

IZABEL CRISTINA FIGEL

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM SISTEMAS DE ÁGUA DE
DIÁLISE EM CLÍNICAS ESPECIALIZADAS DE CURITIBA, PR**

**Curitiba
2011**

IZABEL CRISTINA FIGEL

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM SISTEMAS DE ÁGUA DE
DIÁLISE EM CLÍNICAS ESPECIALIZADAS DE CURITIBA, PR**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia) do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia R. Dalzoto

**Curitiba
2011**



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

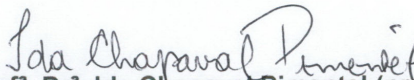
TERMO DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA EM SISTEMAS DE ÁGUA DE DIÁLISE EM CLÍNICAS ESPECIALIZADAS DE CURITIBA, PR”

por

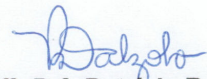
IZABEL FIGEL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof.^a. Dr.^a. Ida Chapaval Pimentel (presidente)


Prof.^a. Dr.^a. Vânia Aparecida Vicente


Prof.^a. Dr.^a. Kazuko Hishida do Nascimento


Prof.^a. Dr.^a. Patrícia R. Dalzoto
Membro Suplente

Curitiba, 28 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus.

Agradeço a toda minha família:

Ao meu filho André e sua namorada Bia, pelo carinho dispensado neste período de estudos.

Ao meu pai João Romeu e minha mãe Maria Delourdes pelo amor incondicional e o incentivo durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Marcos e Márcio, à Carla e Cristina, as quais eu considero como irmãs, e à minhas sobrinhas Ivana, Flávia e Juliana, pelo amor, amizade e companheirismo em todos os momentos de nossas vidas.

Um especial agradecimento a minha tia Maria Rosa, minhas primas Maria Rosalva e Lurdinha pelas palavras de incentivo.

Agradeço aos meus amigos do Instituto de Tecnologia do Paraná:

Carmen, Marta, Maria Paula, Ivete, Eliane, Maristela e Vera que em todos os momentos do trabalho, me auxiliaram no meu serviço, que por várias vezes foi deixado em segundo plano para assistir aulas, realizar coletas, terminar a fase de identificação dos fungos na UFPR e terminar de escrever a dissertação. Obrigada pelo carinho, paciência e incentivo nesta jornada.

Siumara, Alceu, José, Marcio, Franco, Dalila, Grazi, Sirlene, Ibrain, Edinho, Guimarães e a todos os estagiários do laboratório deste período de mestrado, que me ajudaram durante um ano na realização dos testes, preparação de materiais, preparação dos meios de cultura e coletas. Sempre estiveram no meu lado, me apoiando, e sem a ajuda desta equipe eu não teria condições de fazer este trabalho.

Meu sincero agradecimento aos meus amigos do LabMicro: Mariana e Ângela que me ajudaram com as análises sempre que precisei.

À mestranda Sabina Tralamazza obrigada pela grande amizade, pela disponibilidade, pela paciência e ajuda imensurável nos meus primeiros passos na biologia molecular.

Ao doutorando Paulo Marangoni obrigado pela incansável ajuda técnica no sequenciamento das amostras.

Aos meus colegas do mestrado. À Elisa Hizuru Uemura Yamanaka pelo companheirismo e amizade.

Às professoras da UFPR Dra. Ida Gubert pelas sugestões sempre proveitosas e Dra. Larissa Magalhães Alvarenga pela ajuda no envio do projeto ao comitê de ética.

À Prof. Dra. Lucy Ono e Prof. Dr. Silvio M. Zanata pela avaliação do projeto.

Meu especial agradecimento as minhas orientadoras Prof. Dra. Ida Chapaval Pimentel e Prof. Dra. Patrícia Dalzoto, pela paciência, sugestões, incentivo, pelos ensinamentos e confiança depositada.

À Izabel Taraska e Viviam da Secretaria Municipal de Saúde pelas sugestões e por terem aberto as portas das clínicas de hemodiálise, para a realização deste estudo.

As equipes das Clínicas de hemodiálise, que sem a disponibilidade e boa vontade não haveria o material para a realização deste estudo.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná pelo apoio através da disponibilização de materiais e da estrutura do laboratório para a realização dos ensaios, e por me liberar para assistir as aulas e realizar parte dos experimentos na UFPR.

E a UFPR pela disponibilização dos laboratórios, equipamentos e materiais para a realização das análises de biologia molecular e sequenciamento das amostras.

A CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Nós mesmos sentimos que o que fazemos é uma gota no oceano.

Mas o oceano seria menor se essa gota faltasse.

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

No Brasil existe um grande número de pessoas que apresentam insuficiência renal crônica e são submetidos a sessões de diálise. A hemodiálise promove a retirada das substâncias tóxicas, água e sais minerais do organismo através de uma máquina, em clínicas especializadas. A contaminação pelos micro-organismos e endotoxinas nos fluídos de diálise é um grave problema em terapia por hemodiálise e pode ser causada pela água usada para preparação do dialisato. A legislação que regulamenta a qualidade microbiológica da água destinada ao processo de diálise no Brasil é a RDC 154 de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica da água dos sistemas de diálise de clínicas de Curitiba (PR). Foram realizadas análises de contagem de bactérias heterotróficas por plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*), contagem de coliformes totais e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* pelo método do Número mais provável (NMP/100 mL), conforme descrito em APHA; AWWA; WPCF (2005), concentração de endotoxinas bacterianas pelo método *gel-clot* (LAL) conforme USP 31 (2008) e a contagem de fungos seguiram as técnicas de plaqueamento em superfície e filtração por membrana. Os fungos isolados foram identificados por macro e micromorfologia e, os fungos dematiáceos foram identificados por sequenciamento de regiões ITS do rDNA. Verificou-se que na contagem de bactérias heterotróficas 95% das amostras analisadas estavam dentro dos limites estabelecidos; para contagem de coliformes totais 100% das amostras estiveram de acordo com a legislação; para endotoxina bacteriana 85% da água analisada estavam dentro dos padrões; *Pseudomonas aeruginosa* esteve presente em 4% das amostras. Quanto à presença de fungos 26% das amostras apresentaram leveduras e 58% fungos filamentosos. Foram identificados os gêneros *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Beauveria* spp., *Cladosporium* spp., *Exophiala* spp. e *Rinocladiella* spp.. Os fungos dematiáceos estavam presentes em 46% das amostras analisadas, onde 12 isolados da água tratada para diálise e dialisato foram identificados por sequenciamento, sendo encontrados *Exophiala pisciphila*, *Cladophialophora* sp., *Cladosporium cladosporoides*, *Rinocladiella atrovirens* e *Pseudocladosporium* sp.. A presença de fungos dematiáceos e endotoxinas pode apresentar um potencial patogênico à saúde já debilitada dos pacientes.

Palavras-chave: Fungo Dematiáceo. *Pseudomonas aeruginosa*. Água para diálise. Bactérias heterotróficas. *Exophiala*.

ABSTRACT

In Brazil there are a large number of people with chronic renal failure that undergo dialysis sessions. Hemodialysis promotes the removal of toxic substances, water and minerals from the body through a machine, in specialized clinics. The contamination by micro-organisms and endotoxins in the dialysis fluid is a serious problem in hemodialysis therapy and can be caused by water used to prepare the dialysate. The legislation regulating the microbiological quality of water for dialysis process in Brazil is the RDC 154 of 2004 of National Agency of Sanitary Surveillance. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of water systems for dialysis clinics in Curitiba (PR). Were analyzed in terms of number of heterotrophic bacteria by pour plate (Pour Plate), coliform total counts and count of *Pseudomonas aeruginosa* by the method of most probable number (MPN/100mL) as described in APHA, AWWA, WPCF (2005), concentration of bacterial endotoxin by the gel-clot method (LAL) according to USP 31 (2008) and the counting fungus followed the techniques of surface plating and membrane filtration. The isolates were identified by macro-and micromorphology, and the dematiaceous fungi were identified by sequencing the rDNA ITS region. It was found that in the bacteria heterotrophic count 95% of samples were within the established limits; for the total coliform counts, 100% of the samples were in agreement; 85% of the samples analyzed for bacterial endotoxin were within the standards; *Pseudomonas aeruginosa* were present 4% of the samples. For the presence of fungi, 26% of samples presented yeasts and 58% filamentous fungi. Were identified *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Acremonium* spp., *Beauveria* spp., *Cladosporium* spp., *Exophiala* spp. and *Rinocladiella* spp.. The dematiaceous fungi were present in 46% of samples, 12 isolates from treated water for dialysis and dialysate were identified by sequencing, were found to be *Exophiala pisciphila*, *Cladophialophora* sp., *Cladosporium cladosporoides*, *Rinocladiella atrovirens* and *Pseudocladosporium* sp.. The presence of dematiaceous fungi and endotoxins may have a pathogenic potential of the already weakened health of the patients.

Keywords: Dematiaceous fungus. *Pseudomonas aeruginosa*. Water for dialysis, heterotrophic bacteria. *Exophiala*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - NÚMERO DE UNIDADES DE DIÁLISE NO BRASIL NOS ANOS DE 2000 A 2009, CONFORME CENSO 2009 DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA.....	21
FIGURA 2 - DIAGRAMA DO SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUA EM CENTRO DE HEMODIÁLISE, COM OS PONTOS DE COLETAS UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	24
FIGURA 3 - ESQUEMA DOS PONTOS DE COLETAS REALIZADAS NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE DE AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO.....	43
FIGURA 4 – PRESENÇA DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ISOLADAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS	48
FIGURA 5 – ENSAIO DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA EM AMOSTRA DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE REALIZADA PELO MÉTODO GEL-CLOT.....	50
FIGURA 6 – MÉDIAS DAS CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NOS QUATRO PONTOS DE COLETA NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE.....	59
FIGURA 7 – AMOSTRA DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE DA CLÍNICA F COLETADA NA TORNEIRA DA SALA DE REUSO (PONTO 2) COM SUSPEITA DE PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS, COM TUBOS DE DURHAN COM PRESENÇA DE GÁS E MEIO ACIDIFICADO EM MEIO LÍQUIDO LAURIL SULFATO DE SÓDIO.....	61
FIGURA 8 - RESULTADOS DA CONTAGEM DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> EM ÁGUA E DIALISATO DAS CLÍNICAS AVALIADAS.....	63
FIGURA 9 - PORCENTAGENS DE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE ENDOTOXINA BACTERIANA NA ÁGUA PARA DIÁLISE DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	65
FIGURA 10 - RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DIALISATO TESTADAS EM TRÊS PONTOS DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	66
FIGURA 11 - LEVEDURAS ISOLADAS DOS SISTEMAS DE ÁGUA DE DIÁLISE NAS CLÍNICAS AVALIADOS.....	69

FIGURA 12 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DIALISATO POR MICROMORFOLOGIA.....	72
FIGURA 13 - DENDOGRAMA DAS LINHAGENS DE <i>Exophiala</i> sp., <i>Cladophialophora</i> sp., <i>Rinocladiella</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp. e <i>Pseudocladosporium</i> sp. ISOLADAS NESSE ESTUDO E DE LINHAGENS PRÓXIMAS DEPOSITADAS NO GENBANK.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DOS 4 PONTOS DE COLETA NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE COM OS RESPECTIVOS LIMITES MÁXIMOS DE ACORDO COM LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	58
TABELA 2 - RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA EM TRÊS PONTOS DE COLETA COM OS RESPECTIVOS LIMITES MÁXIMOS DE ACORDO COM LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	65
TABELA 3 - CONTAGENS DE LEVEDURAS PELOS MÉTODOS EM SUPERFÍCIE E FILTRAÇÃO POR MEMBRANA EM ÁGUA POTÁVEL (PONTO 1), ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE (PONTOS 2 E 4) E DIALISATO (PONTO 3) DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	68
TABELA 4 - CONTAGEM DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELOS MÉTODOS EM SUPERFÍCIE E FILTRAÇÃO POR MEMBRANA EM ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO.....	70
TABELA 5- IDENTIFICAÇÃO POR CARACTERES MORFOLÓGICOS E POR COMPARAÇÃO COM SEQUENCIAS ITS 1, 5,8 S rDNA e ITS 2 DE FUNGOS ISOLADOS EM SISTEMAS DE ÁGUA DE SEIS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE DE CURITIBA/ PR.....	75

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PONTOS DE COLETA, LOCALIZAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAGENS REALIZADAS NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISES AVALIADAS.....	44
QUADRO 2 - RELAÇÃO DE PARÂMETROS E PONTOS ANALISADOS COM OS LIMITES EXIGIDOS SEGUNDO LEGISLAÇÃO BRASILEIRA QUE ESTABELECE O REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS SERVIÇOS DE DIÁLISE.....	45
QUADRO 3 - SEQUENCIAS DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO DOS FUNGOS DEMATIÁCEOS ISOLADOS DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO.....	52
QUADRO 4 - DIFERENÇAS DE RESULTADOS OBSERVADOS ENTRE OS PONTOS DE COLETA 2 (ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE) E 3 (DIALISATO) NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE PARA O PARÂMETRO ENDOTOXINA BACTERIANA.....	54
QUADRO 5 - CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE.....	55
QUADRO 6 - RESULTADOS DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE EM FUNÇÃO DE TEMPO DE INCUBAÇÃO (48 HORAS E 5 DIAS A 35 °C) INCUBADAS EM MEIO PCA.....	56
QUADRO 7 - RELAÇÃO DE NORMAS E TÉCNICAS PARA CULTIVO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA DE DIÁLISE E DIALISATO.....	57
QUADRO 8- NÚMEROS DE COLETAS E COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ANTES E DEPOIS DA ÁGUA PASSAR PELO SISTEMA DE TRATAMENTO DE ÁGUA DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE.....	60
QUADRO 9 - AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO SUBMETIDAS AO ENSAIO DE CONTAGEM DE <i>P. aeruginosa</i> DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	62
QUADRO 10 - COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS POSITIVOS PARA <i>P. aeruginosa</i> , CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E ENDOTOXINA BACTERIANA EM AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	63

QUADRO 11- AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS SUBMETIDAS AO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA.....	64
QUADRO 12- CONTAGEM DE LEVEDURAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS.....	67
QUADRO 13 - IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO, POR MACRO E MICROMORFOLOGIA.....	71

LISTA DE SIGLAS

AAMI	Association for the Advanced of Medical Instrumentation
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIA	Clorofórmio-álcool isoamílico
CTAB	Brometo de cetil-trimetilamônio (<i>cetyl trimethyl ammonium bromide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA ribossomal
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EU	Unidade de endotoxina
HCl	Ácido clorídrico
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
ITS1	Regiões inter-espaçadora eucariotos (18S – 5,8S)
ITS2	Regiões inter-espaçadora eucariotos (5,8S – 28S)
LAL	Lisado de amebócito de <i>Limulus</i>
LabMicro	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
mg	miligrama
mL	mililitro
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMP	Número mais provável
PB	Pares de bases
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
PCA	<i>Plate count agar</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pM	picomol
pH	Potencial de hidrogeniônico
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeos iniciadores
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	DNA ribossomal
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
TBE	Solução de Tris, Borato e EDTA
TECPAR	Instituto de Tecnologia do Paraná
TRIS	Tris (hydroximetil) aminometano
UFC	Unidade Formadora de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Insuficiência renal.....	19
2.2 Legislação brasileira (RDC 154,2004).....	22
2.3 Qualidade microbiológica da água de diálise.....	23
2.4 Métodos para quantificação, isolamento e identificação de micro-organismos..	28
2.5 Infecções em pacientes imunocomprometidos.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Meios de cultura	37
3.1.1 Ágar padrão para contagem – <i>Plate count agar</i> (PCA).....	37
3.1.2 Ágar dextrose batata – <i>Potato dextrose agar</i> (PDA).....	37
3.1.3 Ágar Sabouraud dextrose (SDA).....	38
3.1.4 Caldo lauril sulfato de sódio – Concentração dupla.....	38
3.1.5 Caldo bile 2 % verde brilhante.....	38
3.1.6 Caldo asparagina (Concentração dupla).....	38
3.1.7 Caldo acetamida.....	39
3.2 Reagentes e soluções.....	39
3.2.1 Ácido tartárico 10%.....	39
3.2.2 Solução salina 0,85%.....	39
3.2.3 Solução EDTA – 0,5M.....	39
3.2.4 Solução NaOH – 5M.....	40
3.2.5 Tampão CTAB.....	40
3.2.6 Tampão TBE 1X (solução de trabalho).....	40
3.2.7 Tampão de corrida 5X.....	41
3.2.8 Clorofórmio-álcool isoamílico (CIA).....,.....	41
3.2.9 DNA polimerase (Invitrogen).....	41
3.2.10 dNTP (Invitrogen).....	41
3.2.11 Gel de agarose (0,8%).....	42
3.2.12 Gel de agarose (1,4%).....	42

