *et al.*, 2009; Shankar *et al.*, 2018; Thet *et al*, 2019), e esta falha do sistema pode estar associada à integridade da membrana ou ao sistema de vedação (Fujioka *et al.*, 2018; Fujioka *et al.*, 2019).

Os métodos utilizados para o monitoramento microbiológico da água são geralmente associados à quantificação de microrganismos e apresentam como limitação o resultado somente de bactérias cultiváveis, assim não representando a microbiota real. As técnicas de análise do DNA tem mostrado vantagem em relação às técnicas tradicionais, pois identifica e quantifica as espécies cultiváveis ou não das amostras ambientais (Farhat *et al.*, 2018).

Considerando a importância da qualidade da água utilizada nos procedimentos de diálise e a estimativa crescente de novos pacientes hemodialíticos, o objetivo da pesquisa foi avaliar a presença e distribuição das bactérias presentes no sistema de tratamento de água para hemodiálise em um hospital universitário da região sudeste do Brasil.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1 Amostragem

As amostras de água destinadas a procedimentos hemodialíticos foram obtidas em um centro de hemodiálise do hospital universitário localizado na região metropolitana do estado do Espírito Santo. A coleta de água foi realizada em seis pontos da estação de tratamento de água de cada unidade de hemodiálise (figura 4.1).

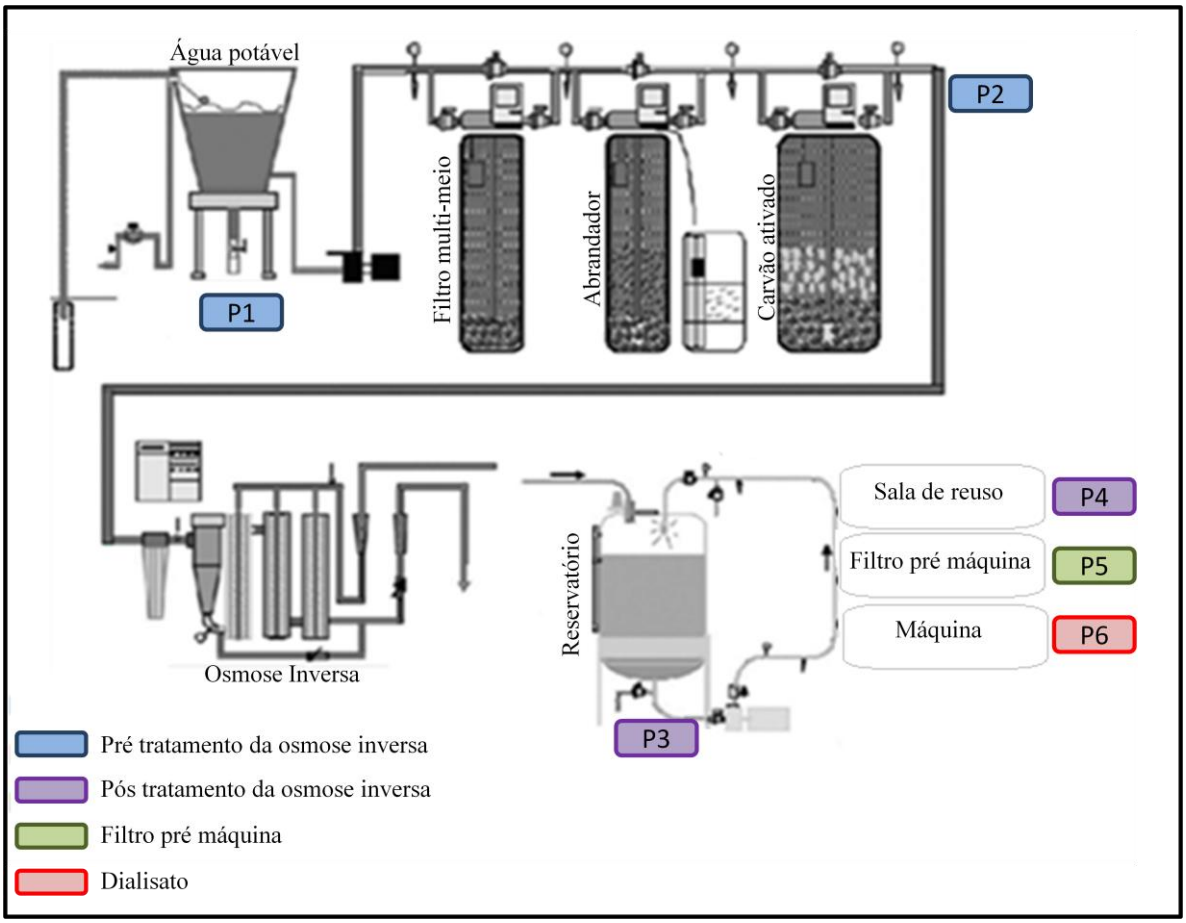

Figura 4.1 - Representação dos pontos de coleta de água no sistema de tratamento utilizado pela unidade de hemodiálise.

4.2.2 Concentração e extração do DNA

A concentração de microrganismos foi realizada por filtração em membrana de porosidade 0,22µM de acetato de celulose adquiridas pela Millipore Express® com as amostras de água descrita na tabela 4.1. Após a concentração, os filtros foram cortados e inseridos em microtubos com *bids* para iniciar a extração de DNA com o kit DNeasy® PowerSoil® e posteriormente foram seguidos as recomendações do fabricante.

Tabela 4.1 – Resumo das amostras de água coletadas no sistema de tratamento utilizado pela unidade de hemodiálise.

Amostra	Classificação	Origem	Quantidade
A	Composta	Água potável (P1) e água pós-filtração (P2)	2 litros
B	Composta	Reservatório (P3) e água da torneira da sala de reuso de capilares (P4)	2 litros
C	Simples	Filtro pré-máquina de hemodiálise.	0,5g
D	Simples	Dialisato	1 litro

4.2.3 Análises de metagenômica

O material genético extraído foi quantificado pelo fluorímetro *Qubit*, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Os genomas foram sequenciados utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA), com o kit V2, 500 ciclos e sequenciamento paired-end (reads 2 x 250pb). As bibliotecas de DNA foram preparadas com o *kit Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina Inc., USA). O software A5 (Coli *et al.,* 2014) foi utilizado para montagem dos reads sequenciados, remoção dos adaptadores, filtragem de qualidade e correção de erros na geração dos contigs e scaffolds. Adicionalmente, o software CAP3 (Huang, 1999) é utilizado para aprimorar a montagem dos *scaffolds*, revisando as regiões de baixa qualidade e corrigindo possíveis ligações errôneas entre os *contigs*. Estas sequências genômicas pré-montadas foram anotadas utilizando o software Prokka (Seemann, 2014). As análises foram realizadas no laboratório comercial Neoprospecta Microbiome Technologies.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação das regiões das regiões V3 e V4 do gene 16S RNAr foram sequenciadas e gerado uma biblioteca de cerca de 155 mil sequencias genéticas.O maior número de amplificações foi visto na amostra A correspondendo a 96 mil sequências por litro de água e a menor leitura observada foi na amostra D, com cerca de 4 mil sequencias (figura 4.2). Não há descrito na literatura estudo metagenômico de amostras de água

para hemodiálise. Farhat *et al.* (2019) encontraram cerca de 85 mil sequencias genéticas correspondentes ao domínio bacteriano em 0,5L de água de torneira de unidades hospitalares. A possível explicação para a concentração do número de sequencias deste estudo ser menor é a origem da amostra A, composta por água da torneira e água tratada por filtração (multi-meio, abrandador e carvão ativado), os filtros possuem a capacidade de reduzir a carga bacteriana.

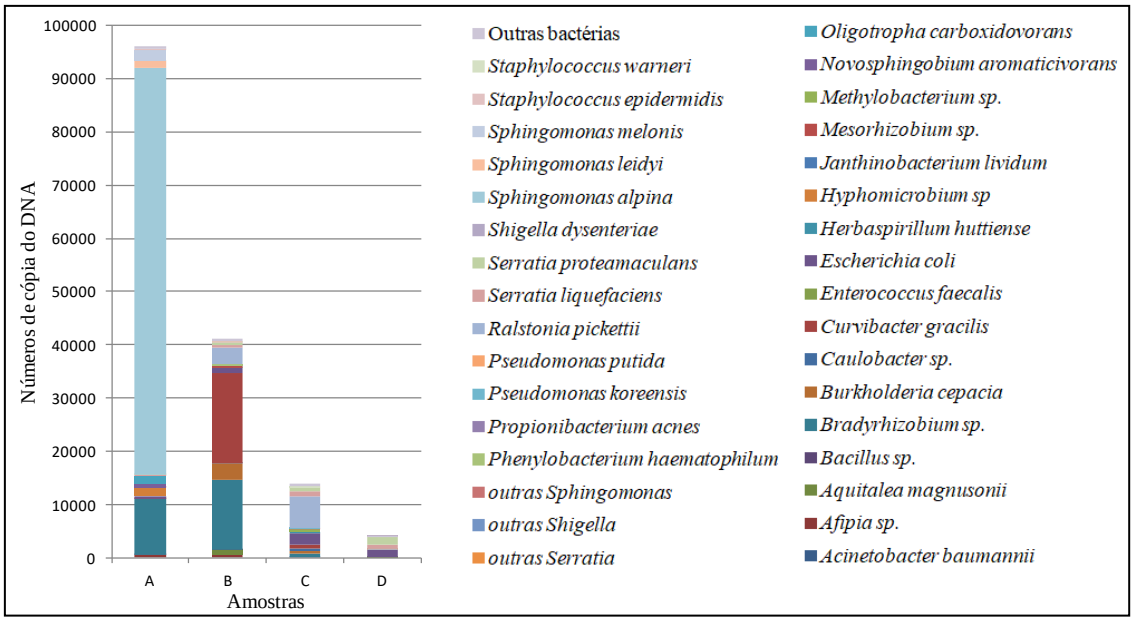

Figura 4.2 – Distribuição do número de sequencias genéticas da região V3 e V4 do RNAr e as espécies identificadas em amostras de água e filtro do sistema de tratamento de água para hemodiálise.

Apenas duas sequencias de RNAr amplificados foram inconclusivas neste estudo e todas as outras foram identificadas a nível de espécie. O estudo de Chao *et al.* (2013) em amostras de água bruta e tratada evidenciou cerca de 72 a 85% leituras desconhecidas e o estudo de Farhat *et al.* (2019) foram 4,9% de sequências não identificadas.

Bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria foram 99% das sequencias identificadas no presente estudo, esta dominância foram descritas em água potável (Poitelon *et al*. 2009; Shi *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2018; Farhat *et al.*, 2019). A prevalência deste filo em água de abastecimento está relacionada à sobrevivência a desinfecção por cloração (Shi *et al.*, 2013).

O sistema de tratamento de água para hemodiálise foi capaz de remover 95% das bactérias identificadas nas amostras da água de entrada do sistema até o dialisato. A composição da comunidade bacteriana presente nas amostras de água mudou a cada etapa de tratamento estudado, a diversidade das espécies pode ser visualizada na figura 4.3.

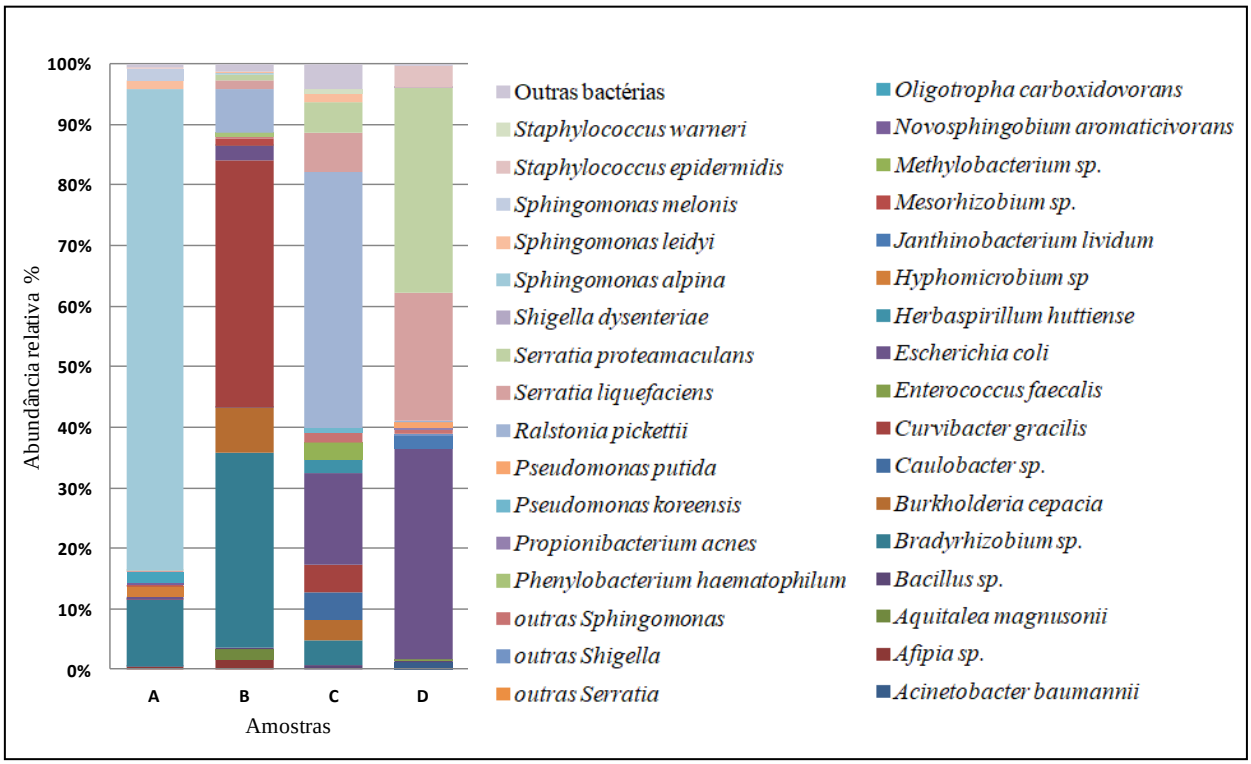

Figura 4.3 Abundancia relativa das espécies identificadas por análises de metagenômica em amostras de água e filtro do sistema de tratamento para hemodiálise.

A *Sphingomonas alpina* foi à espécie de maior prevalência na amostra A, correspondendo cerca de 80% das espécies identificadas. É comumente encontrada a presença de *Sphingomonas sp.*em água de torneira hospitalar. Além disso, este microrganismo pode apresentar padrão de resistência aos antimicrobianos de forma intrínseca e/ou adquirida e potencial formador de biofilme. Portanto, um patógeno oportunista em infecções hospitalares (Narciso-da-Rocha *et al.*, 2014).

Foi identificada na amostra B a presença de sequencias relacionada a espécies com potencial patogênico, como por exemplo, a *Escherichia coli*, *Serratia sp*., *Burkholderia cepacia* e *Ralstonia pickettii*, descritas em infecções em pacientes em hemodiálise (Novosad *et al.*, 2019; Magalhães *et al.*, 2003; Tejera *et al.*, 2016; Sahli *et al.*, 2017;

Thet *et al.*, 2019). As bactérias mais prevalentes nesta amostra foram *Curvibacter gracilis*, cerca de 40%, *Bradyrhizobium sp.*, com cerca de 27%, seguidas das *Burkholderia cepacia* e *Ralstonia pickettii*, com 7% cada. As bactérias *Curvibacter sp.* e *Bradyrhizobium sp.*, tem sido relatadas em águas oligotróficas (Douterelo & Boxall, 2014; Vandermaesen *et al.*, 2017). A ocorrência das bactérias *Burkholderia cepacia* e *Ralstonia pickettii* em amostras de água destinada a hemodiálise foram descritas, por metodologias de cultivo convencionais, por Lima *et al.* (2005), Borges *et al.*, (2007); Oumokhtar *et al.* (2013) e Chen *et al.* (2017).

A análise da amostra do filtro pré-máquina de hemodiálise mostrou a retenção de cerca de 14 mil sequencias gênicas bacterianas, nas quais a *Ralstonia picketti* correspondeu a aproximadamente 40%. O filtro foi responsável por reter 99,9% das bactérias *Ralstonia picketti*. Além disso, estava presente no filtro a *E. coli e Serratia sp.*, correspondendo a 15% e 6%, respectivamente, porém essas espécies estiveram significativamente presentes no dialisato.