3.2.13 Primers.....	42
3.3 Procedimento de coleta.....	42
3.4 Contagem de bactérias heterotróficas.....	46
3.5 Contagem de coliformes totais.....	46
3.6 Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
3.7 Detecção de endotoxinas bacterianas (USP 31, 2008).....	48
3.8 Contagem de fungos.....	50
3.9 Isolamento e identificação de fungos filamentosos.....	51
3.9.1 Macro e micromorfologia.....	51
3.10 Sequenciamento de regiões ITS do rDNA.....	51
3.10.1 Extração de DNA (VICENTE, 2000).....	51
3.10.2 Reação de sequenciamento de regiões ITS do rDNA.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	54
4.1 Coleta de amostras.....	54
4.2 Contagem de bactérias heterotróficas.....	55
4.3 Contagem de coliformes totais.....	61
4.4 Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
4.5 Detecção de endotoxina bacteriana.....	64
4.6 Contagem de fungos.....	67
4.6.1 Contagem de leveduras pelos métodos de contagem em superfície e filtração por membrana.....	67
4.6.2 Contagem de fungos filamentosos pelos métodos de contagem em superfície e filtração por membrana.....	70
4.6.2.1 Identificação de fungos filamentosos por macro e micromorfologia.....	71
4.6.2.2 Identificação de fungos dematiáceos por sequenciamento de regiões ITS do rDNA.....	73
5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
APÊNDICES.....	93

1.1 INTRODUÇÃO

Historicamente a diálise teve seu início com o físico inglês Thomas Graham em 1854 (CARVALHO; MELO; ANDRAUS, 2001). A primeira hemodiálise bem sucedida foi realizada por Willem Kolf em 1945 na Holanda. No Brasil a hemodiálise teve seu início em 19 de maio 1949 pelo Dr. Tito Ribeiro de Almeida, no Hospital das Clínicas de São Paulo (CARVALHO; MELO; ANDRAUS, 2001; ROMÃO JUNIOR, 2009).

Desde que começaram os primeiros tratamentos com hemodiálise, em pacientes com insuficiência renal crônica, avanços foram alcançados. No início não havia um controle da água, mas devido a vários incidentes causados por água de má qualidade, melhorias têm sido realizadas.

Organismos como bactérias, vírus, fungos, protozoários e algas, podem estar presentes na água usada na preparação da solução de diálise. Isso pode ocorrer quando o sistema de tratamento de água passa por processos de desinfecção ineficientes (CAPELLI *et al.*, 2003; DE FILIPPIS, *et al.* 2007).

Devido à presença de contaminantes, ao aumento no número de clínicas e de pacientes em tratamento por hemodiálise, os controles se fazem necessários e os limites de aceitabilidade da água, usada no preparo da solução de diálise, tornam-se cada vez mais rigorosos. O reconhecimento do risco potencial de contaminantes químicos e microbiológicos levou à criação, em várias partes do mundo, de órgãos e comissões que estabelecerem critérios para a composição adequada a ser utilizada para a preparação da solução de diálise (SILVA *et al.*, 1996).

Ao comparar a legislação brasileira com a legislação de outros países, verifica-se que em alguns países os parâmetros microbiológicos são mais exigentes. Limites mais baixos são vistos para contagem de bactérias e concentração de endotoxinas e, em alguns casos, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e fungos são avaliados (NYSTRAND, 2008a).

A presença de fungos em água de hemodiálise é pouco relacionada com infecções em pacientes em hemodiálise, mas é importante verificar qual a microbiota fúngica presente nestes ambientes. Devido ao tamanho das fibras dos dialisadores, e controles por qual passam ao final de cada sessão de hemodiálise, as chances de

contaminação fúngica através deles torna-se mínima, já que os esporos e conídios dos fungos apresentam um tamanho maior em relação às fibras dos dialisadores.

Os controles realizados pelas clínicas seguem legislações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, existe uma preocupação com a segurança dos pacientes. O estudo sobre a qualidade da água é portanto, relevante, principalmente no que diz respeito aos parâmetros não analisados rotineiramente. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica da água nos sistemas de diálise em clínicas de Curitiba.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a qualidade microbiológica dos sistemas de água de seis centros de diálise, na cidade de Curitiba- PR, durante um período de doze meses.

1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar bactérias heterotróficas, coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa*.
- Detectar endotoxinas bacterianas nos sistemas de águas de diálise;
- Quantificar e isolar fungos presentes nos sistemas de águas de diálise;
- Caracterizar os isolados fúngicos por meio de macro e micromorfologia.
- Caracterizar os isolados fúngicos dematiáceos por meio do sequenciamento das regiões ITS do rDNA, visando identificar espécies potencialmente patogênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Insuficiência renal

A insuficiência renal é a perda das funções dos rins, podendo ser aguda ou crônica. A insuficiência aguda ocorre em alguns pacientes com doenças graves e os rins podem parar de funcionar de maneira rápida, porém temporária. A insuficiência crônica é a perda lenta, progressiva e irreversível das funções renais. Até que cerca de 50% da função renal tenham sido perdidas, os pacientes permanecem quase assintomáticos. A partir daí podem aparecer sintomas e sinais que nem sempre incomodam muito o paciente, porém quando a função renal é muito reduzida, torna-se necessário o uso de métodos de tratamento da insuficiência renal: diálise ou transplante renal (ROMÃO JUNIOR, 2004).

O tratamento para os casos descritos acima consiste de diálise, que pode ser de dois tipos: a diálise peritoneal e a hemodiálise. A diálise peritoneal é realizada de uma forma contínua conhecida por CAPD (diálise peritoneal ambulatorial contínua). Esta é uma forma segura de tratamento realizada atualmente por mais de 100.000 pacientes no mundo todo. A diálise peritoneal pode ser feita na própria casa do paciente, ou ainda no local de trabalho, já que o processo de troca do banho de diálise é feito pelo próprio paciente ou por algum familiar (ANDREOLI; NADALETO, 2008).

Na hemodiálise, o sangue do paciente é filtrado artificialmente, por meio de uma máquina e, para isso, é necessária a colocação de um cateter ou a confecção de uma fístula, procedimento realizado mais comumente nas veias do braço, para permitir que estas fiquem mais calibrosas e, desta forma, forneçam o fluxo de sangue adequado para ser filtrado. Em geral, são realizadas três vezes por semana, em sessões com duração média de 3 a 4 horas (ANDREOLI; NADALETO, 2008). A quantidade de água que um paciente utiliza por ano é aproximadamente 23.000 litros (NYSTRAND, 2008a).

Na hemodiálise a solução de diálise passa pelo filtro, ocorrendo trocas de solutos com o sangue por difusão, ultrafiltração e convecção. A hemofiltração não usa a solução de diálise, ocorrendo somente a ultrafiltração e convecção. Nesse caso, é utilizado dialisador de alto fluxo, ou seja, bastante permeável à água, e é infundida uma solução de reposição. A hemodiafiltração que é a combinação da

hemodiálise e hemofiltração. Usa-se solução de diálise e filtro de alto fluxo permitindo uma ultrafiltração, com a necessidade de se utilizar solução de reposição. Em muitas partes do mundo, a hemodiafiltração/ hemofiltração “on line” tem sido frequentemente utilizada, a qual necessita de uma água com parâmetros de qualidade mais rígidos (NYSTRAND, 2008a).

Pacientes em hemodiálise não tem funcionamento dos rins para excretar os resíduos de produtos. Eles dependem da hemodiálise para tirar os resíduos e normalizar os eletrólitos, para não adicionar um contaminante potencialmente ameaçador da vida, a exposição da água (como dialisato) e o sangue são apenas separados por uma membrana semi-permeável do dialisador, o que só é seletivo com relação ao tamanho molecular, mas não é específica de contaminantes. (AMATO, 2005).

O dialisato é usado na filtração sanguínea, dos produtos metabólitos produzido pelo paciente renal crônico. O equipamento de diálise mimetiza a função renal bombeando o sangue do paciente através de membranas semipermeáveis – “capilares” ou dialisadores – imersos no dialisato, ocorrendo à filtração dos produtos indesejáveis do sangue (uréia, creatinina, ácidos orgânicos, medicamentos, etc.) substituídos pelos íons presentes no dialisato (cálcio, sódio e potássio) (LEME; SILVA, 2003).

O deslizador ou capilar, também conhecido como rim artificial, é um filtro constituído por dois compartimentos (por um passa o sangue e pelo outro o dialisato), esses compartimentos são separados por uma membrana semipermeável formada de finos tubos plásticos, semipermeáveis, com numerosos poros microscópicos. Este dialisador tem tamanho e volumes de enchimentos variados, que são definidos para cada paciente de acordo com prescrição médica (OLIVEIRA JUNIOR, 2008).

Conforme dados do censo 2009, disponibilizados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) (2010), no Brasil o número de unidades de diálise desde o ano de 2000 vem aumentando (FIG. 1). E segundo Sesso *et al.* (2008) em janeiro de 2008 eram 684 unidades de diálise cadastradas na SBN, o tipo de tratamento de água mais frequentemente utilizado era osmose reversa (93,7%), e o restante usou deionização associada ou não a osmose reversa (6,3%). De acordo com informações disponíveis no site da SBN, no Paraná em 2008 eram 43 clínicas de diálise cadastradas na SBN, atualmente em Curitiba são 16. Segundo Nystrand

(2008a) em revisão publicada em 2008 existiam cerca de 28.500 unidades de diálise em todo o mundo.

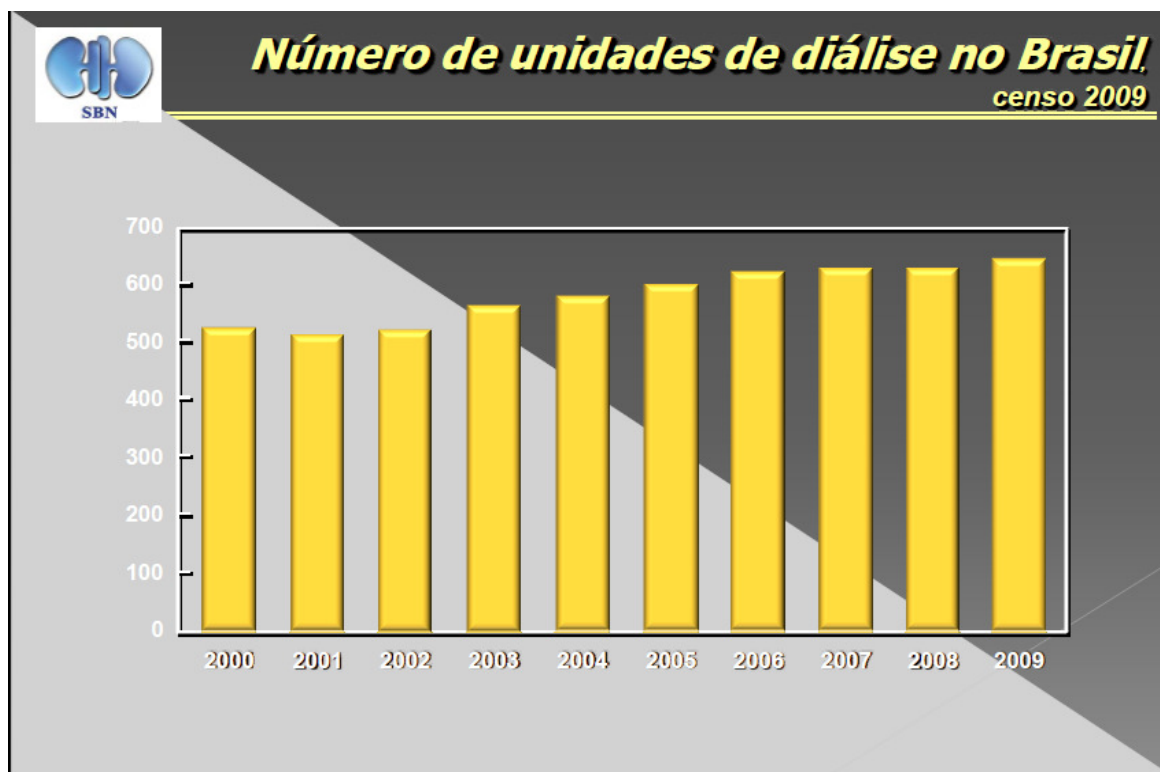


FIGURA 1 - NÚMERO DE UNIDADES DE DIÁLISE NO BRASIL NOS ANOS DE 2000 A 2009, CONFORME CENSO 2009 DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA.

FONTE: <http://www.sbn.org.br/index.php?censos> (2010)

Segundo relatório do censo Brasileiro de diálise, em 2008 o número estimado de pacientes em diálise no País foi de 87.044. Em março deste ano, 89,4% dos pacientes em diálise crônica faziam tratamento por hemodiálise e 10,6% por diálise peritoneal. O número estimado de óbitos em 2007 foi de 13.338, correspondendo a uma taxa de mortalidade bruta de 15,2% em relação aos pacientes em risco durante o ano. As principais causas de óbito foram: cardiovascular (37%), cerebrovascular (10%), infecciosa (26%), outra (21%), desconhecida (6%) (SESSO *et al.*, 2008).

Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitem correlacionar os contaminantes da água com efeitos adversos do tratamento (SILVA *et al.*, 1996)

2.2 Legislação brasileira (RDC 154, 2004)

A RDC 154 estabelece o regulamento técnico para funcionamento dos serviços de diálise, a seguir estão descritos alguns itens, para melhor entendimento de procedimentos realizados em diálise.

Água potável deve atender o disposto na Portaria GM/MS n° 518, de 25 de março de 2004, ou instrumento legal que venha a substituí-la. Água tratada para diálise é a água cujas características são compatíveis com as exigências microbiológicas e químicas da RDC 154.

O Dialisato é a solução de diálise após a passagem pelo dialisador.

Para a utilização do dialisador é necessário após cada sessão de hemodiálise realizar o “*Priming*” que é a determinação do volume interno das fibras do dialisador. Reuso em diálise é a utilização, para o mesmo paciente, do dialisador e linhas arteriais e venosas, por mais de uma vez, após os respectivos reprocessamentos, sendo que o reprocessamento em diálise é conjunto de procedimentos de limpeza, desinfecção, verificação da integridade e medição do volume interno das fibras, e do armazenamento dos dialisadores e das linhas arteriais e venosas.

Os dialisadores e as linhas arteriais e venosas podem ser utilizados, para o mesmo paciente até 12 (doze) vezes, quando utilizado o reprocessamento manual, ou até 20 (vinte) vezes quando utilizado reprocessamento automático. Só podem ser reutilizados dialisadores que apresentem capilares construídos com membrana biocompatível, sendo que o reuso de dialisadores e das linhas arteriais e venosas não é permitido para os pacientes portadores de HIV. Para fins de controle do reuso e descarte, dialisadores e linhas arteriais e venosas devem ser tratados como um único conjunto.

É obrigatória a medida do volume interno das fibras (*priming*) em todos os dialisadores antes do primeiro uso e após cada reuso subsequente, mantendo arquivados os registros dos dados referentes a todos os testes.

Após a medida do volume interno das fibras, qualquer resultado indicando uma redução superior a 20% do volume inicial, torna obrigatório o descarte do dialisador, independentemente do método empregado para o seu reprocessamento. Todos os valores da medida do volume interno das fibras dos dialisadores, obtidos tanto antes da primeira utilização como após cada reuso, devem ser registrados e

assinados pelo responsável pelo processo e, permanecer disponíveis para consulta dos pacientes.