O dialisato apresentou cerca de 4 mil sequencias genômicas, correspondentes as espécies *Escherichia coli* (34%), *Serratia liquefaciens* (33%), *Serratia proteamaculans* (20%), *Staphylococcus epidermidis* (3%), *Janthinobacterium lividum* (2%) entre outras. A bactéria *S. epidermidis* apresenta elevada incidência de infecções em pacientes em hemodiálise por meio do acesso do cateter venoso, esta bactéria é comumente encontrada na pele, mas também possui origem ambiental, como a água (Suzuki *et al.*, 2016; Villalon *et al.*, 2018; Noor *et al.*, 2019). A *Janthinobacterium spp.* é descrita como colonizadora primária no processo de formação de biofilme (Douterelo & Boxall, 2014). Liu *et al.* (2016) descreveram que a *Ralstonia sp*. serve como ponte de ligação para outras bactérias, inclusive a *E. coli*, na formação do biofilme. O problema do biofilme no sistema de tratamento e distribuição da água para hemodiálise é a recontaminação da água, dificuldade de ação dos desinfetantes e assim apresentando alto risco a saúde dos pacientes (Montanari *et al.*, 2009; Hoench *et al.*, 2006; Suman *et al.*, 2013).

4.4 CONCLUSÕES

A estrutura da comunidade bacteriana mudou ao longo do sistema de tratamento e a maioria das espécies identificadas pertence ao filo *Proteobacteria*. O sistema de tratamento da água para hemodiálise foi 95% eficiente na remoção de sequências genéticas bacterianas, demonstrando assim que o dialisato não é estéril e a presença de bactérias apresenta risco à saúde dos pacientes em hemodiálise.

Observação:

Este manuscito será submetido à revista CADERNOS DE SAÚDE PÚBLICA

Avaliação da Capes

CIÊNCIAS AMBIENTAIS: A2

ENGENHARIAS I: B1

CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

O monitoramento da qualidade de água no sistema de tratamento para hemodiálise apresentou níveis de concentração do nitrato-N e do fluoreto acima do recomendado pela RDC 11, 2014. Além disso, foram isolados microrganismos, principalmente as BGNNF, com potencial patogênico caracterizando risco a saúde dos pacientes em hemodiálise. Para complementar o estudo do capítulo 2 é recomendado a pesquisa de endotoxina nas amostras de água, correlação das bactérias isoladas e dos nutrientes da água com as respostas fisiológicas e bacteremias dos pacientes em hemodiálise.

Foram encontrados padrões de multirresistência bacteriana nos isolados da água para hemodiálise, foi descrito a resistência a colistina e suscetibilidade a fluoroquinolonas e a piperacilina/tozobactam. Os isolados testados foram suscetíveis aos tratamentos de desinfecção UV, hipoclorito de sódio e ácido peracético. Sugerem-se estudos complementares como a caracterização genética dos isolados, pesquisar genes de virulência e investigar a capacidade de formação de biofilme.

O padrão de diversidade bacteriana no sistema de tratamento de água foi caracteriza e a maioria das espécies identificadas pertence ao filo *Proteobacteria* e a composição ecológica mudou a cada etapa do tratamento pesquisado. O sistema de tratamento da água para hemodiálise foi 95% eficiente na remoção de sequências genéticas bacterianas, demonstrando assim que o dialisato não é estéril e a presença de bactérias apresenta risco à saúde dos pacientes em hemodiálise. A complementação deste estudo pode ser a investigação da circulação de genes de resistência aos antimicrobianos. Avaliação da dinâmica de formação de biofilme por análises de proteínas circulantes nas tubulações de distribuição de água. Investigar alterações da comunidade bacteriana após ação de desinfetantes.

REFERÊNCIAS

AAMI (Association For The Advancement Of Medical Instrumentation) Disponível em: http://www.aami.org/productspublications/ProductDetail.aspx?ItemNumber=920 (ùltimo acesso: 04/03/2017).

Abbott IJ & Peleg AY. (2015). *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, and nonmelioid *Burkholderia* species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies. Semin Respir. Crit Care Med. 36(1):99-110.

AbdulWahab, A., Taj-Aldeen, S. J., Ibrahim, E. B., Talaq, E., Abu-Madi, M., & Fotedar, R. (2015). Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infection and drug resistance*, *8*, 83. doi: 10.2147/IDR.S80341

Adapa, S., Gumaste, P., Konala, V. M., Agrawal, N., Garcha, A. S., & Dhingra, H. (2018). Peritonitis due to Moraxella osloensis: an emerging pathogen. *Case reports in nephrology*, *2018*. doi: 10.1155/2018/4968371

Agar, J. W., Perkins, A., & Heaf, R. J. G. (2016). Hemodialysis: Infrastructure, Water, and Machines in the Home. *Implementing Hemodialysis in the Home*, 181.

Agarwal, S., Kakati, B., Khanduri, S., & Gupta, S. (2017). Emergence of carbapenem resistant non-fermenting gram-negative bacilli isolated in an ICU of a tertiary care hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *11*(1), DC04. doi: 10.7860/JCDR/2017/24023.9317

Ahmad, S. (2005). Essentials of water treatment in hemodialysis. *Hemodialysis International*, *9*(2), 127-134.

Alby, K., Gilligan, P. H., & Miller, M. B. (2013). Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms for the identification of Gram-negative rods from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, *51*(11), 3852-3854.,

Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, *128*(6), 1037-1050. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.004

Ali-Taleshi, M. S., & Nejadkoorki, F. (2016). Characterization of Hemodialysis Reverse Osmosis Wastewater From Yazd Educational Hospitals. *Avicenna Journal of Environmental Health Engineering*, *3*(1). doi: 10.17795/ajehe-5067.

Almeida, A. R., Passig, F. H., Pagioro, T. A., do Nascimento, P. T. H., & de Carvalho, K. Q. (2016). Remoção de microcistina-LR da Microcystis aeruginosa utilizando bagaço de cana-de-açúcar in natura e carvão ativado. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, *11*(1), 188-197. doi: 10.4136/1980-993X

Almuzara, M. N., Barberis, C. M., Rodríguez, C. H., Famiglietti, A. M., Ramirez, M. S., & Vay, C. A. (2012). First report of an extensively drug-resistant VIM-2 metallo-β-lactamase-producing brevundimonas diminuta clinical isolate. *Journal of clinical microbiology*, *50*(8), 2830-2832. doi:: 10.1128 / JCM.00924-12

Al-Naseri, S. K., Mahdi, Z. M., & Hashim, M. F. (2013). Quality of water in hemodialysis centers in B aghdad, I raq. *Hemodialysis International*, *17*(4), 517-522. doi: 10.1111/hdi.12027

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th ed. 2005; Washington.

Andreoli, M. C. C.; Nadaletto, M. A. Diálise. Disponível em: < http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?dialise&menu=8> Acesso em 11/12/2016.

Anvisa. (2007). Mecanismos de acção. em Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Visualizado a Dezembro 20, 2019, no http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm

APHA-American Public Health Association; AWWAAmerican Water Works Association; WEF-Water Environment Federation. Standard methods of examination of water and wastewater. 21th ed. Washington, D.C.: APHA/AWWA/WEF, 2005.

Arvanitidou, M., Spaia, S., Velegraki, A., Pazarloglou, M., Kanetidis, D., Pangidis, P., ... & Katsouyannopoulos, V. (2000). High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection*, *45*(3), 225-230. doi: 10.1053/jhin.2000.0763

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*(1), 180-185. doi: **10.1046/j.1365-2672.2003.01966.x**

Baquero, F., Martínez, J. L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current opinion in biotechnology*, *19*(3), 260-265. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.006

Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *Drugs in context*, *7*. doi: 10.7573/dic.212527

Basso, M., Venditti, C., Raponi, G., Navazio, A. S., Alessandri, F., Giombini, E., ... & Venditti, M. (2019). A case of persistent bacteraemia by Ralstonia mannitolilytica and Ralstonia pickettii in an intensive care unit. *Infection and drug resistance*, *12*, 2391. doi: 10.2147 / IDR.S206492

Birlutiu, R. M., Roman, M. D., Cismasiu, R. S., Fleaca, S. R., Popa, C. M., Mihalache, M., & Birlutiu, V. (2017). Sonication contribution to identifying prosthetic joint infection with Ralstonia pickettii: a case report and review of the literature. *BMC musculoskeletal disorders*, *18*(1), 311. doi: 10.1186 / s12891-017-1678-y

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, *13*(1), 42-51. doi:10.1038/nrmicro3380

Boattini, M., Bianco, G., Biancone, L., Cavallo, R., & Costa, C. (2018). Ralstonia mannitolilytica bacteraemia: a case report and literature review. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, *26*(4), 374-378.

Bolasco, P. (2019). The production of on-line dialysis water for extracorporeal dialysis: proposals for an increased safety upgrade: a viewpoint. *Journal of Nephrology*, 1-11. DOI https://doi-org.ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s40620-019-00667-2

Bosshard, P. P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M., & Böttger, E. C. (2006). 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the

clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, *44*(4), 1359-1366. DOI: 10.1128/JCM.44.4.1359-1366.2006

Braimoh, R. W., Mabayoje, M. O., Amira, C. O., & Bello, B. T. (2014). Microbial quality of hemodialysis water, a survey of six centers in L agos, N igeria. *Hemodialysis International*, *18*(1), 148-152. **doi: 10.1111/hdi.12070**

BRASIL. ANVISA RDC RDC N.11, de 13 de Março de. Versão disponível em http://campany.com.br/wp-content/uploads/2012/11/RDC-N-11-2014.pdf

Brindle, C. T., Porter, S., Bijlani, K., Arumugam, S., Matias, R., Najafi, R., & Fisher, J. (2017). Preliminary results of the use of a stabilized hypochlorous acid solution in the management of Ralstonia pickettii biofilm on silicone breast implants. *Aesthetic surgery journal*, *38*(suppl_2), S52-S61. doi: 10.1093/asj/sjx229

Bugno, A., Almodóvar, A. A. B., Pereira, T. C., & Auricchio, M. T. (2007). Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, *66*(2), 172-175.

Buzzo, M. L., Bugno, A., Almodovar, A. A. B., Kira, C. S., Carvalho, M. D. F. H., Souza, A. D., & Scorsafava, M. A. (2010). A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, *69*(1), 01-06.

Calderaro, R. V., & Heller, L. (2001). Outbreak of hemolytic reactions associated with chlorine and chloramine residuals in hemodialysis water. *Revista de saude publica*, *35*(5), 481-486. doi: 10.1590/S0034-89102001000500012

Capelletti, R. V., & Moraes, Â. M. (2015). Waterborne microorganisms and biofilms related to hospital infections: strategies for prevention and control in healthcare facilities. *Journal of water and health*, *14*(1), 52-67. doi: 10.2166/wh.2015.037

Cappelli, G., & Inguaggiato, P. (2004). Water treatment for contemporary hemodialysis. In *Replacement of Renal Function by Dialysis* (pp. 491-503). Springer, Dordrecht.

Cappelli, G., Riccardi, M., Perrone, S., Bondi, M., Ligabue, G., & Albertazzi, A. (2006). Water treatment and monitor disinfection. *Hemodialysis International*, *10*, S13-S18. doi: **10.1111/j.1542-4758.2006.01184.x**

Cassini, S.T.,. Gonçalves, R.F e. Zandonate, M.A.M., marques. Detecção simplificada de coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de águas utilizando substrato cromogênico em microplacas e metodologia NMP. In "III Caderno de Pesquisas" FUNASA. Brasilia. 256pp., 2010. http://www.funasa.gov.br/site/wpcontent/files_mf/estPesq_ProgrPesqSauPub.pdf

Chandra, A., Das, A., Sen, M., & Srivastava, D. (2016). Haemodialysis catheter-related blood stream infection in ESRD patients: incidence, outcome and antibiogram of the isolated organisms. *Int J Adv Med [Internet]*, *24*, 912-9.

Chao, Y., Ma, L., Yang, Y., Ju, F., Zhang, X. X., Wu, W. M., & Zhang, T. (2013). Metagenomic analysis reveals significant changes of microbial compositions and protective functions during drinking water treatment. *Scientific reports*, *3*, 3550. doi: 10.1038 / srep03550

Chen, L., Zhu, X., Zhang, M., Wang, Y., Lv, T., Zhang, S., & Yu, X. (2017). Profiling Total Viable Bacteria in a Hemodialysis Water Treatment System. *Journal of microbiology and biotechnology*, *27*(5), 995-1004. doi: 10.4014/jmb.1612.12002

CLSI. (2014). Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant: Approved Guideline. CLSI document H60-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Coenye, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. J. (2002). Infection by Ralstonia species in cystic fibrosis patients: identification of R. pickettii and R. mannitolilytica by polymerase chain reaction. *Emerging infectious diseases*, *8*(7), 692. doi: 10.3201 / eid0807.010472

Coil, D., Jospin, G., & Darling, A. E. (2014). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4), 587–589. doi:10.1093/bioinformatics/btu661.

Cordy, P. E., Gagnon, R., Taves, D. R., & Kaye, M. (1974). Bone disease in hemodialysis patients with particular reference to the effect of fluoride. *Canadian Medical Association Journal*, *110*(12), 1349.

Coulliette, A. D., & Arduino, M. J. (2013). Hemodialysis and water quality. *Seminars in dialysis*, 26(4), 427-438. doi: 10.1111/sdi.12113

Dasgupta, M. K. (2002, October). Biofilms and infection in dialysis patients. In *Seminars in dialysis* (Vol. 15, No. 5, pp. 338-346). Malden, US: Blackwell Science Inc.

Daugirdas, J. T., Blake, P. G., & Ing, T. S. (2003). Aparelho de hemodiálise. In Daugirdas, J. T., Blake, P. G., & Ing, Manual de Diálise. Rio de Janeiro – RJ: Medisi, 3° Ed. Cap 3, 48-67.

de Jesus, P. R., Ferreira, J. A. B., Freitas, H. R., Abrantes, S. D. M. P., & Marin, V. A. (2017). Detection of microorganisms, endotoxins and aluminum in mobile dialysis services. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, *39*(4), 475-479. doi: 10.4025/actascibiolsci.v39i4.31779

de Oliveira, R. M., de los Santos, C. A., Antonello, I., & d´ Avila, D. (2009). Warning: an anemia outbreak due to chloramine exposure in a clean hemodialysis unit—an issue to be revisited. *Renal failure*, *31*(1), 81-83. 10.1080/08860220802546503

Deliberali, B., Myiamoto, K. N., Neto, C. H. D. P. W., Pulcinelli, R. S. R., do Carmo Aquino, A. R., Vizzotto, B. S., & Santos, R. C. V. (2011). Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, *47*(5), 529-534.

Douterelo, I., Sharpe, R., & Boxall, J. (2014). Dinâmica da comunidade bacteriana durante os estágios iniciais da formação de biofilme em um sistema experimental de distribuição de água potável com cloro: implicações para a descoloração da água potável. *Jornal de microbiologia aplicada* , doi: 10.1111/jam.12516

Edens, C., Wong, J., Lyman, M., Rizzo, K., Nguyen, D., Blain, M., ... & Patel, P. R. (2017). Hemodialyzer reuse and gram-negative bloodstream infections. *American Journal of Kidney Diseases*, *69*(6), 726-733. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.09.022

Enoch, D. A., Birkett, C. I., & Ludlam, H. A. (2007). Non-fermentative Gram-negative bacteria. *International journal of antimicrobial agents*, *29*, S33-S41. doi: 10.1016/S0924-8579(07)72176-3

Esmanhoto, C. G., Taminato, M., Fram, D. S., Belasco, A. G. S., & Barbosa, D. A. (2013). Microorganisms isolated from patients on hemodialysis by central venous catheter and related clinical evolution. *Acta Paulista de Enfermagem*, *26*(5), 413-420.

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, *4*, 90-101.

Falagas M. E., Rafailidis P. I. & Matthaiou D. K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist. Update. 13:132-138.

Falagas, M. E., Kasiakou, S. K., & Saravolatz, L. D. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases*, *40*(9), 1333-1341. doi: 10.1086/429323

Fang, Q., Feng, Y., Feng, P., Wang, X., & Zong, Z. (2019). Nosocomial bloodstream infection and the emerging carbapenem-resistant pathogen Ralstonia insidiosa. *BMC infectious diseases*, *19*(1), 334. doi: 10.1186 / s12879-019-3985-4

Farhat , M., Alkharsah, K. R., Alkhamis, F. I., & Bukharie, H. A. (2018). Metagenomic study on the composition of culturable and non-culturable bacteria in tap water and biofilms at intensive care units. *Journal of water and health*, *17*(1), 72-83. doi: 10.2166/wh.2018.213

Ferro, P., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2019). Association between gentamicin resistance and stress tolerance in water isolates of Ralstonia pickettii and R. mannitolilytica. *Folia microbiologica*, *64*(1), 63-72. doi: 10.1007/s12223-018-0632-1

Figel, I. C., Marangoni, P. R. D., Tralamazza, S. M., Vicente, V. A., do Rocio Dalzoto, P., do Nascimento, M. M. F., ... & Pimentel, I. C. (2013). Black yeasts-like fungi isolated from dialysis water in hemodialysis units. *Mycopathologia*, *175*(5-6), 413-420. doi: 10.1007/s11046-013-9633-4

Foote, E.F. & Manley, H.J. (2008) **Hemodialysis and peritoneal dialysis**. In: DIPIRO, J.T.et al. **Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach.** McGraw-Hill Medical, 7th edition, p. O103-O117.