A medida do volume interno das fibras deve ser feita por técnico ou auxiliar de enfermagem treinado na realização deste procedimento, usando vidraria graduada íntegra e com boas condições de leitura, sob supervisão do enfermeiro responsável.

No caso do reuso automatizado a medida é fornecida pelo *display* da máquina. O conjunto do paciente (linhas e dialisador) reutilizável deve ser acondicionado separadamente em recipiente limpo, desinfetado, com identificação clara e precisa do nome do paciente, data da primeira utilização e grupo de reprocessamento.

Deve ser verificada a qualidade bacteriológica da água tratada para diálise toda vez que ocorrer manifestações pirogênicas ou suspeitas de septicemia nos pacientes.

Quando a contagem de bactérias ultrapassa a 50 UFC/ mL a legislação brasileira prevê o nível de ação indicando a necessidade de adoção de providências para a identificação do foco de contaminação.

2.3 Qualidade microbiológica da água de diálise

Águas subterrâneas provenientes de câmaras subterrâneas como poços e nascentes geralmente apresentam uma menor quantidade de matéria orgânica e são mais ricas em matéria inorgânica como ferro, cálcio, magnésio e sulfato. Por outro lado, as águas superficiais como lagos, lagoas, rios e outros tipos de reservatórios superficiais, são geralmente mais contaminadas com organismos e micro-organismos, resíduos industriais, fertilizantes, pesticidas e esgoto (AMATO, 2005).

Os sistemas de tratamento de água para diálise são compostos de filtros mecânicos, abrandadores (equipamento cuja principal aplicação é remover os íons de cálcio e magnésio responsáveis pela dureza contida na água), filtros de carvão, deionizadores, osmose reversa e tanques para armazenamento da água (FIG. 2) (MONTANARI *et al.*, 2009). A água tratada deve seguir por tubulações aparentes em

PVC ou similar, com conexões em locais estratégicos do circuito, para facilitar o controle de qualidade da água (LEME; SILVA, 2003).

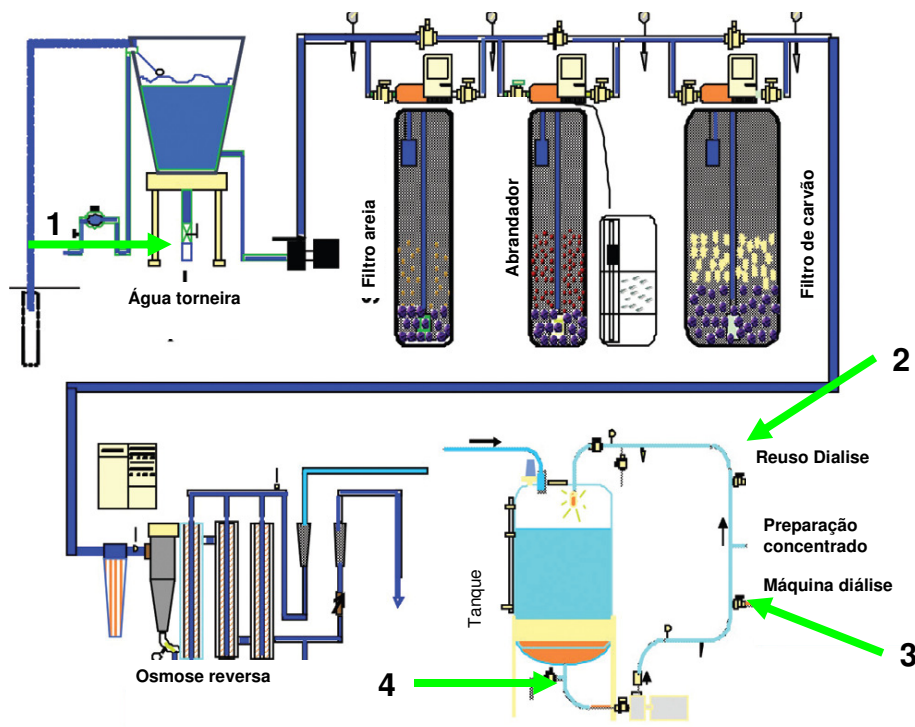


FIGURA 2 - DIAGRAMA DO SISTEMA DE DISTRIBUIÇÃO E TRATAMENTO DE ÁGUA EM CENTRO DE HEMODIÁLISE, COM OS PONTOS DE COLETAS UTILIZADOS NESTE ESTUDO.

FONTE: adaptado Montanari *et al.*, 2009

NOTA: 1: Ponto de coleta 1 – água potável (torneira hidrômetro e torneiras dentro da clínica)
 2: Ponto de coleta 2- água tratada para diálise (torneiras da sala de reuso)
 3: Ponto de coleta 3- dialisato (máquina hemodiálise pós-capilar)
 4: Ponto de coleta 4- água tratada para diálise (torneira após o tratamento da água)

Em função do fato do sangue e dialisato serem separados apenas por uma membrana semipermeável, a qualidade microbiológica da água de diálise e do dialisato são extremamente importantes. Os fluídos não precisam ser estéreis, mas o número máximo de micro-organismos deve ser controlado (SILVA *et al.*, 1996).

Pacientes com insuficiência renal não só estão expostos aos maiores volumes de água em sua vida que a população geral, mas a barreira entre o sangue e o líquido de diálise é geralmente sob a forma de uma membrana semipermeável não seletiva, proporcionando uma rota direta para quaisquer contaminantes na corrente sanguínea (HOENICH; LEVIN, 2003).

O conteúdo microbiológico da água raramente tem origem na fase de fluido, ou seja, na água, mas sobre as superfícies do sistema. No entanto, a água transporta material microbiano para as máquinas de diálise. O material inclui células microbianas, endotoxinas, e metabólitos microbianos formados durante o crescimento no sistema (NYSTRAND, 2008a).

Smeets *et al.* (2003) concluíram em estudo realizado em duas clínicas com tratamento diferente de água, que em contraste com o sistema padrão produzindo água purificada, o uso de um sistema fornecendo água altamente purificada, o qual foi também tratado com procedimento de desinfecção, levou a uma significativa redução na formação de biofilme, crescimento bacteriano, e níveis de endotoxinas em uma parte vulnerável do sistema de tratamento de água.

Um líquido de diálise de alta qualidade tende a eliminar os efeitos dos impactos microbiológicos, tais como aumento dos níveis de marcadores de inflamação (por exemplo, a proteína C-reativa). Na situação de realização de hemodiafiltração, produzindo o líquido de substituição "on-line", é ainda mais importante ter um método sensível de verificação microbiológica para acompanhamento da qualidade (NYSTRAND, 2008 a).

Quanto ao uso de água ou dialisato inadequados é estimado que muitos incidentes não sejam relatados devido aos sintomas crônicos, como a doença óssea ou inflamação crônica, podendo ser relegado a problemas secundários de ESRD (doença renal terminal) a menos que o paciente exiba uma reação aguda ou subaguda (AMATO, 2005)

A contaminação do dialisato por bactérias e a potencial transferência das mesmas, presentes no dialisato, para o sangue tem sido reportada como um fator de predisposição em complicações clínicas durante tratamento crônico por hemodiálise, embora este problema seja negligenciado (BRUNET; BERLAND, 2000)

A qualidade química e microbiológica da água é essencial para pacientes de diálise. Unidades de osmose reversa produzem água de qualidade química aceitável que pode ser mantida durante todo o sistema. A qualidade microbiológica da água, por outro lado, não depende da osmose reversa, mas da manutenção de todo o sistema de abastecimento de água da unidade (NYSTRAND, 2008a).

Um aspecto essencial, no tratamento de diálise é que o fluido é produzido pela mistura de água de torneira tratada com soluções concentradas contendo eletrólitos e tampão. Contaminantes químicos e microbiológicos, bem como a

composição do eletrólito e tampão do fluido de diálise desempenham importante papel na indução ou modulação da morbidade associada com a terapia regular de diálise (HOENICH *et al.*, 2008).

Resultados de estudos de multicentros indicam que a qualidade microbiana do fluido de diálise ainda é um problema muitas vezes negligenciado, particularmente por não existir evidência de uma possível relação entre contaminação do fluido de diálise e a morbidade a longo prazo (PONTORIERO; POZZONI; LOCATELLI, 2003).

Em 30 centros de diálise na Alemanha ocidental foram realizados ensaios da água e dialisato após tratamento por osmose reversa ou outros métodos de tratamento, 2 horas após início da hemodiálise. Em 17,8% de todas as amostras de água analisadas, as contagens bacterianas e fúngicas foram maiores que 200 UFC (unidades formadoras de colônia) /mL, e superiores a 2000 UFC/mL em 11,7% de todas as amostras do dialisato. A concentração de endotoxinas na água variou entre 0 e 95 unidades de endotoxinas (EU/mL) e de 0 a 487 EU/mL no dialisato. Em 12,2% da água amostrada, e 27,5% do dialisato, os valores de endotoxinas encontrados foram 5 EU/mL (BAMBAUER *et al.*, 1994).

Nos Estados Unidos, 51 centros de hemodiálise foram pesquisados e 35,3% das amostras de água e 19% de amostras do dialisato estavam em discordância com as normas da *Association for the Advancement of Medical Instruments*: 200 e 2000 UFC/mL, respectivamente. Leveduras e fungos filamentosos foram observados em 10% e 64% dos sistemas de água, respectivamente, enquanto o dialisato foi contaminado por fungos filamentosos e leveduras em 30% e 70% das unidades de diálise, respectivamente. As concentrações desses micro-organismos em ambos os fluidos foram muito menores do que a concentração observada de bactérias. No entanto, eles foram observados com frequência suficiente para justificar uma investigação mais aprofundada do seu impacto sobre o bem-estar dos pacientes em diálise (KLEIN *et al.*, 1990).

Arvanitidou *et al.* (1999) isolaram fungos em água potável na rede de abastecimento público e dentro do hospital na cidade de Thessaloniki, Grécia. Os gêneros prevalentes foram *Aspergillus* e *Penicillium*. Também neste estudo foram isolados os fungos dematiáceos *Exophiala*, *Phialophora*, *Curvularia* e *Cladosporium*.

A contagem de leveduras e fungos filamentosos foi investigada no sistema de água de 85 unidades de hemodiálise na Grécia, para estimar sua ocorrência e

sua correlação com bactérias indicadoras de contaminação. O total de fungos filamentosos encontrado foi de 81,2% e leveduras 3,5% nas amostras de água que supriam as clínicas, de 87,1% de fungos filamentosos e 8,2% de leveduras na água tratada e 77% de fungos filamentosos e 11% de leveduras nas amostras do dialisato. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram os mais frequentes e *Candida* spp. foi a levedura mais prevalente (ARVANITIDOU *et al.*, 2000).

Em Ponta Grossa, Paraná, setenta e duas amostras de água e de dialisato foram coletadas em unidades de hemodiálise de novembro de 2003 a abril de 2004. O teste de coliformes totais e fecais produziu resultados negativos para todas as amostras, enquanto a contagem total de bactérias heterotróficas apresentou três amostras de água e duas de dialisato com níveis superiores aos permitidos pelos padrões nacionais, 200 e 2000 UFC/mL respectivamente. A análise de endotoxinas revelou quantidades elevadas somente nas amostras de água que precederam a osmose reversa. Bactérias não fermentadoras gram-negativas foram identificadas em 54 amostras de dialisato e em 26 amostras de água. O teste de aderência de uma superfície inerte mostrou que várias bactérias foram capazes de formar biofilmes (BORGES *et al.*, 2007).

Varo *et al.* (2007), em estudo realizado no interior de São Paulo em unidades de hemodiálise, com 15 coletas de água em sete pontos do sistema de distribuição e máquinas, obtiveram 100 amostras de água sendo que 89% eram do sistema de distribuição e 11% das máquinas de hemodiálise. Foram isolados 116 fungos filamentosos, identificados como *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichoderma* sp.

Amostras coletadas por um período de três meses no sistema de água em um centro de hemodiálise em São Paulo, Brasil, apresentaram contaminação por fungos. De 89% das amostras de água e dialisato foram recuperados 116 isolados de fungos, com prevalência de fungos filamentosos na água tratada e leveduras no dialisato. *Fusarium* spp. foi o gênero de fungo mais encontrado, e *Candida parapsilosis* foi a espécie predominante de leveduras. Fungos dos gêneros *Penicillium* spp., *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Trichoderma* spp. entre outros foram identificados (PIRES-GOLÇALVES *et al.*, 2008).

Montanari *et al.*, (2009), em estudo realizado entre 2004 a 2006 no estado de São Paulo, Brasil, obtiveram 128 isolados bacterianos no sistema de distribuição

de água, 43 isolados nas máquinas, 3 isolados no sistema de reuso (água tratada para diálise). Entre os isolados 32 foram de bacilos Gram-positivos, 120 bacilos Gram-negativos, 20 cocos Gram-positivos e 11 micobactérias. O gênero *Pseudomonas* representou 44% das bactérias isoladas, na água do sistema de distribuição e dialisato. Enterobactérias foram recuperadas em 5,5 % (10/183) isolados de bactérias.

Bactérias intactas não podem atravessar a membrana do dialisador, porém produtos bacterianos tais como endotoxinas, muramylpeptídeos e exotoxinas, são potentes indutores de citocinas e estimuladores da resposta de fase aguda, são capazes de estimular células mononucleares e contribuir para a inflamação crônica associada à terapia por hemodiálise a longo prazo. Essa transferência está relacionada ao tipo de membrana do dialisador e ao modo de diálise (HOENICH e RONCO, 2007).

Gomila *et al.* (2005) cultivou e identificou bactérias presente em água e fluído de hemodiálise. Neste trabalho, 203 bactérias planctônicas isoladas em meio R2A foram identificadas por análise de restrição e sequenciamento do gene do DNA ribossomal, como bactérias dos gêneros *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* e *Mycobacterium*.

2.4 Métodos para quantificação, isolamento e identificação de micro-organismos

Devido a relatos de infecções em pacientes que passaram por algum tratamento de diálise, e também de contaminação por bactérias e fungos na água de diálise, muitos casos podem estar relacionados com a qualidade da água envolvida nos sistemas de diálise. Portanto, uma investigação mais detalhada sobre a água e o dialisato usados nestes procedimentos deve ser feita.

A identificação de micro-organismos por métodos convencionais recebe esse nome porque foram desenvolvidos há muitos anos e, desde então, vêm sendo empregados como métodos oficiais na maioria dos laboratórios brasileiros e em outros países. Estes métodos estão descritos em publicações de referência, internacionalmente aceitas (FRANCO, 1999).

Contagem de bactérias heterotróficas é a determinação da densidade de bactérias que são capazes de produzir unidades formadoras de colônias (UFC), na presença de compostos orgânicos contidos em meio de cultura apropriado, sob condições pré-estabelecidas de incubação: $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas (BRASIL, 2004).

A contagem de bactérias é decorrente do princípio do método, que se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de “unidades formadoras de colônias” (UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos micro-organismos (SILVA *et al.*, 2007).

A contagem de bactérias é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas para água e alimentos. Não diferencia tipos de bactéria, não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo (SILVA *et al.* 2007)

Coliformes totais (bactérias do grupo coliforme) são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter* (BRASIL, 2004). Porém são conhecidas mais de vinte espécies, tais como *Aeromonas* sp e *Serratia* sp e *Escherichia coli*. Dentro do grupo "Coliformes", o subgrupo dos "Coliformes termotolerantes" é diferenciado por sua capacidade de fermentar a lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas; tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal (BRASIL, 2004).

A técnica do número mais provável é um método de análise quantitativo que permite determinar o número mais provável (NMP) do(s) micro-organismo(s) alvo na amostra, através da inoculação de alíquotas dessa amostra em uma série de tubos, contendo um meio de cultura líquido adequado ao seu crescimento. A determinação do número de micro-organismos é baseada no princípio de que, subdividindo a amostra em alíquotas, algumas alíquotas vão conter micro-organismos e outras não,

dependendo da quantidade dos microrganismos na amostra. O teste de diluição única é mais utilizado para amostras com baixo nível de contaminação, para as quais não há necessidade e não se justifica a preparação de diluições. Uma de suas principais aplicações são a contagem de coliformes em água tratada e em sucos e refrigerantes. A combinação de tubos positivos e negativos na técnica do NMP permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade dos micro-organismos alvo na amostra (SILVA *et al.*, 2007).