Fram, D., Okuno, M. F. P., Taminato, M., Ponzio, V., Manfredi, S. R., Grothe, C., ... & Barbosa, D. (2015). Risk factors for bloodstream infection in patients at a Brazilian hemodialysis center: a case–control study. *BMC infectious diseases*, *15*(1), 158. doi: 10.1186 / s12879-015-0907-y

Fujioka, T., Hoang, A. T., Aizawa, H., Ashiba, H., Fujimaki, M., & Leddy, M. (2018). Real-time online monitoring for assessing removal of bacteria by reverse osmosis. *Environmental Science & Technology Letters*, *5*(6), 389-393. doi: 10.1021/acs.estlett.8b00200

Fujioka, T., Hoang, A. T., Ueyama, T., & Nghiem, L. D. (2019). Integrity of reverse osmosis membrane for removing bacteria: new insight into bacterial passage. *Environmental Science: Water Research & Technology*, *5*(2), 239-245. doi: 10.1039/c8ew00910d

Gaibor, N. G. T., Sacaluga, L. G., de la Cerda Ojeda, F., Cotén, J. R. M., & Lazo, M. S. (2019). Thermal disinfection in hemodialysis using the A0 concept as dispenser. *Nefrología (English Edition)*.10.1016/j.nefroe.2019.10.006

Gaibor, N. G. T., Sacaluga, L. G., de la Cerda Ojeda, F., Cotén, J. R. M., & Lazo, M. S. (2019). Thermal disinfection in hemodialysis using the A0 concept as dispenser. *Nefrología (English Edition)*.10.1016/j.nefroe.2019.10.006

Gales, A. C., Jones, R. N., Andrade, S. S., & Sader, H. S. (2005). Antimicrobial susceptibility patterns of unusual nonfermentative gram-negative bacilli isolated from Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(6), 571-577. doi: 10.1590/S0074-02762005000600011

Geisinger, E., Huo, W., Hernandez-Bird, J., & Isberg, R. R. (2019). Acinetobacter baumannii: Envelope Determinants That Control Drug Resistance, Virulence, and Surface Variability. *Annual review of microbiology*, *73*, 481-506.

Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D β-lactamase from Ralstonia pickettii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *48*(11), 4217-4225. doi: 10.1128/AAC.48.11.4217-4225.2004

Glorieux, G., Neirynck, N., Veys, N., & Vanholder, R. (2012). Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *27*(11), 4010-4021. doi: 10.1093/ndt/gfs306

Gomila, M., Gasco, J., Gil, J., Bernabeu, R., Inigo, V., & Lalucat, J. (2006). A molecular microbial ecology approach to studying hemodialysis water and fluid. *Kidney international*, *70*(9), 1567-1576. doi: 10.1038/sj.ki.5001756

Gottschalk, C.W. & Fellner, S.K. (1997) History of the science of dialysis. Am J Nephrol; North Carolina, USA, 17(3-4): 289-98.

Green, H. D., Bright-Thomas, R., Kenna, D. T., Turton, J. F., Woodford, N., & Jones, A. M. (2017). Ralstonia infection in cystic fibrosis. *Epidemiology & Infection*, *145*(13), 2864-2872. doi:10.1017/S0950268817001728

Grothe, C., Belasco, A. G. D. S., Bittencourt, A. R. D. C., Vianna, L. A. C., Sesso, R. D. C. C., & Barbosa, D. A. (2010). Incidence of bloodstream infection among patients on hemodialysis by central venous catheter. *Revista latino-americana de enfermagem*, *18*(1), 73-80.

Guyton, A.C. & Hall, J.E. (1996). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, Saunders & Company.

Hilborn, E. D., Soares, R. M., Servaites, J. C., Delgado, A. G., Magalhães, V. F., Carmichael, W. W., & Azevedo, S. M. (2013). Sublethal microcystin exposure and biochemical outcomes among hemodialysis patients. *PLoS One*, *8*(7), e69518. doi: 10.1371/journal.pone.0069518

Hoenich, N. A., & Levin, R. (2003). Renal research institute symposium: The implications of water quality in hemodialysis. *Seminars in dialysis*, 16(6), 492-497. doi: 10.1046/j.1525-139x.2003.16106.x

Hoenich, N. A., Ronco, C., & Levin, R. (2006). The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood purification*, *24*(1), 11-18. doi: 10.1159/000089430

Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, *387*(10014), 176-187.

Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(Supplement_1), S9-S15. doi 10.1086/319370

Huang, X. (1999). CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*, 9(9), 868–877. doi:10.1101/gr.9.9.868.

Isakozawa, Y., Migita, H., & Takesawa, S. (2016). Efficacy of biofilm removal from hemodialysis piping. *Nephro-urology monthly*, *8*(5). doi: 10.5812/numonthly.39332

Isidre, R. A. S., Acosta, F. R., Vargas, C. R. C., Romero, G. A. V., Perrota, J. F. P., & Fretes, R. M. G. (2017). Molecular Characterization of Staphylococcus aureus Isolates Obtained from Hemodialyzed Patients at the Hospital de Clínicas of Paraguay: A pilot study. *International Journal of Medical Students*, *5*(1), 14-19. doi: 10.5195/ijms.2017.172

Jaber, B. L. (2005). Bacterial infections in hemodialysis patients: pathogenesis and prevention. *Kidney international*, *67*(6), 2508-2519. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00364.x

Jamil, B., Bokhari, M. T., Saeed, A., Bokhari, M. Z. M., Hussain, Z., Khalid, T., ... & Abbasi, S. A. (2016). Bacteremia: Prevalence and antimicrobial resistance profiling in chronic kidney diseases and renal transplant patients. *J Pak Med Assoc*, *66*(6), 705-9.

Jassem, A. N., Zlosnik, J. E., Henry, D. A., Hancock, R. E., Ernst, R. K., & Speert, D. P. (2011). In vitro susceptibility of Burkholderia vietnamiensis to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(5), 2256-2264.doi:10.1128/AAC.01434-10

Kaarup, S., Olesen, B., Pourarsalan, M., Boesby, L., & Brandi, L. (2016). A Retrospective Quality Study of Hemodialysis Catheter-Related Bacteremia in a Danish Hospital. *Open Journal of Nephrology*, *6*(4), 111-121. doi: 10.4236/ojneph.2016.64014

Kampf G. (2018) Ácido Peracético. In: Administração anti-séptica. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-98785-9_5

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*, *33*(3), 300. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15

Kasparek, T., & Rodriguez, O. E. (2015). What medical directors need to know about dialysis facility water management. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(6), 1061-1071. doi: 10.2215/CJN.11851214

Khedher, M. B., Baron, S. A., Riziki, T., Ruimy, R., Diene, S. M., & Rolain, J. M. (2019). Massive analysis of 64'628 bacterial genomes to decipher a water reservoir and origin of mobile colistin resistance (mcr) gene variants: is there another role for this family of enzymes?. *BioRxiv*, 763474. doi: 10.1101/763474,

Kieffer, N., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). Moraxella species as potential sources of MCR-like polymyxin resistance determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(6), e00129-17. doi: 10.1128/AAC.00129-17

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W.M.; Schereckenberger, P.C.; Winn JR, W. C.; Procop, G. W.; Woods, G.L. (2008) Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Kulakov, L. A., McAlister, M. B., Ogden, K. L., Larkin, M. J., & O'hanlon, J. F. (2002). Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(4), 1548-1555. **doi:** 10.1128/AEM.68.4.1548-1555.2002

Layman-Amato, R., Curtis, J., & Payne, G. M. (2013). Water treatment for hemodialysis: An update. *Nephrol Nurs J*, *40*(5), 383-404.

Layman-Amato, R., Curtis, J., & Payne, G. M. (2013). Water treatment for hemodialysis: An update. *Nephrol Nurs J*,*40*(5), 383-404.

leme, I.L. & Silva, V.G. (2003) Recomendações para a garantia da qualidade da água para uso em unidades de hemodiálise. Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes.

Lima, J. D. R. O., Marques, S. G., Gonçalves, A. G., Salgado Filho, N., Nunes, P. C., Silva, H. S., ... & Costa, J. M. L. (2005). Microbiological analyses of water from

hemodialysis services in São Luís, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, *36*(2), 103-108. doi: 10.1590/S1517-83822005000200001

Liu, C., Kwon, M. J., Kim, M., Byun, J. H., Yong, D., & Lee, K. (2019). Septicemia Caused by Herbaspirillum huttiense Secondary to Pneumonia. doi: 10.3343/alm.2019.39.3.340

Liu, N. T., Bauchan, G. R., Francoeur, C. B., Shelton, D. R., Lo, Y. M., & Nou, X. (2016). Ralstonia insidiosa serves as bridges in biofilm formation by foodborne pathogens Listeria monocytogenes, Salmonella enterica, and Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Food Control*, *65*, 14-20. doi: /10.1016/j.foodcont.2016.01.004

Liu, N. T., Nou, X., Lefcourt, A. M., Shelton, D. R., & Lo, Y. M. (2014). Dual-species biofilm formation by Escherichia coli O157: H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities. *International journal of food microbiology*, *171*, 15-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.007

Magalhaes, 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*(2), 120-123. doi: 10.1016/S0195-6701(03)00118-X

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... & Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, *18*(3), 268-281. doi: **10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x**

McGowan Jr, J. E. (2006). Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *American journal of infection control*, *34*(5), doi: S29-S37. 10.1016/j.ajic.2006.05.226

Mo, Q., Lou, T., Wang, L., Zhong, H., Dong, Y., Ma, D., ... & Fan, Y. (2016). Molecular mechanism of drug resistance of non-fermentative Gram-negative bacteria in hospitals. *International journal of clinical and experimental pathology*, *9*(3), 3586-3592.

Montanari, L. B., Sartori, F. G., Cardoso, M. J. D. O., Varo, S. D., Pires, R. H., Leite, C. Q. F., ... & Martins, C. H. G. (2009). Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *51*(1), 37-43. doi: 10.1590/S0036-46652009000100007

Montanari, L. B., Sartori, F. G., Ribeiro, D. B. M., Leandro, L. F., Pires, R. H., Melhem, M. D. S. C., ... & Martins, C. H. G. (2017). Yeast isolation and identification in water used in a Brazilian hemodialysis unit by classic microbiological techniques and Raman spectroscopy. *Journal of water and health*, *16*(2), 311-320. doi: 10.2166/wh.2017.334

Morin, P. (2000). Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *Journal of Hospital Infection*, *45*(3), 218-224.

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Yolken, R.H. (1999) Manual of clinical Microbiology. 7. ed. Washington, American Society for Microbiology.

Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., & Manaia, C. M. (2014). Genotypic diversity and antibiotic resistance in Sphingomonadaceae isolated from hospital tap water. *Science of the Total Environment*, *466*, 127-135. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.109

Nasir, N., Sayeed, M. A., & Jamil, B. (2019). Ralstonia pickettii Bacteremia: An Emerging Infection in a Tertiary Care Hospital Setting. *Cureus*, *11*(7). doi: 10.7759/cureus.5084

Noor, S. O., Alhazmi, S., Alshamrani, M., Farahat, F., Al-Hejin, A. M., & Najjar, A. (2019). Prevalence of Systemic Infection among Chronic Hemodialysis Patients in Jeddah City, Saudi Arabia: A Retrospective Study. *World Journal of Medical Sciences*, *16*(1), 26-34. doi: 10.5829/idosi.wjms.2019.26.34

Nordmann, P., Poirel, L., Kubina, M., Casetta, A., & Naas, T. (2000). Biochemical-Genetic Characterization and Distribution of OXA-22, a Chromosomal and Inducible Class D β-Lactamase fromRalstonia (Pseudomonas) pickettii. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(8), 2201-2204. doi: 10.1128 / aac.44.8.2201-2204.2000

Novosad, S. A., Lake, J., Nguyen, D., Soda, E., Moulton-Meissner, H., Pho, M. T., ... & Turabelidze, G. (2019). Multicenter outbreak of Gram-negative bloodstream

infections in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.05.012

Nystrand, R. (2008). Microbiology of water and fluids for hemodialysis. *Journal of the Chinese Medical Association*, *71*(5), 223-229.

Oh, S., Hammes, F., & Liu, W. T. (2018). Metagenomic characterization of biofilter microbial communities in a full-scale drinking water treatment plant. *Water research*, *128*, 278-285. doi:10.1016/j.watres.2017.10.054

Okunola, O. O., & Olaitan, J. O. (2016). Bacterial contamination of hemodialysis water in three randomly selected centers in South Western Nigeria. *Nigerian journal of clinical practice*, *19*(4), 491-495. doi: 10.4103/1119-3077.183293

Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J. M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, *5*, 643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643

Oliveira, L. T., Lopes, L. G., Ramos, S. B., Martins, C. H. G., Jamur, M. C., & Pires, R. H. (2018). Fungal biofilms in the hemodialysis environment. *Microbial pathogenesis*, *123*, 206-212. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.018

Orme, J., Rivera-Bonilla, T., Loli, A., & Blattman, N. N. (2015). Native Valve Endocarditis due to Ralstonia pickettii: A case report and literature review. *Case reports in infectious diseases*, *2015*. doi: 10.1155 / 2015/324675

Ortiz,R O. A., & Rios-González, C. M. (2017). Outbreak of Burkholderia cepacia in a hemodialysis unit of Paraguay, 2014. *Journal of infection and public health*, *10*(5), 688.

Oumokhtar, B., Lalami, A. E. O., Mahmoud, M., Berrada, S., Arrayhani, M., & Houssaini, T. S. (2013). Prevent infection linked to the dialysis water in a hemodialysis center in Fez city (Morocco). *The Pan African Medical Journal*, *16*. doi: 10.11604/pamj.2013.16.122.2877

Ourives, A. P. J., Gonçalves, S. S., Siqueira, R. A., Souza, A. C. R., Canziani, M. E. F., Manfredi, S. R., ... & Colombo, A. L. (2016). High rate of Candida deep-seated infection in patients under chronic hemodialysis with extended central venous

catheter use. *Revista iberoamericana de micología*, *33*(2), 100-103. doi: 10.1016/j.riam.2015.10.002,

Owusu, M., Acheampong, G., Annan, A., Marfo, K. S., Osei, I., Amuasi, J., ... & Kuo, C. H. (2019). Ralstonia mannitolilytica sepsis: a case report. *Journal of medical case reports*, *13*(1), 1-4. doi: 10.1186 / s13256-019-2235-0

Park, SK e Hu, JY (2010). Assessment of the extent of bacterial growth in reverse osmosis system for improving drinking water quality. *Journal of Environmental Science and Health Part A* ,*45*(8), 968-977. doi:10.1080/10934521003772386

Parmar, M. S. (2002). Chronic renal disease. *Bmj*, *325*(7355), 85-90. doi: 10.1136 / bmj.325.7357.207

Peresi, J. T. M., Almeida, I. A. Z. C. D., Teixeira, I. S. D. C., Silva, S. I. D. L., Alves, E. C., Marques, D. F., & Ribeiro, A. K. (2011). Pseudomonas aeruginosa: the occurrence and the antimicrobial susceptibility of bacteria isolates from treated water samples utilized for preparing dialysis solution. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, *70*(4), 542-547.