Um critério para análise de coliformes na água com indicador, é que o organismo esteja consistentemente em número substanciais nas fezes humanas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005), de forma que sua detecção pode indicar alguma falha no processo, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes (SILVA *et al.*, 2007) e capazes de colonizar partes do sistema, quando a sanitização é falha.

A enumeração de *P. aeruginosa* permite o acompanhamento das condições higiênicas dos sistemas de captação, adução, armazenamento, produção e distribuição em águas. São bactérias com forma de bastonetes Gram negativos, O gênero é obrigatoriamente aeróbio, exceto as espécies capazes de utilizar denitrificação como principal via respiratória aeróbia; ocorrem isolados ou ao pares, em cadeias curtas. Produzem pigmentos fluorescentes solúveis na água, são móveis por flagelo polar. Crescem a 37°C e a 42°C. Possuem metabolismo oxidativo da glicose e resultado positivo no teste para oxidase. (MASSAGUER, 2005).

No Brasil, a análise para *P. aeruginosa* não é exigida pela legislação atual para água tratada para diálise. Em alguns países existe a necessidade de contagem de *P. aeruginosa* em sistemas de água para diálise, sendo que deve ser inferior a 1 UFC/ 50 mL na Áustria; inferior a 1 UFC/ 100 mL na Alemanha e inferior a 1 UFC/ 250 mL na Itália (NYSTRAND, 2008b).

A contagem de fungos fornece informações sobre as condições gerais de higiene no sistema de água e de seu armazenamento. Fungos em água potável têm sido encontrados em encanamentos de sistema de distribuição. Sobrevivem ao tratamento da água ou entram no sistema após o tratamento e podem permanecer viáveis por longo período de tempo. Colônias de fungos podem se desenvolver de uma única célula, agregado de células ou de fragmento do micélio ou pseudomicélio (APHA; AWWA; WPCF, 2005). Seus esporos são facilmente encontrados disseminados nos ambientes. Algumas espécies podem crescer e produzir micotoxinas. São bastante resistentes às condições adversas (SILVA *et al.*, 2007)

Conforme Abliz *et al.* (2003) métodos tradicionais de identificação de fungos dematiáceos baseados nas características morfológicas e detecção de antígenos tem sido usadas clinicamente, embora, estes métodos sejam demorados e possuam baixa especificidade.

O DNA ribossômico (rDNA) tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Tal interesse está diretamente relacionado à estrutura destas regiões, as quais são encontradas em locais específicos do genoma e apresentam sequências repetidas inúmeras vezes. As regiões 28S, 18S e 5,8S do rDNA eucariótico não apresentam variações nas sequências, sendo altamente conservadas. Entretanto, suas regiões espaçadoras internas transcritas (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) são altamente variáveis. As regiões ITS apresentam alto polimorfismo, evoluem rapidamente e representam uma ferramenta bastante útil para estudos filogenéticos ao nível de gêneros, espécies e populações (WHITE *et al.*, 1990; LUPATINI *et al.*, 2008).

Larena *et al.* (1999), analisando sequências depositadas no *GenBank*, desenvolveram um *primer*, denominado ITS4A, com alta especificidade para Ascomycetos. Utilizando este *primer* e o *primer* universal para fungos superiores (ITS1F), foi possível amplificar a região (ITS1, 5,8S e ITS2 do DNA ribossomal), em apenas amostras de fungos Ascomycetos, resultando em um fragmento de 600 a 800 pb. Este trabalho demonstra uma estratégia rápida e confiável na discriminação de Ascomycetos dos demais grupos taxonômicos.

Azevedo *et al.* (2000) utilizaram marcadores de sequências ITS na identificação de cinco isolados morfológicamente atípicos de *Paecilomyces*, obtidos do Estado do Paraná. A amplificação com os *primers* ITS4 e ITS5 resultou em um fragmento de 700 pb para todas as linhagens investigadas, dando origem a padrões de restrição idênticos as linhagens de *P. fumosoroseus* utilizadas como referência.

Hoog *et al.*, (2003), estudaram diversidade e polimorfismo na *Clade Exophiala spinifera* utilizando sequências de pequena subunidade (SSU) e regiões ITS do DNA ribossomal, utilizando para amplificação os *primers* VG9 e LS266 e para o sequenciamento os *primers* ITS1 e ITS4.

Hoog *et al.* (2007), analisaram o complexo *Cladophialophora carrioni*, e para análise molecular utilizaram regiões ITS do rDNA com os *primers* VG9 e LS266 e

para sequenciamento os *primers* IT1 e ITS4, também utilizaram neste estudo os genes β -tubulina (*TUB 1*) e fator de alongação de translação 1- α (*TEF 1*).

Sequenciamento por ITS é um pré-requisito para a correta identificação de espécies de *Exophiala* (ZENG; HOOG, 2007). Filogenia, taxonomia e ecologia de espécies de *Exophiala* foram determinadas por estudo multilocus envolvendo análise de sequenciamento SSU (*ACT1*), regiões ITS do DNA ribossomal, genes β -tubulina (*TUB 1*) e fator de alongação de translação 1- α (*TEF 1*) (HOOG *et al.*, 2011, submetido à publicação ¹).

2.5 Infecções em pacientes imunocomprometidos

Hospitalizações relacionadas à infecção em pacientes de hemodiálise estão associadas com significativa morbidade, internação em unidades de terapia intensiva e prolongada hospitalização (ALLON *et al.*, 2005).

Várias infecções oportunistas significativas por fungos ocorrem na América Latina, cada uma associada a fatores de risco específicos. A incidência de algumas infecções oportunistas é marcadamente diferente na América Latina do que em outras partes do mundo (NUCCI, *et al.*, 2010).

Há relatos de infecções fúngicas não relacionados à pacientes com insuficiência renal. McCormack e Pollard (2010) fizeram um estudo retrospectivo em banco de dados (*PubMed*) de 35 casos de endocardite por *Aspergillus* entre 2003 e 2009, de 34 pacientes 74% tinham passado por cirurgia e 21% não haviam passado por cirurgia, mas tinham algum outro fator de predisposição da doença.

O tipo de acesso vascular é um importante determinante do risco de infecção, associada a alta morbidade e mortalidade (SAVANI; GHODS; AFSHAR, 2007). LEMAIRE *et al.* (2008) relataram 226 episódios de bacteremias relacionadas a 197 cateteres causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Enterobacter* spp e *P. aeruginosa*. Foi relatado um caso fatal de cerebritis e abscesso cerebral seguida de bacteremia por *S. aureus* relacionado a fístula arteriovenosa (MESQUITA; DAMRY; GAZAGNES, 2008).

¹ HOOG, G.S. *et al.* Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. *Studies in Mycology*, 2011. Publicação "on line".

Casos de peritonite causados por bactérias ou fungos em pacientes que realizam diálise peritoneal são frequentes. Szeto *et al.* (2001) revisaram 104 casos de peritonites causadas por espécies de *Pseudomonas* e já foram descritas peritonites causadas por fungos como *Curvularia* (PIMENTEL *et al.*, 2005), *Blastobotrys proliferans* (QUIRIN *et al.*, 2003), *Trichosporon inkin* (MADARIAGA; TENORIO; PROIA, 2003); *Penicillium* spp. (HUANG *et al.*, 2000); *Aspergillus fumigatus* (WEGMANN; HEILESEN; HORN, 1988); *Rhodototula mucilaginosa* (ZOYSA, 2001); e por espécies de *Candida* (BIBASHI *et al.*, 2003). Estas infecções estão relacionadas à alta morbidade e mortalidade e difícil tratamento (BIBASHI *et al.* 2003); e também a retirada do cateter (PRASAD; GUPTA, 2005). A infecção fúngica é relativamente rara, mas está associada com sérias complicações, incluindo morbidade, mortalidade e término do tratamento. (LIU; HUANG; KAO, 2006).

Pacientes em hemodiálise particularmente são propensos a infecções oportunistas devido à exposição a antibióticos, acesso vascular frequente e alteração da imunidade celular (KATHRESAL *et al.*, 2008); OUYANG *et al.* (2008) reportaram um caso de bacteremia relacionadas a cateter em paciente em hemodiálise por *Paenibacillus thiaminolyticus* um bacilo Gram-positivo aeróbico.

Considerando infecções por leveduras, aproximadamente 500 espécies conhecidas, apenas cerca de 25 a 30 eram consideradas patógenos alguns anos atrás, mas recentemente, este número tem aumentado consideravelmente (GARCÍA-AGUDO; GARCÍA-MARTOS, 2009). Historicamente, as espécies de *Candida* foram de longe os mais importantes fungos infecciosos (CORNELLY, 2008).

Nguyen, Yu e Morris (1996) relataram três casos de candidemia relacionada ao uso de fistula arteriovenosa usada para hemodiálise, citando que este tipo de infecção era raro naquele ano. Atualmente houve um aumento das infecções fúngicas causadas por *Candida*, isto se deve a técnicas médicas mais invasivas, maior sobrevivência dos pacientes, tratamentos com imunossupressores, antibióticos e corticoesteróides. Pyrgos *et al.* (2009) estudaram a epidemiologia de candidemia em pacientes em hemodiálise e constatou que *C. glabrata* foi a prevalente (26 %) nos casos estudados.

Em pacientes renais crônicos que realizam hemodiálise, a maioria dos casos de bacteremias e fungemias relatadas, estão relacionadas ao acesso vascular, cateter (ALEXANDRAKI *et al.*, 2008) fungemia por *Paecilomyces lilacinus* (LABRIOLA *et al.*, 2009), espécies de *Phialemonium* (CLARK *et al.*, 2006; PROIA *et*

al., 2004). Rao *et al.* (2009) estudaram casos de pacientes de hemodiálise com infecção na corrente sanguínea por *Phialemonium curvatum* chegando à conclusão que a fonte das infecções estava relacionada à água.

Os termos “black fungi” ou “dematiaceous fungi” são denominações práticas que lembram os primeiros dias de classificação micológica. No início do século 19 o grupo de fungos anamórficos invocava caracteres que eram fáceis de observar com equipamentos ópticos simples, como a cor do micélio. Desde esses tempos e até hoje, hifomicetos produzindo pigmento cinza-oliva, marrom ou preto em suas paredes celulares ou conídios são classificados como fungos dematiáceos (HOOG; GRUBE, 2008).

Os pigmentos da melanina são comuns a todos Chaetothyriales, embora pouco se conheça sobre os mecanismos patogênicos pelos quais esses fungos causam doenças, particularmente em indivíduos imunocompetentes. No entanto, a produção de melanina está envolvida na patogenicidade (BADALI, 2008).

Ao abrigar uma ampla gama de espécies clinicamente relevantes, Chaetothyriales são únicos no reino Fungi: eles são apenas igualados por Onygenales, a ordem que contem os dermatófitos e os dimórficos patogênicos. Entender a diversidade das espécies de Chaetothyriales e sua ecologia específica é de considerável relevância médica (HOOG *et al.*, 2003). Esta clade compreende espécies com considerável potencial oportunista.

Ogawa *et al.*, 2009 em estudos realizados com transplantados renais verificaram durante o período de estudo que de 3.885 pacientes 1.243 (31,9%) apresentaram uma doença dermatológica, e infecção subcutânea causada por fungo filamentosso dematiáceo esteve presente em 17 pacientes (1,4%). Foram relatados neste estudo os fungos *Exophiala sp.*, *Cladosporium sp.*, *Phialophora richardsiae*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phaeoacremonium inflatipes*, *Scedosporium apiospermum*, *Cochliobolus australiensis*.

Doenças invasivas aguda sinonasais por fungos dematiáceos são associadas com imunossupressão e resultam em significativa morbidade e mortalidade. O sucesso do tratamento requer redução da imunossupressão, cirurgia, e terapia antifúngica sistêmica (DERBER; ELAM; BEARMAN, 2010). Ming e Hoog (2009) revisaram casos de feohifomicoses sendo que três espécies envolvidas primariamente em infecção cerebral eram da ordem Chaetothyriales:

Cladophialophora bantiana, *Exophiala dermatitidis* e *Rinocladiella mackenziei*. Raparia *et al.* (2010) fizeram um estudo entre 2000 a 2007 de casos de micoses cerebrais e 28% (5/18) dessas infecções do sistema nervoso central foram causadas por fungos dematiáceos.

Espécies de *Cladophialophora*, um fungo dematiáceo, foram isoladas do ambiente no Paraná nas cidades de Telemaco Borba, Piraquara e Colombo (VICENTE *et al.*, 2008). *Cladophialophora bantiana* é um organismo patogênico incomum. Originalmente pensava-se que afetavam pacientes imunocompetentes, porém um número crescente de relatos, descrevem o organismo em pacientes imunodeprimidos (HARRISON; MOSER; PALMER, 2008).

A identificação rápida e precisa dos agentes causadores é necessária na medicina. A região ITS se localiza entre os genes 18S e 28S do DNA ribossomal e é subdividida entre dois espaçadores ITS1 e, separados pela região conservada 5.8S. Acredita-se que regiões ITS têm maiores taxas de mutação do que as de 18S, 5.8S e 28S rDNAs. Portanto, as regiões ITS são usadas para projetar *primers* específicos para rápida identificação de fungos patogênicos para os homens. As sequências de ITS de 14 linhagens de *C. carrionii* revelaram que eles têm uma variação intra-espécie. No entanto, a variação entre espécies de *C. carrionii* com outros fungos dematiáceos é mais marcante (ABLIZ *et al.*, 2004).

Outro fungo dematiáceo de interesse neste trabalho é a *Exophiala*. Exemplos foram encontrados do ambiente no Paraná, *E. xenobiotica*, foi isolado na cidade de Colombo em madeira podre, *E. bergeri* em Cianorte no solo embaixo de árvore de café, e *Capronia semi-immersa* em Colombo em tronco apodrecido de Araucária (VICENTE *et al.* 2008).

Estudo com espécies de *Exophiala* da clade Salmonis originadas na água, causadoras de doenças em animais de sangue frio, descrevem as espécies *E. angulospora*, *E. psychrophila*, *E. alcolophila*, *E. cancerae*, *E. aquamarina*, *E. opportunistica*, *E. halophila*, *E. lakei*, *E. equina*, *E. pisciphila*, *E. salmonis* (HOOG *et al.*, 2011, publicação “on line”¹).

Al-Obaid *et al.* (2006), relataram caso de fungemia associada a cateter em criança com leucemia causada por *Exophiala oligosperma*. O agente etiológico foi isolado de amostras de sangue e da ponta do cateter, sendo identificado por suas características morfológicas e sequenciamento da região ITS do rDNA.

E. dermatitidis é um oportunista comum, ocasionalmente causando fatal doença sistêmica (VICENTE *et al*, 2008). Taj-Aldeen *et al.* (2006) isolaram *E. dermatitidis* de aspirado endotraqueal de um paciente com câncer e o diagnóstico foi atribuído ao genótipo B pelo sequenciamento de região ITS do rDNA, também neste trabalho, os autores revisaram os casos publicados após 1992 mostrando um forte aumento nos casos clínicos causados por *E. dermatitidis* durante os anos 90.

Zeng *et al.* (2007) estudaram espécies de *Exophiala* clinicamente relevantes nos Estados Unidos em ordem de frequência. Os agentes prevalentes de espécies de *Exophiala* foram *E. dermatitidis* (29,7 %), *E. xenobiotica* (20%) e *E. oligosperma* (18,9%) compreendendo mais que dois terços dos isolados estudados, seguido por *E. lecanii-corni* (7,0%), *E. phaeomuriformis* (6,5 %), *E. jeanselmei* (3,8 %), *E. bergeri* (3,8 %), *E. mesophila* (3,2 %) e *E. spinifera* (2,7%). *E. bergeri*, *E. Xenobiotica* e *E. angulospora* são consideradas oportunistas excepcionais e ou de baixa virulência (VICENTE *et al*, 2008).

Crescimento de leveduras como *Exophiala*, na superfície de sistemas de tratamento de água pode ocorrer, especialmente em sistemas que não são bem desinfetados (NYSTRAND, 2008b)

NUCCI *et al.* (2002) em estudo realizado de dezembro de 1996 a setembro de 1997, no Hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro, relataram 19 casos de fungemia causada por *E. jeanselmei*. Fazendo uma avaliação do sistema de água do hospital, isolaram de um total de 85 amostras, 3 de *E. jeanselmei* sendo que uma amostra era de água deionizada da farmácia, e este isolado apresentou similaridade genética com os isolados dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

Os componentes sólidos foram pesados. Colocados em erlenmeyer e acrescentou-se água deionizada. Para os meios sólidos, acrescentou-se ágar deixou-se hidratar por aproximadamente 15 minutos, para os meios PCA e PDA, depois de misturados foram colocados em vapor fluente, em seguida homogeneizou-se até completa dissolução. Para os meios formulados o pH foi ajustado com NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade. Distribuídos em tubos quando caldos, tampados e embalados e identificados. Autoclavados a 121 ° C, por 15 minutos. Os meios de acordo com o seu uso, isolamento ou contagem de bactérias ou fungos, foram para estufa a 25 ou 30 °C por até 24 horas. Em seguida colocados em sacos plásticos e armazenados em temperatura ambiente ou geladeira dependendo do tipo de meio.

3.1.1 Ágar padrão para contagem – *Plate count agar* (PCA) (Himedia)

Plate Count Agar23,5 g
 Água deionizada.....1000mL
 O pH foi ajustado para $7,0 \pm 0,2$ e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

3.1.2 Ágar dextrose batata – *Potato dextrose agar* (PDA) (Acumedia)

Potato Dextrose Agar.....39 g
 Água deionizada.....1000mL
 O pH foi ajustado para $5,6 \pm 0,2$ e o meio autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

3.1.3 Ágar Sabouraud dextrose (SDA) (Acumedia)

Ágar Sabouraud.....65 g

Água deionizada.....1000mL

O pH foi ajustado para $5,6 \pm 0,2$ e o meio autoclavado a 121°C por 15 minutos.

3.1.4 Caldo lauril sulfato de sódio – Concentração dupla (Oxoid)

Caldo lauril Triptose71,2g

Púrpura de bromocresol.....0,02g

Água deionizada.....1000mL

O pH foi verificado para $6,8 \pm 0,2$. O meio foi filtrado, colocado em tubos contendo no seu interior tubos de Durham invertido.

3.1.5 Caldo bile 2 % verde brilhante (Himedia)

Caldo bile Verde brilhante.....40 g

Água deionizada.....1000mL

O pH foi verificado para $7,2 \pm 0,2$. O meio foi filtrado, colocado em tubos contendo no seu interior tubos de Durham invertido.

Importante: Antes de abrir a autoclave, a temperatura estava inferior a 75°C , para evitar a formação de bolhas de ar no interior dos tubos de Durhan.

3.1.6 Caldo asparagina (concentração dupla) (APHA; AWWA; WPCF, 2005)

Asparagina D.L.....6,0g

Fosfato dipotássico.....2,0g

Sulfato de Magnésio.....1,0g

Água deionizada.....1000mL

O pH foi ajustado para 6,9 a 7,2.

3.1.7 Caldo acetamida (APHA; AWWA; WPCF, 2005)

Acetamida	10g
Cloreto de Sódio.....	5g
Fosfato dipotássico.....	1,39g
Fosfato monopotássico.....	0,73g
Sulfato de magnésio.....	0,5g
Vermelho de fenol.....	0,012g
Água deionizada.....	1000mL

O pH foi ajustado para 6,9 a 7,2. O meio foi filtrado, colocado em tubo.

3.2 Reagentes e soluções

3.2.1 Ácido tartárico 10%

Ácido tartárico.....	10 g
Água deionizada.....	100 mL

O ácido tartárico foi colocado em erlenmeyer e dissolvido em água deionizada. A solução foi filtrada e distribuída em frascos e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

3.2.2 Solução salina 0,85%

Cloreto de Sódio (NaCl).....	8,5g
Água deionizada.....	1000mL

O cloreto de sódio foi colocado em erlenmeyer e dissolvido em água deionizada. A solução foi filtrada, e distribuída em frascos e autoclavada 121 °C por 15 minutos.

3.2.3 Solução EDTA – 0,5M

EDTA.....	186,12 g
Água deionizada.....	1000mL

O EDTA foi dissolvido em 700 mL de água. Em seguida, o volume foi ajustado para 1000 mL.

3.2.4 Solução NaOH – 5M

NaOH.....20,0 g

Água deionizada.....100mL

O NaOH foi misturado em 50 mL de água até completa dissolução. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 mL.

3.2.5 Tampão CTAB

Tris base..... 2,42 g

NaCl.....8,2 g

Na-EDTA..... 0,74 g

CTAB..... 2,0 g

Água ultrapura autoclavada.....80 mL

Os reagentes foram misturados em metade do volume da água e a solução foi aquecida para completar a dissolução. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 mL com o restante da água ultrapura autoclavada. pH 7,5

3.2.6 Tampão TBE 1X (solução de trabalho)

TBE 10X.....100 mL

Água q.s.p.....1000 mL

O TBE 10X foi diluído na água, e o volume foi ajustado para 1000 mL. Esta solução de trabalho foi armazenada à temperatura ambiente.

3.2.7..Tampão de corrida 5X (VICENTE, 2000)

Tris base.....	0,60 g
EDTA.....	1,68 g
SDS.....	0,50 g
Azul de bromofenol.....	0,10 g
Sacarose.....	40,0 g
Água q.s.p.....	100 mL

O Tris base e o EDTA foram dissolvidos em 50 mL da água. Usando HCl, o pH foi ajustado para 7,6. Foram acrescentados o SDS, o azul de bromofenol e a sacarose. Em seguida, o volume foi ajustado para 100 mL, com o restante da água. A solução foi armazenada à temperatura ambiente, em frasco âmbar.

3.2.8 Clorofórmio-álcool isoamílico (CIA)

Clorofórmio.....	96 mL
Álcool isoamílico.....	4 mL

3.2.9 DNA polimerase (Invitrogen)

A Taq DNA polimerase foi utilizada nas reações de amplificação na concentração de 5 U/ μ L.

3.2.10 dNTP (Invitrogen)

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100 mM), foram diluídos em água ultrapura permanecendo na concentração de 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2 mM.

3.2.11 Gel de agarose (0,8%)

Agarose.....0,8 g
Tampão TBE 1X.....100mL

3.2.12 Gel de agarose (1,4%)

Agarose.....1,4 g
Tampão TBE 1X.....100mL

3.2.13 *Primers* (Invitrogen)

Os *primers* foram diluídos em água ultrapura autoclavada (solução 4 mM), usando o peso molecular do *primer* individual dado pelo fornecedor. Os oligonucleotídeos diluídos foram mantidos a -20°C.

3.3 Procedimento de coleta

Foram realizadas coletas da água potável, água tratada para diálise e diálise no sistema de água de diálise em seis clínicas de hemodiálise da cidade de Curitiba. As coletas foram mensais, durante os meses de outubro de 2009 a novembro de 2010.

Para os ensaios microbiológicos as coletas das amostras foram realizadas em frascos de vidro esterilizados de 250 mL, para o ponto 1 o frasco continha tiosulfato de sódio a 10%. Nas coletas para o ensaio de endotoxina bacteriana os frascos estavam despirogenados.

Em todas as coletas foi realizada nas torneiras dos pontos 1 e 2 uma desinfecção prévia com álcool 70% e gaze esterilizada, em seguida deixou-se a água escorrer por pelo menos por trinta segundos para então coletar a amostra.

Os pontos de coleta da água potável, água tratada para diálise e dialisato com sua localização estão indicados na FIGURA 3.

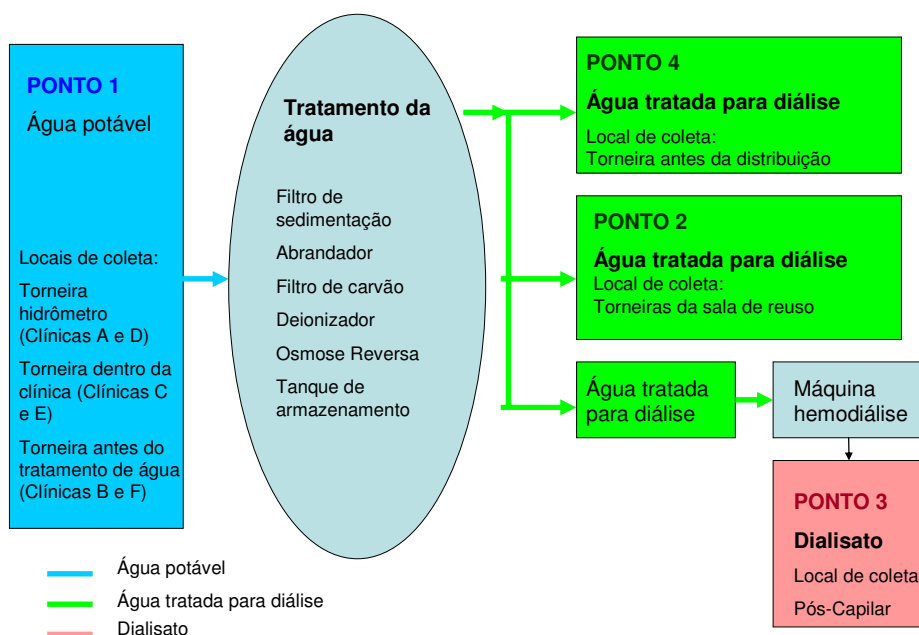


FIGURA 3 - ESQUEMA DOS PONTOS DE COLETAS REALIZADAS NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE DE AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO
FONTE: O autor (2011)

Para o ponto 1 (água potável) nas clínicas **A** e **D** as coletas foram realizadas na torneira do hidrômetro. Nas clínicas **B** e **F** em torneiras antes do tratamento da água na sala de tratamento da água. Na clínica **C** e **E** a água foi coletada em torneiras dentro da clínica. No último mês, as coletas foram realizadas em todas as clínicas na torneira da sala de hemodiálise onde os funcionários realizavam assepsia das mãos (FIG 3).

Quanto ao ponto 2, que segue o padrão de água tratada para diálise conforme RDC 154, todas as amostragens foram realizadas nas torneiras da sala de reuso, onde eram realizadas a lavagem e desinfecção das linhas arteriais e dialisadores (FIG.3).

No ponto 3 (dialisato) as coletas foram realizadas na sala de hemodiálise, na máquina após a passagem pelo capilar(FIG. 3).

No ponto 4 (água tratada para diálise) as coletas foram feitas na sala de tratamento de água, em uma torneira após o tratamento, antes da distribuição (FIG.3).

Em alguns meses, a coleta do ponto 3 (dialisato) foi substituída pelo ponto 4 (água tratada para diálise), devido à diferença que ocorreu com o resultado de concentração de endotoxina bacteriana entre os pontos 2 (água tratada para diálise) e 3 (dialisato) para os parâmetros de detecção de endotoxina bacteriana e contagem de *P. aeruginosa*.

O número de amostragens de cada ponto e em cada clínica está descrito no quadro 1.

	Clinica A	Clinica B	Clinica C	Clinica D	Clinica E	Clinica F
Ponto 1 - Água potável total de amostragem= 72						
Torneira do hidrômetro	11	0	0	11	0	0
Torneira nas partes internas da clínica	1	1	10	1	12	3
Torneira sala de tratamento de água	0	11	2	0	0	9
Ponto 2 - Água tratada para diálise (sala de reuso) total de amostragem= 72						
Torneira na sala	12	12	12	12	12	12
Ponto 3 – Dialisato total de amostragem=58						
Máquina – pós-capilar	11	9	10	10	10	8
Ponto 4 – Água tratada para diálise (após-tratamento) total de amostragem=15						
Torneira da sala de tratamento de água – antes da distribuição	1	4	2	2	2	4
Número total de amostras analisadas n= 217						

QUADRO 1- PONTOS DE COLETA, LOCALIZAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA E NÚMERO DE AMOSTRAGENS REALIZADAS NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTE: O autor 2010

A primeira e a segunda coleta foram acompanhadas por um técnico da Secretaria Municipal de Saúde, e pelo responsável técnico da clínica. Antes do início do trabalho de amostragens o responsável técnico da clínica teve acesso às informações do projeto.

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Paraná e aprovado com o registro CEP/SD: 799.134.09.09 CAAE: 0059.0.091.091-09.

As amostras de água foram coletadas, armazenadas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar) para processamento das análises, no mesmo dia da

coleta. Os fungos foram isolados e a identificação foi realizada primeiramente no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia do Tecpar por macro e micromorfologia, e os fungos dematiáceos foram encaminhados para sequenciamento no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Parâmetros	Ponto 1 Água Potável	Ponto 2 Água tratada para diálise (Sala de reuso)	Ponto 3 Dialisato	Ponto 4 Água tratada para diálise (antes da distribuição)
Valor máximo permitido (UFC/mL) Contagem de bactérias heterotróficas	500	200	2000	200
Valor máximo permitido (NMP/100 mL) Contagem de Coliformes totais	Ausência <i>Escherichia coli</i>	Ausência	Não exigido	Ausência
Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NMP/100mL)	Não exigido	Não exigido	Não exigido	Não exigido
Contagem de fungos (UFC/mL)	Não exigido	Não exigido	Não exigido	Não exigido
Valor máximo permitido de Concentração de endotoxinas bacterianas (EU/mL)	Não exigido	2	Não exigido	2

QUADRO 2- RELAÇÃO DE PARÂMETROS E PONTOS ANALISADOS COM OS LIMITES EXIGIDOS SEGUNDO LEGISLAÇÃO BRASILEIRA QUE ESTABELECE O REGULAMENTO TÉCNICO PARA O FUNCIONAMENTO DOS SERVIÇOS DE DIÁLISE

FONTE: o autor (2011)

Conforme RDC Nº. 154, de 15 de junho de 2004, que estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise, a água tratada para diálise, utilizada na preparação da solução para diálise, deve ser processada de modo que não apresente contagem de Coliformes totais em 100 mL; para contagem de bactérias heterotróficas o valor máximo permitido é 200 UFC/mL e concentração de Endotoxinas bacterianas o limite é 2 EU/mL. Para o dialisato o valor máximo permitido para contagem de bactérias é 2000 UFC/mL, não são exigidos pela legislação a contagem de coliformes totais e detecção de endotoxina bacteriana (QUADRO 2).

Para a água potável os limites foram os estabelecidos pela Portaria nº 518, de 25 de março de 2004, que estabelece os controles e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A contagem de bactérias heterotróficas deve ser inferior a 500 UFC/mL e ausência de *Escherichia coli* ou Coliformes termotolerantes (QUADRO 2).

Os testes microbiológicos adicionais, não contemplados na portaria para água de hemodiálise foram realizados, como contagem de fungos, com posterior identificação dos fungos filamentosos, e contagem de *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4 Contagem de bactérias heterotróficas

A contagem de bactérias heterotróficas foi realizada pelo método do plaqueamento em profundidade ou *Pour Plate* (APHA; AWWA; WPCF, 2005). A partir da amostra, foram realizadas as diluições sequenciais. Foi inoculado 1 mL das diluições selecionadas (10^0 e 10^1) em placas de Petri esterilizadas, a primeira inoculação foi diretamente da amostra (10^0), para cada diluição decimal foram inoculadas em placas de Petri em duplicata. O meio de cultura PCA (item 3.1.1) foi fundido em banho-maria e após resfriamento colocado na placa onde a amostra já havia sido inoculada. Incubaram-se as placas invertidas em estufa a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ pelo período de 48 horas.

Para contagem foram selecionadas as placas das diluições com 30 a 300 colônias e contadas com o auxílio de um Contador de colônias mecânico - marca PHOENIX - CP 602, o resultado foi expresso em UFC/mL. Em caso de dúvida na contagem devido ao tamanho diminuto de algumas colônias, as placas foram incubadas novamente a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por mais 3 dias, completando assim 5 dias de incubação.

3.5 Contagem de coliformes totais

A contagem de coliformes totais por NMP/ 100 mL foi realizada pelo método número mais provável (APHA; AWWA; WPCF, 2005).