Perry, A., Gould, F. K., Brodlie, M., Chroinin, M. N., Mullane, D., Plant, B., ... & Kenna, D. (2015). 59 Ralstonia mannitolilytica–an emerging threat in cystic fibrosis and lung transplantation. *Journal of Cystic Fibrosis*, *14*, S72. doi: 10.1016/S1569-1993(15)30236-8

Pires, R. H., da Silva, J. D. F., Martins, C. H. G., Almeida, A. M. F., Soares, C. P., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2013). Effectiveness of disinfectants used in hemodialysis against both Candida orthopsilosis and C. parapsilosis sensu stricto biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(5), 2417-2421. Doi: 10.1128 / AAC.01308-12

Poitelon, J. B., Joyeux, M., Welté, B., Duguet, J. P., Prestel, E., Lespinet, O., & DuBow, M. S. (2009). Assessment of phylogenetic diversity of bacterial microflora in drinking water using serial analysis of ribosomal sequence tags. *Water research*, *43*(17), 4197-4206. doi: 10.1016/j.watres.2009.07.020

Pontoriero, G., Pozzoni, P., Andrulli, S., & Locatelli, F. (2003). The quality of dialysis water. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *18*(7)), vii21-vii25. doi: 10.1093/ndt/gfg1074

Pop-Vicas, A., Strom, J., Stanley, K., & D'Agata, E. M. (2008). Multidrug-resistant gram-negative bacteria among patients who require chronic hemodialysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *3*(3), 752-758. Doi: /10.2215/CJN.04651107

Prior, A. R., Gunaratnam, C., & Humphreys, H. (2017). Ralstonia species–do these bacteria matter in cystic fibrosis?. *Paediatric respiratory reviews*, *23*, 78-83. https://doi.org/10.1016/j.prrv.2016.09.005

Pyrgos, V., Ratanavanich, K., Donegan, N., Veis, J., Walsh, T. J., & Shoham, S. (2009). Candida bloodstream infections in hemodialysis recipients. *Sabouraudia*, *47*(5), 463-467. doi: 10.1080/13693780802369332

Rafee, M. H.B.M.; Sudigdoadi, S. & Dewanto, J. B. (2016). Isolated Bacteria from Hemodialysis Water Distribution Systems in Hemodialysis Centers in Bandung. *Althea Medical Journal*, *3*(2), 259-264.

Rhodes, K. A., & Schweizer, H. P. (2016). Antibiotic resistance in Burkholderia species. *Drug Resistance Updates*, *28*, 82-90. doi: 10.1016/j.drup.2016.07.003

Riella, (2010) M. C. Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos (5ª Edição ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Rojas-Moreno, C. A., Spiegel, D., Yalamanchili, V., Kuo, E., Quinones, H., Sreeramoju, P. V., & Luby, J. P. (2016). Catheter-related bloodstream infections in patients on emergent hemodialysis. *infection control & hospital epidemiology*, *37*(3), 301-305. doi: 10.1017/ice.2015.293

Ruppé, É., Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of intensive care*, *5*(1), 21. doi: 10.1186/s13613-015-0061-0

Rutala, W. A., & Weber, D. J. (2008). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008.

Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2013). The antibiotic susceptibility of water-based bacteria Ralstonia pickettii and Ralstonia insidiosa. *Journal of medical microbiology*, *62*(7), doi: 1025-1031. **10.1099/jmm.0.054759-0**

Ryan, M. P., & Adley, C. C. (2014). Ralstonia spp.: emerging global opportunistic pathogens. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, *33*(3), 291-304. doi: 10.1007/s10096-013-1975-9

Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2018). Brevundimonas spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, *9*(1), 480-493. doi: 10.1080/21505594.2017.1419116

Sader, H. S., & Jones, R. N. (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *International journal of antimicrobial agents*, *25*(2), 95-109. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.10.002

Sahli, F., Feidjel, R., & Laalaoui, R. (2017). Hemodialysis catheter-related infection: rates, risk factors and pathogens. *Journal of infection and public health*, *10*(4), 403-408. doi: 10.1016/j.jiph.2016.06.008

Saxena, A. K., & Panbotra, B. R. (2005). Haemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention. *Swiss medical weekly*, *135*(9-10), 127-138.

SBN, Sociedade Brasileira de Nefrologia. [atualizada em 2011; acesso em: 25 de agosto de 2011]. Disponível em: http://www.sbn.org. (Último acesso: 05/02/2017).

SBN, 2019 - Sociedade Brasileira de Nefrologia.. Disponível em: https://sbn.org.br/publico/tratatamentos/dialise-peritoneal/ (Último acesso: 05/12/2019).

Scheich, S., Weber, S., Reinheimer, C., Wichelhaus, T. A., Hogardt, M., Kempf, V. A., ... & Steffen, B. (2018). Bloodstream infections with gram-negative organisms and the impact of multidrug resistance in patients with hematological malignancies. *Annals of hematology*, *97*(11), 2225-2234. doi: 10.1007/s00277-018-3423-5

Schweizer, H. P. (2012). Mechanisms of antibiotic resistance in Burkholderia pseudomallei: implications for treatment of melioidosis. *Future microbiology*, *7*(12), 1389-1399. doi: 10.2217/fmb.12.116

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.

SESA, 2013 (Secretária de saúde do Paraná). Resolução Secretaria da saúde nº 437/2013. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/RESOLUCAO2013/Resolucao4372013.pdf. ùltimo acesso 09 de dezembro de 2019.

Sesso, R. C., Lopes, A. A., Thomé, F. S., Lugon, J. R., & Martins, C. T. (2017). Brazilian chronic dialysis survey 2016. *Brazilian Journal of Nephrology*, *39*(3), 261-266. doi: 10.5935/0101-2800.20170049

Sesso, R. C., Lopes, A. A., Thomé, F. S., Lugon, J. R., & Martins, C. T. (2016). Inquérito brasileiro de diálise crônica 2014. *Brazilian Journal of Nephrology*, *38*(1), 54-61.

Shankar, M., Rampure, S., Siddini, V., & Ballal, H. S. (2018). Outbreak of Ralstonia mannitolilytica in hemodialysis unit: A case series. *Indian journal of nephrology*, *28*(4), 323. doi: 10.4103 / ijn.IJN_77_17

Sheth, R. A., & Sheth, A. U. (2017). A Primer on Hemodialysis From an Interventional Radiology Perspective. *Techniques in vascular and interventional radiology*, *20*(1), 9-13. doi: 10.1053/j.tvir.2016.11.003

Shi, P., Jia, S., Zhang, X. X., Zhang, T., Cheng, S., & Li, A. (2013). Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water research*, *47*(1), 111-120. doi: 10.1016/j.watres.2012.09.046

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., ... & Arakawa, Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-β-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(12), 5407-5413. doi: 10.1128/JCM.41.12.5407–5413.2003

Shu, Y., Yu, S., Zha, L., Fu, P., & Cui, T. (2017). Catheter-related fungal endocarditis caused by Candida parapsilosis in a hemodialysis patient. *Hemodialysis International*, *21*(4), E66-E68. doi: 10.1111/hdi.12566

Silva, A. L. O. D., & Moreira, J. C. (2009). Efeitos tóxicos de alguns contaminantes inorgânicos à saúde de pacientes submetidos à hemodiálise. *Caderno de saúde coletiva*, *17*(3).

Silva, A. M. M., Martins, C. T. B., Ferraboli, R., Jorgetti, V., & Junior, J. E. R. (1996). Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. *Brazilian Journal of Nephrology 18*(2), 180-188.

Soares, R. M., Yuan, M., Servaites, J. C., Delgado, A., Magalhães, V. F., Hilborn, E. D., ... & Azevedo, S. M. (2006). Sublethal exposure from microcystins to renal insufficiency patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Toxicology: An International Journal*, *21*(2), 95-103. doi: 10.1002/tox.20160

Stelzmueller, I., Biebl, M., Wiesmayr, S., Eller, M., Hoeller, E., Fille, M., ... & Bonatti, H. (2006). Ralstonia pickettii—innocent bystander or a potential threat?. *Clinical Microbiology and Infection*, *12*(2), 99-101. doi: **10.1111/j.1469-0691.2005.01309.x**

Stogios, P. J., Cox, G., Zubyk, H. L., Evdokimova, E., Wawrzak, Z., Wright, G. D., & Savchenko, A. (2018). Substrate recognition by a colistin resistance enzyme from Moraxella catarrhalis. *ACS chemical biology*, *13*(5), 1322-1332. doi 10.1021/acschembio.8b00116

Strateva, T., Kostyanev, T., & Setchanova, L. (2012). Ralstonia pickettii sepsis in a hemodialysis patient from Bulgaria. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *16*(4), 400-401. doi: 10.1016/j.bjid.2012.06.010

Suman, E., Varghese, B., Joseph, N., Nisha, K., & Kotian, M. S. (2013). The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *7*(5), 849.

Suman, E., Varghese, B., Joseph, N., Nisha, K., & Kotian, M. S. (2013). The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *7*(5), 849. doi: 10.7860 / JCDR / 2013 / 5118.2956

Suwantarat, N., La'Tonzia, L. A., Romagnoli, M., & Carroll, K. C. (2015). Fatal case of Herbaspirillum seropedicae bacteremia secondary to pneumonia in an end-stage renal disease patient with multiple myeloma. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *82*(4), 331-333. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.011

Suzuki, M. N., Fregonesi, B. M., Machado, C. S., Zagui, G. S., Kusumota, L., Suzuki, A. K., ... & Segura-Muñoz, S. (2019). Hemodialysis Water Parameters as Predisposing Factors for Anemia in Patients in Dialytic Treatment: Application of Mixed Regression Models. *Biological trace element research*, 1-8. doi: 10.1007/s12011-018-1515-7

Suzuki, M., Satoh, N., Nakamura, M., Horita, S., Seki, G., & Moriya, K. (2016). Bacteremia in hemodialysis patients. *World journal of nephrology*, *5*(6), 489.