Diretamente da amostra (10^0), foram inoculados volumes de 10 mL em uma série de 10 tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio com púrpura de bromocresol (item 3.1.4) concentração dupla (análise presuntiva). Incubou-se os tubos a $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. A presença de gás nos tubos de Durham e os tubos que demonstraram acidificação do meio mesmo sem produção de gás foram submetidos à confirmação.

Cada tubo de caldo lauril sulfato de sódio presuntivamente positivo foi inoculado, com o auxílio de alça (platina, níquel-cromo ou descartável) para tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% (item 3.1.5) (análise confirmativa). Os tubos semeados foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indicou a presença de coliformes totais.

A partir da combinação de números, correspondentes aos tubos que apresentarem resultado positivo, foram verificados quanto ao Número Mais Provável de coliformes totais conforme tabela no (APHA; AWWA; WPCF, 2005), expresso o valor obtido em NMP/100 mL.

3.6 Contagem de *Pseudomonas aeruginosa*

A contagem de *P. aeruginosa* por NMP/ 100 mL foi realizada pelo método número mais provável (APHA; AWWA; WPCF, 2005). Diretamente da amostra (10^0), inoculou-se volumes de 10 mL em uma série de 10 tubos de caldo asparagina concentração dupla (item 3.1.6). Incubaram-se os tubos a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Os tubos com o caldo asparagina apresentando turvação com ou sem presença de pigmentação (FIG. 4a), foram submetidos à confirmação.

Cada tubo de caldo asparagina presuntivamente positivo foi inoculado, com o auxílio de alça (platina, níquel-cromo ou descartável) para confirmação em tubos contendo caldo acetamida (item 3.1.7). Os tubos semeados foram incubados a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A presença de coloração rósea nos tubos (FIG. 4b) contendo caldo acetamida indicou a presença de *P. aeruginosa*. Foi realizada uma segunda confirmação semeando em meio sólido ágar cetrimide a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (FIG. 4c), o qual apresentou colônias fluorescentes.

A partir da combinação de números, correspondentes aos tubos que apresentarem resultado positivo, foram verificados quanto ao Número Mais Provável de *P. aeruginosa* conforme tabela no (APHA; AWWA; WPCF, 2005), o resultado expresso em NMP/100 mL.

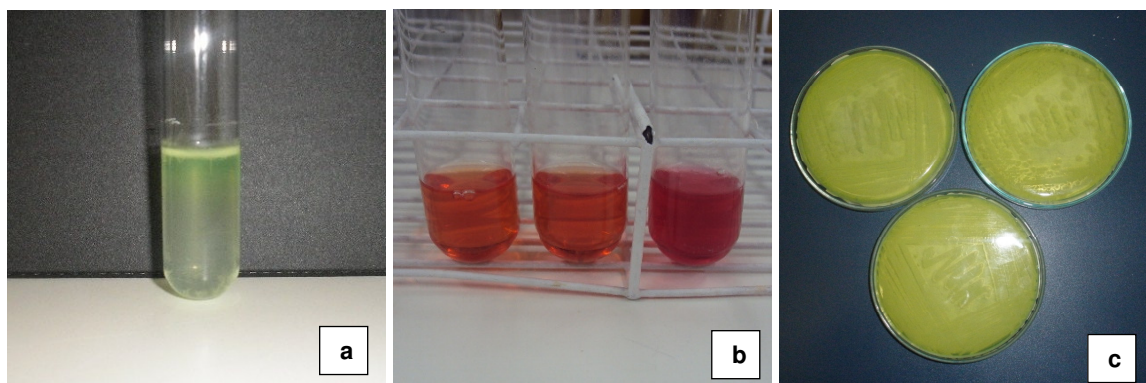


FIGURA 4 – PRESENÇA DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: **a.** Meio líquido asparagina contendo crescimento com supeita de *P. aeruginosa*, presença de pigmento incubação a 35 ± 1 °C por 48 horas. **b.** Tubos contendo meio líquido acetamida incubação 48 horas, tubo da direita positivo para *P.aeruginosa*. **c.** Placas de Petri contendo crescimento de *P.aeruginosa*, meio ágar cetrimide incubado a 35 ± 1 °C por 48 horas

3.7 Detecção de endotoxinas bacterianas (USP 31, 2008)

Para a detecção de endotoxina bacteriana foi utilizado o reagente LAL (Lisado de amebócitos de *Limulus*) obtido do extrato aquoso de células sanguíneas (amebócitos) do caranguejo-ferradura *Limulus polyphemus*.

O método consiste na adição de partes iguais do reagente LAL e da amostra a ser ensaiada e incubada por 1 hora a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, em banho maria, para verificar a formação ou não de gel, o qual indicou ou não a presença de endotoxina bacteriana. As concentrações de endotoxinas foram expressas em unidades de endotoxinas (EU/mL) (USP 31, 2008).

O LAL foi reconstituído com água apirogênica sendo que o volume estava determinado no rótulo do produto, adicionou-se o diluente pelas laterais do frasco sobre o LAL liofilizado. O frasco foi vedado com parafilme, e homogeneizado com movimentos suaves, em seguida o reagente reconstituído foi distribuído em tubos e vedados com parafilme. O reagente reconstituído só pode ser congelado e descongelado uma única vez. O manuseio deste reagente foi realizado com cuidado, pois o lisado é extremamente sensível e pode desintegrar facilmente sob agitação.

Para cada novo lote do LAL ou da Endotoxina Padrão se fez necessário a confirmação da sensibilidade declarada do reagente LAL. Este procedimento possibilita validar a técnica utilizada, o material e o técnico que realizou o ensaio.

A endotoxina padrão é *E.coli* 055:B5, e foi reconstituída com volume de água apirogênica, observando o volume utilizado e a potência declarada no certificado. Agitou-se a solução reconstituída em vórtex por tempo determinado pelo fabricante, logo após a reconstituição e todas as vezes que foi utilizada. O frasco foi estocado entre 2°C a 8°C.

Para realização do ensaio é necessário fazer o cálculo da MDV (máxima diluição válida), sendo que o limite de concentração de endotoxina (**CLE**) para água de hemodiálise é 2 EU/mL de acordo com a legislação brasileira vigente. Este cálculo permite estabelecer os limites de diluição que foram utilizados no ensaio.

$$\text{MVD} = \text{CLE da amostra de hemodiálise} / \text{sensibilidade do reagente LAL } (\lambda)$$

Onde foram usados os valores:

$$\text{MVD} = 2 / 0,125 \text{ EU/ mL} = 1/16$$

Realizou-se a diluição da amostra até 1/16 e distribui-se nos respectivos tubos, em seguida foram incubados a 37°C ±1°C por 1 hora ±2 minutos em banho-maria, imersos cerca de 3 cm na água. Durante esse período, evitou-se que os tubos sofressem qualquer tipo de abalo ou trepidação. Após tempo de incubação, retirou-se cuidadosamente cada tubo do banho-maria e procedeu-se a leitura (FIG. 5), invertendo-os lentamente.

Resultado positivo (+): Se um gel firme estiver formado no fundo do tubo (aderido ao fundo do tubo).

Resultado negativo (-): apresenta gel de aspecto mole ou pouco fluido, não caracterizando um gel firme, que solta do fundo do tubo.

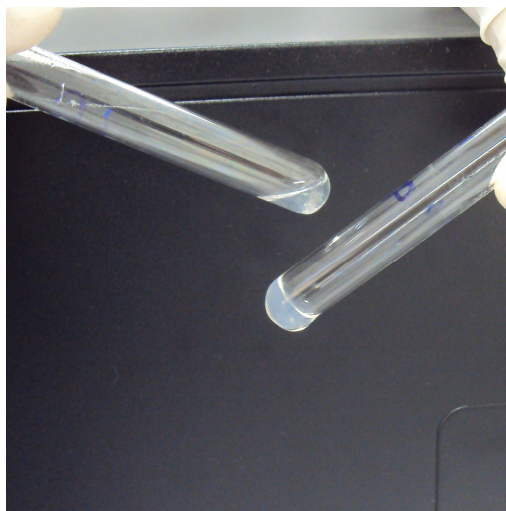


FIGURA 5 – ENSAIO DE DETECÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA EM AMOSTRA DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE REALIZADA PELO MÉTODO GEL-CLOT

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Leitura dos resultados tubo à esquerda resultado negativo sem formação de gel, tubo à direita resultado positivo com formação de gel

Se todos os tubos da reação apresentaram resultados esperados: controle negativo da água apirogênica dando resultado negativo (-), controle positivo da água com resultado positivo (+) e a amostra de água testada na diluição de trabalho dando resultado (-), considerou-se a mesma como aprovada e, conseqüentemente estando a sua concentração de endotoxina abaixo do limite especificado/permitido.

3.8 Contagem de fungos (APHA; AWWA; WPCF, 2005)

A contagem de fungos foi realizada utilizando-se o método de plaqueamento em superfície, utilizando o meio ágar dextrose batata (PDA) (item 3.1.2) com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A utilização de meios acidificados promoverá seletivamente o crescimento de fungos, inibindo o crescimento da maioria das bactérias presentes (APHA; AWWA; WPCF, 2005).

Fundiu-se o PDA e acidificou-se com ácido tartárico 10% (aproximadamente 1,5 mL/100 mL). Foram realizadas diluições decimais da amostra (10° e 10^1), Inoculou-se 0,1 mL da amostra sem diluição (10°) e da diluição selecionada (10^1) sobre a superfície seca do PDA, as amostras foram distribuídas em placa de Petri em duplicata. A amostra foi espalhada com alça de Drigalski por toda a superfície do

meio. Incubou-se as placas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo período de 5 dias, para primeira leitura, após verificação as placas retornaram a estufa por mais 15 dias, para avaliação de fungos de crescimento lento. O resultado foi expresso em UFC/mL.

Foi realizado teste adicional para contagem fungos utilizando a técnica de membrana filtrante nas águas das clínicas (APHA; AWWA; WPCF, 2005). As amostras foram filtradas utilizando membrana de celulose $0,45\ \mu\text{m}$, o volume filtrado foi de 100 mL. Após filtração a membrana foi colocada sobre a superfície do meio de cultivo PDA. Incubou-se as placas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pelo período de 5 dias, para primeira leitura, após verificação as placas retornaram a estufa por mais 15 dias, para avaliação de fungos de crescimento lento. Após incubação as placas foram avaliadas e quantificadas quanto ao crescimento de fungos filamentosos e leveduras, e o resultado expresso em UFC/100 mL.

3.9 Isolamento e identificação de fungos filamentosos

3.9.1 Macro e Micromorfologia

Para identificação dos fungos filamentosos as características macroscópicas de cada colônia isolada foram avaliadas: cor (superfície, reverso, bordas e meio), textura, consistência e velocidade de crescimento. Cada colônia isolada foi repicada em Ágar Sabouraud (item 3.1.3) e foi realizado o microcultivo para posterior identificação (KERN; BLEVINS, 1999; HOOG de; GUARRO, 2004).

3.10 Sequenciamento de regiões ITS do rDNA

3.10.1 Extração de DNA (VICENTE, 2000)

Os isolados foram inoculados em placas de Petri contendo meio PDA, e incubados a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após o crescimento, foi retirado $1\ \text{cm}^2$ da colônia. Em seguida, foi colocado em tubo Eppendorf com sílica em pó e celite (2:1) e 300 μL de tampão CTAB. O micélio então foi triturado manualmente por cerca de 5 minutos. Adicionando-se mais 200 μL de tampão CTAB, e incubado em banho-maria a 65°C

por 10 minutos. Acrescentou-se 500 μ L de clorofórmio, que foi usado para remover proteínas das preparações de ácidos nucleicos, e centrifugado por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi novamente adicionado clorofórmio e levado para centrífuga por 7 minutos a 12000 rpm. Em seguida, adicionado 800 μ L de etanol 96%, agitado delicadamente e levado ao freezer a -20°C *overnight*. Repetiu-se a centrifugação por 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 500 μ L de etanol 70%. Centrifugado por mais 7 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante novamente descartado com auxílio de uma micropipeta de 200 μ L e o DNA deixado para desidratar por uns 15 minutos (tubo aberto, protegido com lenço de papel) em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em 100 μ L de água ultrapura e deixado *overnight* em temperatura ambiente, após este passo foi guardado em freezer. Posteriormente, o DNA teve sua integridade verificada em gel de agarose 0,8%.

3.10.2 Reação de sequenciamento de regiões ITS do rDNA

Primeiramente foi realizada uma reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) V9G e LS266 universais para fungos (QUADRO 3), que amplificaram a região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal.

Primer	Sequência	Referência
V9G	5' TTACGTCCCTGCCCTTTGTA 3'	Hoog; Gerrits (1998)
LS266	5'GCATTCCCAAACAACCTCGACTC3'	Hoog; Gerrits (1998)
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'	White <i>et al.</i> (1990)
ITS 4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White <i>et al.</i> (1990)

QUADRO 3 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA E SEQUENCIAMENTO DOS FUNGOS DEMATIÁCEOS ISOLADOS DA ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO
FONTE: O autor (2011)

A amplificação para as amostras fúngicas seguiu as condições a seguir: 50ng de DNA extraído, tampão PCR 1X, 0,02 U/ μ L de *Taq* polimerase, 0,8 μ M de *primers* (3pmol/reação), 0,2mM de cada dNTP, 3mM de MgCl₂ em um volume final

de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf®* modelo *Mastercycler Gradient* com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C, e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Aos produtos da amplificação foram acrescentados 50 µL de PEG (PEG 20%, NaCl 2,5M) e incubados a 37°C por 30 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao restante foi adicionado 125 µL de etanol 80% gelado. Após 1 minuto em etanol 80% os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao restante adicionado 125 µL de etanol absoluto gelado pela parede do tubo. Novamente o sobrenadante foi descartado e o restante do etanol evaporado em *Speed Vac*. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 15 µL de água ultrapura e deixado a temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

As reações de sequenciamento consistiram de 1 a 3 µL da PCR purificada, 0,5 µL de tampão 5X (*Applied Biosystems*); 1 µL de cada *primer* (ITS1 e ITS4); 0,5 µL de *Big-Dye*; e completada a reação de 10 µL de volume final com água ultra pura. As reações amplificadas foram submetidas a 96°C por 1 min, e por 35 ciclos a 96°C por 10 s em 50°C por 5 s e por 60°C por 4min. Após secagem os fragmentos gerados foram ressuscitados em Hi-formamida e sequenciados em sequenciador automático ABI 3130 (*Applied Biosystems*).

As sequências foram editadas usando o programa *STADEN Package* (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2001). Para a obtenção da composição nucleotídica e aminoácida, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis foi utilizado o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011, submetido à publicação ²). A análise das sequências foi feita aplicando-se o programa de alinhamento de sequências BLASTn (*National Center for Biotechnology Information*). Estas e outras sequências de isolados similares, disponibilizados no *GenBank*, foram alinhadas e comparadas, por meio do programa CLUSTAL-W 1.7 (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

² TAMURA, K. *et al.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011, submetido à publicação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Coleta de amostras

Foram realizadas as coletas no ponto 1 (água potável), ponto 2 (água tratada para diálise), ponto 3 (dialisato), em alguns meses, a coleta do ponto 3 (dialisato) foi substituída pelo ponto 4 (água tratada para diálise).

No presente estudo, em 12 % das amostragens, a água do ponto 2 apresentou concentração de endotoxina bacteriana superior a 2 EU/ mL, e no ponto 3 da mesma clínica e mesmo mês de coleta o dialisato apresentou-se negativo para endotoxina bacteriana (parâmetro não exigido pela legislação) estando inferior a 2 EU/ mL, por esta razão, realizou-se a coleta no ponto 4 substituindo o ponto 3, para comparação entre a qualidade da água dos pontos 2 e 4, pois ambos apresentavam os mesmos parâmetros exigidos pela legislação brasileira. As diferenças de resultados de ensaio de endotoxina entre os pontos 2 e 3 estão demonstrados no QUADRO 4.

Clínicas	Pontos com limite máximo permitido pela RDC 154 da ANVISA 2004 para água tratada para diálise (2 EU/mL). Para o dialisato o ensaio não é exigido	Detecção de endotoxina bacteriana	
		Frequência e data da ocorrência	Resultado (EU/mL)
A	2- Água tratada para diálise	2 (08/12/2009)	>2
	3- Dialisato	(23/03/2010)	<2
B	2- Água tratada para diálise	6 (24/11/2009)	>2
	3- Dialisato	(08/12/2009) (27/01/2010) (23/02/2010) (23/03/2010) (26/05/2010)	<2
E	2- Água tratada para diálise	1 (25/03/2010)	>2
	3- Dialisato		<2

QUADRO 4- DIFERENÇAS DE RESULTADOS OBSERVADOS ENTRE OS PONTOS DE COLETA 2 (ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE) E 3 (DIALISATO) NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE PARA O PARÂMETRO ENDOTOXINA BACTERIANA

FONTE: O autor (2011)

Houve, também, diferença entre os resultados obtidos para as três amostragens realizadas entre o ponto 2 e 3 para a contagem de *P. aeruginosa* na clínica **F**, a água do ponto 2 apresentou-se positiva enquanto o dialisato no ponto 3 apresentou-se negativo.

Segundo Arduíno *et al.* (1991) uma redução de 1 log para o padrão de contagem de bactérias em água tratada para diálise em comparação ao padrão do dialisato foi normatizado por causa do potencial de multiplicação das bactérias quando a água flui através do sistema de distribuição e da máquina de diálise. Uma das hipóteses levantadas sobre os resultados de endotoxinas bacterianas acima de 2 EU/mL no ponto 2, é a presença de contaminantes nas torneiras, por alguma falha na limpeza e desinfecção, já que o ponto 3 apresentou resultado inferior a 2 EU/mL no dialisato.

4.1 Contagem de bactérias heterotróficas

O quadro 5 mostra os resultados obtidos referentes a contagem de bactérias nas amostras, em diferentes pontos de coleta e em diferentes clínicas. Os limites máximos permitidos para cada ponto e número de amostras aceitáveis e não aceitáveis de acordo com a legislação vigente brasileira são apresentados.

Pontos Clínicas	P1 Limite 500 UFC/mL			P2 Limite 200 UFC/mL			P3 Limite 2000 UFC/mL			P4 Limite 200 UFC/mL			P3 e P4
	Ac.	N.Ac.	T	Ac.	N.Ac.	T	Ac.	N.Ac.	T	Ac.	N.Ac.	T	T
A	0	12	12	0	12	12	0	11	11	0	01	01	12
B	01	11	12	02	10	12	0	09	09	0	04	04	13*
C	01	11	12	01	11	12	0	10	10	0	02	02	12
D	0	12	12	0	12	12	0	10	10	0	02	02	12
E	01	11	12	02	10	12	01	09	10	0	02	02	12
F	0	12	12	01	11	12	0	08	08	0	04	04	12

QUADRO 5- CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NAS AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE

FONTE: O autor (2011)

NOTA: P1- água potável; P2- água tratada para diálise coletada nas torneiras da sala de reuso; P3- dialisato coletado na máquina de hemodiálise (pós-capilar); P4- água tratada para diálise, coletada em torneira após o tratamento antes da distribuição para sala de reuso e sala de hemodiálise; Ac.- amostras com resultados aceitáveis conforme legislação vigente do Brasil, para o parâmetro contagem de bactérias heterotróficas; N.Ac.- amostras com resultados não aceitáveis, conforme legislação vigente do Brasil, para o parâmetro contagem de bactérias heterotróficas; T.- Total de amostras; * foram coletas treze amostras no total dos pontos 3 e 4 devido à instalação de novo equipamento na clínica.

Neste estudo, as amostras incubadas em meio PCA em temperatura $35 \pm 1^\circ\text{C}$, foi verificado que em 19% (42/217) das amostras, a contagem de bactérias

heterotróficas foi inferior em 48 horas, quanto ao número de unidades formadoras de colônias, comparada à contagem com 5 dias de incubação (QUADRO 6).

Clínicas	Leituras 48 horas e 5 dias (UFC/mL)							
	PONTO 1 – Água potável		PONTO 2 – Água tratada para diálise		PONTO 3 - Dialisato		PONTO 4 - Água tratada para diálise	
	48 h	5dias	48 h	5dias	48 h	5dias	48 h	5dias
A	NO		1,5 3 <1 <1	43 25 1 27	240 6 <1 260	430 15 4,5 370	<1	4,5
B	1,5 <1 19 39 25 81	590 160 200 57 55 100	1,5 1 223	160 43 380	<1 <1 32	47 25 52	3	40
C	38 21 1	190 29 18	24 7,5	77 1200	20	470	158	200
D	<1 <1	11 15	3 <1	3,5 34	NO		NO	
E	NO		37 28	49 110	1 29	2 39	NO	
F	<1	3,5	2 40 18 58,5	3 44 25 62	NO		NO	

QUADRO 6- RESULTADOS DA CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE EM FUNÇÃO DE TEMPO DE INCUBAÇÃO (48 HORAS E 5 DIAS A 35 °C) INCUBADAS EM MEIO PCA.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: NO- Não foi observada diferença entre as contagens de bactérias entre as leituras de 48 horas e 5 dias

Essa diferença de contagem observada entre os tempos de incubação de 48 horas e 5 dias em meio PCA sugere a necessidade de uma normatização de metodologia para este parâmetro, bem como para o meio de cultura.

As diferentes normas internacionalmente utilizadas relacionam diferentes tempos, meios e temperaturas de incubação para a realização dos ensaios. Não existindo uma padronização, os laboratórios empregam diferentes protocolos para trabalhar (QUADRO. 7), dificultando a comparação entre os resultados de estudos relacionados à contagem de bactérias heterotróficas.

Técnicas de cultivo				
Normas nacionais e internacionais	Ano publicação	Técnica de cultivo		
		Meio de cultivo	Temperatura de incubação (°C)	Tempo de incubação
AAMI	1982	TSA	35	48 horas
Ph Eur, 2 nd Ed.	1992	TSA	30-35	5 dias
ISO 13959	2002	TSA	35	48 horas
AAMI RD52	2004	TSA	35	48 horas
Ph Eur, 4 th Ed.	2002	R2A	30-35	5 dias
Suécia LS	1990-2007	TGEA	22	> 5 dias
Alemanha	1998-2005	TGEA	17-23	7 dias
França Circ 311	2000	TGEA	17-23	7 dias
EDTNA	2001	TGEA	17-23	7 dias
EDTA	2001	TGEA	17-23	7 dias
Itália	2005	TGEA	17-23	7 dias
Dinamarca	2006	TGEA	17-23	7 dias
Noruega	2007	TGEA	17-23	7 dias
ISO/DIS 13959 (draft)	2007	TGEA	17-23	7 dias

QUADRO 7 – RELAÇÃO DE NORMAS E TÉCNICAS PARA CULTIVO DE BACTÉRIAS EM ÁGUA DE DIÁLISE E DIALISATO

FONTE: Adaptado de NYSTRAND, 2008a

NOTA: AAMI= Associação para o Progresso da Instrumentação médica; Ph Eur= Farmacopéia européia; ISO= Organização Internacional para Padronização; EDTNA= Associação Européia de Enfermagem de Diálise e Transplante; EDTA= Associação Européia de Diálise e Transplante; TSA= ágar soja triptose; TGEA= Agar extrato de triptona glucose.

Gomila *et al* (2005) em trabalho realizado isolaram 203 bactérias planctônicas em água e solução de diálise utilizando meio R2A incubado por 10 dias a 20°C. Bugno, Almodóvar e Pereira (2010) concluíram que a contagem de bactérias heterotróficas em água para diálise deve ser realizada com o meio R2A associado com maior tempo de incubação, após estudar 193 amostras inoculadas em meios PCA e R2A, com 96 horas de incubação.

Arduíno *et al.* (1991) não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa na recuperação bacteriana entre tempo e temperatura de incubação e entre os meios R2A e o ágar padrão para contagem, embora a média das contagens que encontraram, tenham sido ligeiramente maior quando a temperatura usada foi 30° C e tempo de incubação de 72 horas. Para Nystrand (2008a), em temperaturas elevadas a microbiota da água tem dificuldades na formação de colônias visíveis, especialmente quando os períodos de incubação são curtos.

A comparação de resultados para contagem de bactérias heterotróficas torna-se difícil, devido às variáveis que ocorrem durante a realização dos ensaios em cada laboratório. Segundo Nystrand (2008) um problema é que as recomendações referem-se a diferentes técnicas de cultivo, significando que,

mesmo que o limite estabelecido em números seja o mesmo, a interpretação não é a mesma.

No presente trabalho, verificou-se que das amostras do ponto 1 (água potável) 96% (69/72) apresentaram a contagem de bactérias heterotróficas inferior a 500 UFC/ mL, estando em conformidade com a portaria 518 do Ministério da Saúde para a potabilidade de água (TAB. 1). Porém ocorrem as seguintes não conformidades: na clínica **B** em fevereiro de 2010 (590 UFC/mL), na clínica **C** em janeiro de 2010 (700 UFC/mL) e na amostra da clínica **E** em novembro de 2009 (560 UFC/mL). Nas clínicas **A**, **D** e **F** as contagens estiveram dentro dos limites em todas as amostragens.

TABELA 1 – CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS DOS 4 PONTOS DE COLETA NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE COM OS RESPECTIVOS LIMITES MÁXIMOS DE ACORDO COM LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Pontos de coleta	Limites referenciais para contagem de bactérias heterotróficas	Resultados insatisfatórios	Resultados abaixo de 100 UFC/mL	Resultados abaixo de 50 UFC/mL
Todos os pontos	Na	5% (10/217)	Na	Na
Ponto 1 Água potável	< 500 UFC/mL	4% (3/72)	Na	Na
Ponto 2 Água Tratada para diálise	< 200 UFC/mL	8% (6/72)	87% (63/72)	79% (57/72)
Ponto 3 dialisato	< 2000 UFC/mL	2% (1/58)	79 % (46/58)	Na
Ponto 4 Água Tratada para diálise	< 200 UFC/mL	0% (0/15)	93% (1/15)	93% (1/15)

FONTE: O autor (2011)

Nota: Na: não se aplica

No ponto 2 (água tratada para diálise) o valor máximo permitido de bactérias heterotróficas, de acordo com a legislação brasileira, é 200 UFC/mL. Observou-se que 92% (66/72) das amostras apresentaram-se satisfatórias, com a contagem inferior a 200 UFC/mL(TAB.1). Em 87% (63/72) as contagens foram inferiores a 100 UFC/mL. Considerando o nível de atenção mencionado na legislação para contagem de bactérias foi verificado que 21% (15/72) das amostras apresentaram a contagem acima de 50 UFC/mL. Neste caso a RDC 154 prevê para as clínicas, o nível de ação indicando a necessidade de adoção de providências para a identificação do foco de contaminação. Em 28% (20/72) das amostras as contagens foram inferiores a 1 UFC/mL (não detectado).

As amostras positivas, para o ponto 2, ocorreram na clínica B em novembro de 2009, 260 UFC/mL e em maio de 2010 380 UFC/mL; clínica C em agosto de 2010 a contagem foi 1200 UFC/mL; clínica E em janeiro de 2010 a contagem foi 420 UFC/mL e em março de 2010 1600UFC/mL; na clínica F 1300 UFC/mL em abril de 2010.

Foram realizadas 58 amostragens do ponto 3 (dialisato), sendo que 98% (57/58) foram consideradas satisfatórias com contagem inferior a 2000 UFC/mL (TAB 1).

E no ponto 4 (água tratada para diálise) 100% das amostras foram satisfatórias para contagem de bactérias heterotróficas

Verificou-se que as médias das contagens de bactérias heterotróficas apresentaram variações de acordo com cada clínica, conforme figura 6.

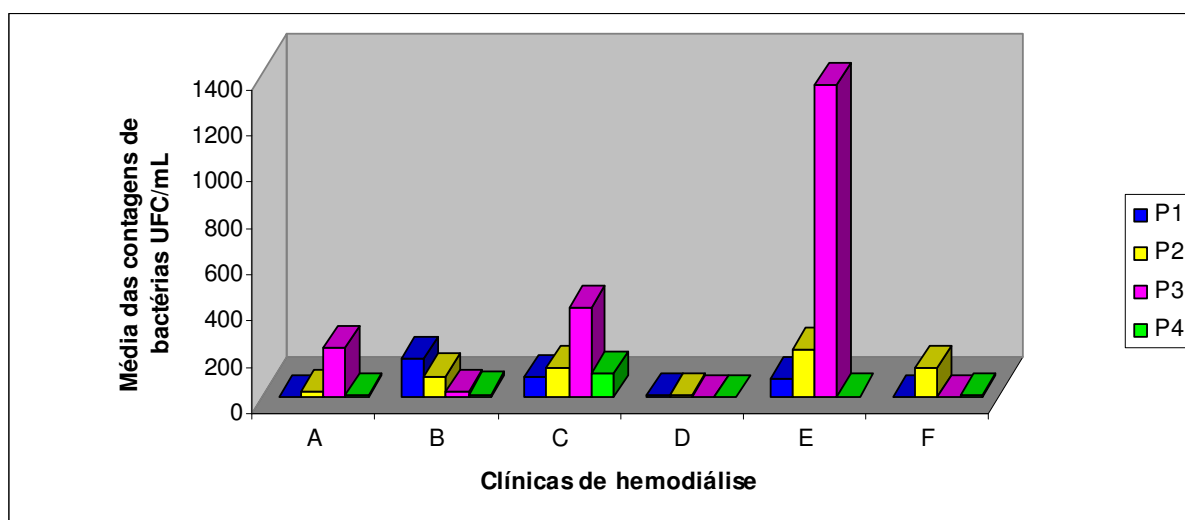


FIGURA 6 – MÉDIAS DAS CONTAGENS DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS NOS QUATRO PONTOS DE COLETA NAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE

FONTE: O autor (2010)

Em 39 amostras do ponto 1 (água potável antes do tratamento para diálise) a contagem de bactérias heterotróficas apresentou-se inferior a contagem do ponto 2 (água após o tratamento), indicando a contaminação após o tratamento (QUADRO 8). Segundo Montanari *et al.* (2009) nos sistemas de água para diálise, os tubos, tanques e torneiras representam potenciais reservatórios para micro-organismos contribuindo para a formação de biofilmes.

Contagem antes de tratamento	Contagem após tratamento	
Ponto 1 (72 amostras analisadas)	Ponto 2 (72 amostras analisadas)	Ponto 4 (15 amostras analisadas)
Contagem igual após o tratamento	11	2
Contagem maior que após o tratamento	22	9
Contagem menor que após o tratamento	39	4

QUADRO 8- NÚMEROS DE COLETAS E COMPARAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS ANTES E DEPOIS DA ÁGUA PASSAR PELO SISTEMA DE TRATAMENTO DE ÁGUA DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE

FONTE: O autor (2011)

No presente estudo verificou-se que 95 % (10/217) das amostras testadas nos 4 pontos de coleta, estiveram de acordo com os limites preconizados pela legislação para o parâmetro contagem de bactérias. Observou-se que em 86 % (125/145) das amostras dos pontos 2, 3 e 4, os valores encontrados foram inferiores a 200 UFC/mL e em 85 % (124/145) foram inferiores a 100 UFC/mL. Estes índices são recomendáveis comparados a outros estudos, o ideal seria que todas as clínicas também apresentassem esta qualidade na água, evitando assim reações para os pacientes devido à presença de contaminantes.

Ramirez (2009) fez um levantamento de resultados de análise de água tratada para diálise em clínicas de diálise no Rio de Janeiro, tendo constatado que 68 % e 70 % das amostras analisadas foram satisfatórias nos anos de 2006 e 2007 respectivamente. No presente estudo, observaram-se melhores condições em 92% das amostras do ponto 2 e 100% da água do ponto 4 (água tratada para diálise) apresentaram resultados satisfatórios.

Em pesquisa realizada em dois centros de hemodiálise na cidade de Alexandria na Grécia, as amostras do dialisato mostraram maior aceitabilidade na unidade B (86,1%) que na unidade A (51,7%) (ABBASS *et al.*, 2006). No presente estudo observou-se 98% de amostras do dialisato estavam satisfatórias.

Em outro estudo realizado em 85 centros de hemodiálise na Grécia a água tratada e dialisato estavam de acordo com as normas da AAMI (<200 UFC/ mL na água e < 2000 UFC/mL no dialisato) em 92,6% e 63,7% respectivamente (ARVANITIDOU, 1998).