Svidzinski, T. I. E., Svidzinski, A. E., Posseto, I., de Pádua, R. A. F., & Tavares, T. R. (2007). Eficiência do ácido peracético no controle de staphylococcus aureus meticilina resistente. *Ciência, Cuidado e Saúde*, *6*(3), 312-318.

Tang, X., Bai, Y., Duong, A., Smith, M. T., Li, L., & Zhang, L. (2009). Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environment international*, *35*(8), 1210-1224. doi: 10.1016/j.envint.2009.06.002

Tarrass, F., Benjelloun, M., & Benjelloun, O. (2010). Current understanding of ozone use for disinfecting hemodialysis water treatment systems. *Blood purification*, *30*(1), 64-70. DOI: 10.1159/000317123

Tejera, D., Limongi, G., Bertullo, M., & Cancela, M. (2016). Ralstonia pickettii bacteremia in hemodialysis patients: a report of two cases. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, *28*(2), 195. doi: 10.5935 / 0103-507X.20160033

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, *119*(6), S3-S10. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011

Thet, M.K., Pelobello, M. L. F., Das, M., Alhaji, M. M., Chong, V. H., Khalil, M. A. M., ... & Tan, J. (2019). Outbreak of nonfermentative Gram-negative bacteria (Ralstonia pickettii and Stenotrophomonas maltophilia) in a hemodialysis center. *Hemodialysis International*, *23*(3), E83-E89. doi: 10.1111/hdi.12722

Thet, M.K., Pelobello, M. L. F., Das, M., Alhaji, M. M., Chong, V. H., Khalil, M. A. M., ... & Tan, J. (2019). Outbreak of nonfermentative Gram-negative bacteria (Ralstonia pickettii and Stenotrophomonas maltophilia) in a hemodialysis center. Hemodialysis International, 23(3), E83-E89. doi: 10.1111/hdi.12722

Thomé, F. S., Sesso, R. C., Lopes, A. A., Lugon, J. R., & Martins, C. T. (2019). Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2017. *Brazilian Journal of Nephrology*, *41*(2), 208-214.

Tomazelli, I. B., & Santos, I. R. D. (2000). Pesquisa sobre a eficiência do ácido peracético, álcoo iodado e clorhexidina na desinfecçäo das mäos. *Hig. aliment*, *14*(71), 488-54.

Tong, M. K. H., Wei, W. A. N. G., Tze-Hoi, K. W. A. N., Lawrence, C. H. A. N., & Tak-Cheung, A. U. (2001). Water treatment for hemodialysis. *Hong Kong Journal of Nephrology*, *3*(1), 7-14. 10.1016/S1561-5413(09)60050-8

Tote, K., Horemans, T., Berghe, D. V., Maes, L., & Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, *76*(10), 3135-3142. 10.1128 / AEM.02095-09

Tote, K., Horemans, T., Berghe, D. V., Maes, L., & Cos, P. (2010). Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, *76*(10), 3135-3142.

Vandermaesen, J., Lievens, B., & Springael, D. (2017). Isolation and identification of culturable bacteria, capable of heterotrophic growth, from rapid sand filters of drinking water treatment plants. *Research in microbiology*, *168*(6), 594-607. doi: 10.1016/j.resmic.2017.03.008

Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Falsen, E., & Verschraegen, G. (2004). Wautersia gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including Ralstonia eutropha and related species, and proposal of Ralstonia [Pseudomonas] syzygii (Roberts et al. 1990) comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *54*(2), 317-327. doi: 10.1099/ijs.0.02754-0

Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2017). Ubiquitous and persistent Proteobacteria and other Gram-negative bacteria in drinking water. *Science of the Total Environment*, *586*, 1141-1149. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.104

Verschraegen, G., Claeys, G., Meeus, G., & Delanghe, M. (1985). Pseudomonas pickettii as a cause of pseudobacteremia. *Journal of clinical microbiology*, *21*(2), 278-279.

Vieira, R. G. L., da Silva Moraes, T., de Oliveira Silva, L., Bianchi, T. C., Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R., ... & Martins, C. H. G. (2018). In vitro studies of the antibacterial activity of Copaifera spp. oleoresins, sodium hypochlorite, and peracetic acid against clinical and environmental isolates recovered from a hemodialysis unit. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *7*(1), 14. doi:10.1186/s13756-018-0307-3

Villalon, N., Farzan, N., & Freeman, K. (2018). Rate of bacteremia in the hemodialysis patient presenting to the emergency department with fever: a retrospective chart review. *International Journal of Emergency Medicine*, *11*(1), 29. doi: 10.1186 / s12245-018-0188-5

Vincenti, S., Quaranta, G., De Meo, C., Bruno, S., Ficarra, M. G., Carovillano, S., ... & Laurenti, P. (2014). Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: prevalence and distribution of antibiotic resistant strains. *Science of the Total Environment*, *499*, 47-54. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.041

Vincenti, S., Quaranta, G., De Meo, C., Bruno, S., Ficarra, M. G., Carovillano, S., ... & Laurenti, P. (2014). Non-fermentative gram-negative bacteria in hospital tap water and water used for haemodialysis and bronchoscope flushing: prevalence and distribution of antibiotic resistant strains. *Science of the Total Environment*, *499*, 47-54. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.08.041

Vorbeck-Meister, I., Sommer, R., Vorbeck, F., & Hörl, W. H. (1999). Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, *14*(3), 666-675.

Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Brown, A., ... & Coggeshall, M. (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, *388*(10053), 1545-1602.

Ward, M. H., Jones, R. R., Brender, J. D., De Kok, T. M., Weyer, P. J., Nolan, B. T., ... & Van Breda, S. G. (2018). Drinking water nitrate and human health: an updated review. *International journal of environmental research and public health*, *15*(7), 1557. doi: 10.3390/ijerph15071557

Wei, W., Srinivas, S., Lin, J., Tang, Z., Wang, S., Ullah, S., ... & Feng, Y. (2018). Defining ICR-Mo, an intrinsic colistin resistance determinant from Moraxella osloensis. *PLoS genetics*, *14*(5), e1007389. doi: 10.1371/journal.pgen.1007389

Whistler, T., Sangwichian, O., Jorakate, P., Sawatwong, P., Surin, U., Piralam, B., ... & Peruski, L. (2019). Identification of Gram negative non-fermentative bacteria: How hard can it be?. *PLoS neglected tropical diseases*, *13*(9), e0007729. doi: 10.1371/journal.pntd.0007729

Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current opinion in microbiology*, *13*(5), 589-594.

Wright, G. D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications*, *47*(14), 4055-4061. DOI: 10.1039 / C0CC05111J

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I et al (1995) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol Immunol 39:897–904

Yousefi, M., Saleh, H. N., Yaseri, M., Jalilzadeh, M., & Mohammadi, A. A. (2019). Association of consumption of excess hard water, body mass index and waist circumference with risk of hypertension in individuals living in hard and soft water areas. *Environmental geochemistry and health*, *41*(3), 1213-1221. doi:: 10.1007/s10653-018-0206-9

Zeman, C., Beltz, L., Linda, M., Maddux, J., Depken, D., Orr, J., & Theran, P. (2011). New questions and insights into nitrate/nitrite and human health effects: a retrospective cohort study of private well users' immunological and wellness status. *Journal of environmental health*, *74*(4), 8-19.

Zhang H, Zhang J, Qiao, L. 2013. The *Acinetobacter baumannii* group: a systemic review. World J Emerg Med. 4(3):169–174.

Zhang, H. H., Cortés-Penfield, N. W., Mandayam, S., Niu, J., Atmar, R. L., Wu, E., ... & Shah, M. K. (2018). Dialysis Catheter–related Bloodstream Infections in Patients Receiving Hemodialysis on an Emergency-only Basis: A Retrospective Cohort Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, *68*(6), 1011-1016. doi: 10.1093/cid/ciy555

Zhang, K., Zhou, X., Du, P., Zhang, T., Cai, M., Sun, P., & Huang, C. H. (2017). Oxidation of β-lactam antibiotics by peracetic acid: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. *Water research*, *123*, 153-161. doi: 10.1016/j.watres.2017.06.057