Abbass *et al.* (2006) descreveram que de um total de 321 amostras de água para diálise 83,2% eram aceitáveis, sendo que o limite de aceitabilidade neste

trabalho era <100 UFC/mL de acordo com Farmacopéia Européia. Em comparação ao presente estudo, encontrou-se 87% de amostras do ponto 2 e 93% do ponto 4 (ambas as água tratada para diálise) com contagens inferiores a 100 UFC/mL.

4.3 Contagem de coliformes totais

De acordo com a RDC 154, a amostra é considerada satisfatória quando o resultado de coliformes totais é inferior a 1.1 NMP/mL ou ausência em 100 mL.

A contagem de coliformes totais esteve de acordo com a legislação em 100% das amostras, sendo que uma amostra da clínica **F**, coletada no ponto 2 em setembro de 2010, apresentou suspeita de coliformes totais devido à acidificação do meio e formação de gás (FIG. 7). E seguiram para confirmação através de inoculação em caldo bile, após período de incubação em estufa a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, mas não ocorreu turvação ou formação de gás na amostra analisada, sendo considerada inferior a 1,1 NMP/100 mL.

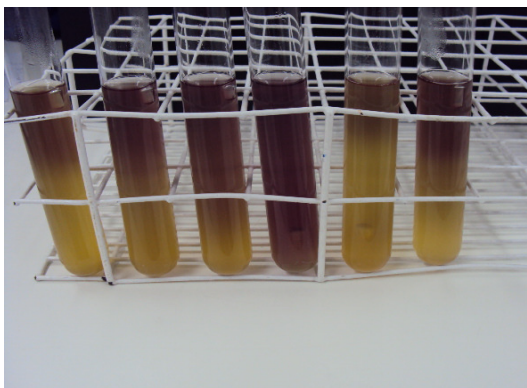


FIGURA 7 – AMOSTRA DE ÁGUA DE HEMODIÁLISE DA CLÍNICA **F** COLETADA NA TORNEIRA DA SALA DE REUSO (PONTO 2) COM SUSPEITA DE PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS, COM TUBOS DE DURHAN COM PRESENÇA DE GÁS E MEIO ACIDIFICADO EM MEIO LÍQUIDO LAURIL SULFATO DE SÓDIO

FONTE: O autor (2010)

Abbas *et al.* (2006) analisaram coliformes totais em 225 amostras de dois centros de hemodiálise na Grécia, observando que 95,1% tiveram resultados aceitáveis e 4,9% não aceitáveis.

4.4 Contagem de *Pseudomonas aeruginosa*

O quadro 9 mostra os pontos coletados nas 6 clínicas para a análise contagem de *P. aeruginosa*, e o número de amostras analisadas em cada ponto.

Pontos Clínicas	P1			P2			P3			P4			P3 e P4
	Pos (+)	Neg (-)	T	Pos (+)	Neg (-)	T	Pos (+)	Neg (-)	T	Pos (+)	Neg (-)	T	T
A	0	12	12	0	12	12	0	11	11	0	01	01	12
B	0	12	12	0	12	12	0	09	09	0	04	04	13*
C	0	12	12	0	12	12	02	08	10	0	02	02	12
D	01	11	12	0	12	12	0	10	10	0	02	02	12
E	0	12	12	0	12	12	01	09	10	0	02	02	12
F	01	11	12	3	09	12	0	08	08	0	04	04	12

QUADRO 9- AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO SUBMETIDAS AO ENSAIO DE CONTAGEM DE *P. aeruginosa* DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTES: O autor (2011)

NOTA: P1- água potável; P2- água tratada para diálise coletada nas torneiras da sala de reuso; P3- dialisato coletado na máquina de hemodiálise (pós-capilar); P4- água tratada para diálise, coletada em torneira após o tratamento antes da distribuição para sala de reuso e sala de hemodiálise; Pos (+)- amostras positivas para o parâmetro contagem de *P. aeruginosa*; Neg (-)- amostras negativas para o parâmetro contagem de *P. aeruginosa*; T- Total de amostras analisadas; * foram coletadas treze amostras no total dos pontos 3 e 4 devido à instalação de novo equipamento na clínica.

Das 217 análises para o parâmetro *P.aeruginosa*, oito amostras foram positivas, sendo que duas no ponto 1, três no ponto 2, três no ponto 3 coletadas da máquina de hemodiálise e nenhuma no ponto 4 (QUADRO 9; FIG. 8). O índice de positividade encontrado foi de 4% (8/217) um índice baixo comparado ao estudo realizado por Arvanitidou, *et al.*, (2003) os quais encontraram 22,7% de amostras positivas e Oie *et al.* (2003) que obtiveram 20% de amostras positivas no sistema de tratamento de água em unidades de hemodiálise.

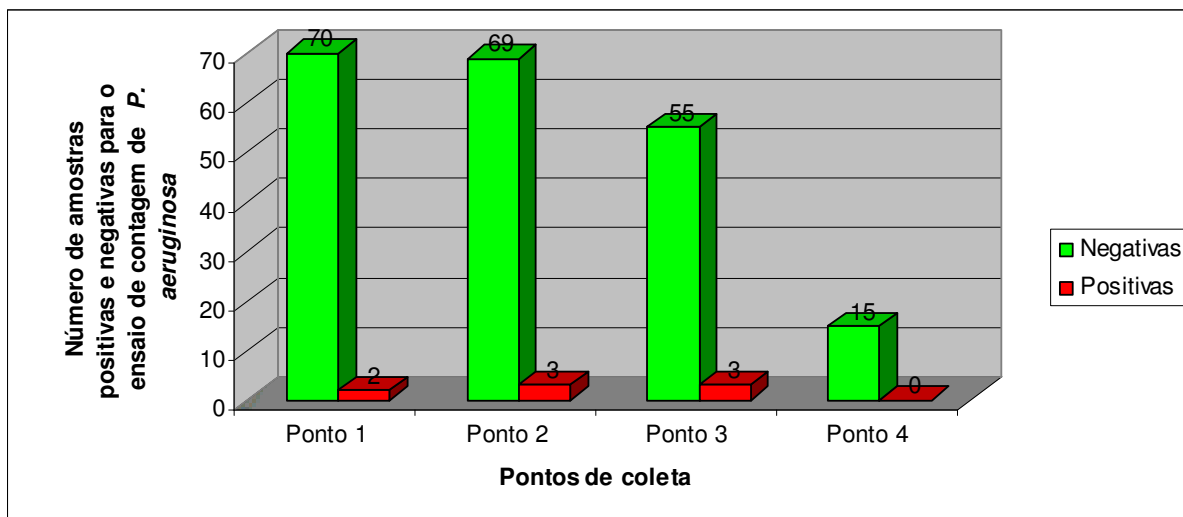


FIGURA 8– RESULTADOS DA CONTAGEM DE *Pseudomonas aeruginosa* EM ÁGUA E DIALISATO DAS CLÍNICAS AVALIADAS

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Ponto 1- água potável; Ponto 2- água tratada para diálise coletada nas torneiras da sala de reuso; Ponto 3- dialisato coletado na máquina de hemodiálise (pós-capilar); Ponto 4- água tratada para diálise, coletada em torneira após o tratamento antes da distribuição para sala de reuso e sala de hemodiálise.

P. aeruginosa tem sido frequentemente isolada em sistemas de água de diálise (Pisani *et al.*, 2000; Oie *et al.*, 2003; Arvanitidou *et al.*, 2003; Ducki *et al.*, 2005; Ferreira, 2009). Filippis *et al.* (2005) sugerem *P. aeruginosa* como um parâmetro adicional para assegurar a qualidade microbiológica de água de diálise.

Pontos	Clinicas	Contagens de <i>P. aeruginosa</i> (NMP/100 mL)	Contagens de bactérias heterotróficas (UFC/mL)	Deteção de Endotoxina bacteriana EU/mL
1- Água Potável	D	1.1	4	Não analisado
	F	3.6	<1	Não analisado
2- Água tratada para diálise	F	>23	41	<2
	F	1.1	44	<2
	F	1.1	62	<2
3 - Dialisato	C	>23	1300	>2
	C	1.1	15	>2
	E	2.2	150	<2

QUADRO 10- COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS POSITIVOS PARA *P. aeruginosa*, CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS E ENDOTOXINA BACTERIANA EM AMOSTRAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTE: O autor (2011)

Observou-se que das oito amostras positivas para o parâmetro *P. aeruginosa* sete apresentaram contagem de bactérias heterotrófica e duas apresentaram concentração de endotoxina bacteriana superior a 2 EU/mL (QUADRO 10). Este parâmetro não é contemplado na legislação vigente do país, mas é considerado importante, devido à ocorrência de surtos de bacteremias em pacientes em hemodiálise (PISANI *et al.*, 2000). Segundo Nystrand (2008a) um organismo comum de veiculação hídrica como a *P. aeruginosa* requer 430.000 células em suspensão para resultar em uma atividade de 1 EU/mL. Por esta razão, não é suficiente analisar apenas endotoxinas.

4.5 Detecção de endotoxina bacteriana

O quadro 11 relaciona os locais amostrados nas seis clínicas para a detecção de endotoxina bacteriana, indicando o número de amostras analisadas em cada ponto, os limites máximos permitidos para cada ponto e o número de amostras conformes e não conformes de acordo com a legislação vigente brasileira.

Pontos Clínicas	P1	P2- limite máximo permitido 2 EU/mL			P3- sem limite estabelecido pela legislação vigente.			P4- limite máximo permitido 2 EU/mL			P3 e P4
		Pos.	Neg.	T	Pos.	Neg.	T	Pos.	Neg.	T	
A	Na	03	09	12	02	09	11	0	01	01	12
B	Na	07	04	11*	0	09	09	01	03	04	13*
C	Na	10	02	12	08	02	10	01	01	02	12
D	Na	0	12	12	0	10	10	02	0	02	12
E	Na	01	11	12	01	09	10	0	02	02	12
F	Na	0	12	12	0	08	08	0	04	04	12

QUADRO 11- AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS SUBMETIDAS AO ENSAIO DE ENDOTOXINA BACTERIANA

FONTE: O autor (2011)

NOTA: P1- água potável; P2- água tratada para diálise coletada nas torneiras da sala de reuso; P3- dialisato coletado na máquina de hemodiálise (pós-capilar); P4- água tratada para diálise, coletada em torneira após o tratamento antes da distribuição para sala de reuso e sala de hemodiálise; Na- não analisado; Pos (+)- amostras positivas para o parâmetro endotoxina bacteriana; Neg (-)- amostras negativas para o parâmetro endotoxina bacteriana; * foram coletadas onze amostras no ponto 2 e treze no total dos pontos 3 e 4 devido à instalação de novo equipamento na clínica.

Em cada clínica foi realizada a coleta mensal em dois pontos (2 e 3 ou 2 e 4) das amostras, sendo considerada positiva quando o resultado de concentração de

endotoxina > 2 EU/mL nos dois pontos analisados. O sistema de tratamento de água das clínicas apresentou 85% (61/72) em conformidade com os limites (FIG. 9). Sendo que nas clínicas A e B foi observado um episódio positivo enquanto que na clínica C registrou-se nove episódios, e nas Clínicas D, E e F nenhum episódio positivo foi observado (QUADRO 11).

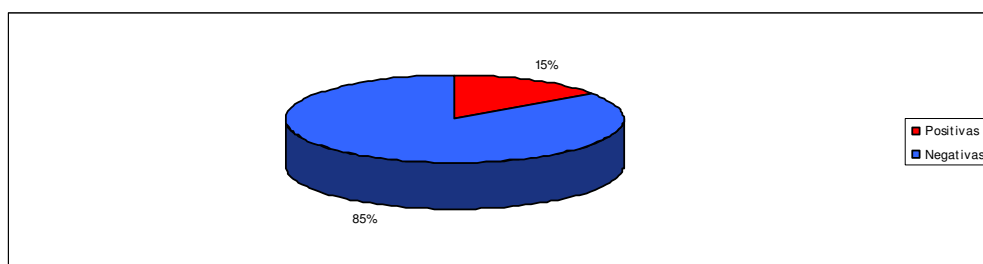


FIGURA 9 - PORCENTAGENS DE RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DE ENDOTOXINA BACTERIANA NA ÁGUA PARA DIÁLISE DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTE: O autor (2010)

Das 144 amostras analisadas (pontos 2, 3 e 4) 75 % apresentaram resultado satisfatório para endotoxina bacteriana. Em 43% das amostras a concentração de endotoxinas foi superior a 0,125 e inferior ou igual a 2 EU/mL e em 32 % inferior ou igual a 0,125 EU/ mL, indicando uma água de excelente qualidade, sendo que 58 das amostragens eram do dialisato, ponto para o qual não existem limites para endotoxinas bacterianas estabelecidos na legislação brasileira (TAB. 2; FIG. 10).

TABELA 2 – RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA EM 3 PONTOS DE COLETA COM OS RESPECTIVOS LIMITES MÁXIMOS DE ACORDO COM LEGISLAÇÃO BRASILEIRA

Pontos de coleta	Limites de endotoxina bacteriana	Resultados satisfatórios	Resultados >0,125 a <2 EU/mL	Resultados <0,125 EU/mL
Todos os pontos		75% (108/144)	43% (62/144)	32% (46/144)
Ponto 2	< 2 EU/mL	70% (50/71)	42% (30/71)	28% (20/71)
Água Tratada para diálise				
Ponto 3	Não exigido	81% (47/58)	47% (27/58)	34% (20/58)
Dialisato				
Ponto 4	< 2 EU/mL	73% (11/15)	33% (5/15)	40% (6/15)
Água Tratada para diálise				

FONTE: O autor (2011)

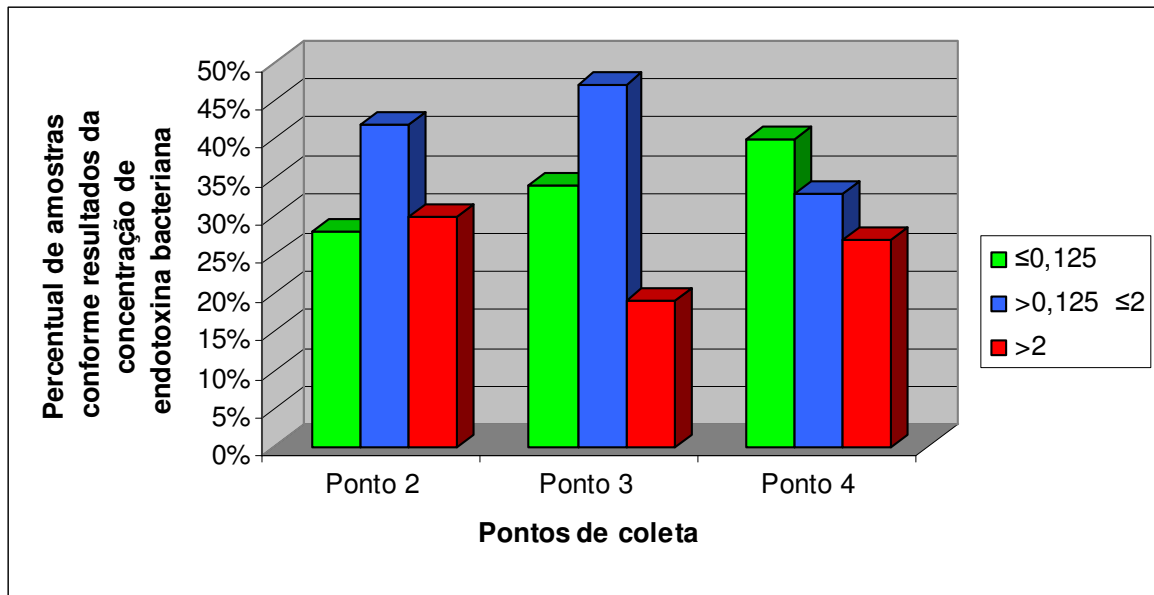


FIGURA 10 - RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINA BACTERIANA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DIALISATO TESTADAS EM TRÊS PONTOS DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS
 FONTE: O autor (2010)

Ramirez (2009) em levantamento realizado com resultados de análises de sistemas de água de clínicas de hemodiálise do Rio de Janeiro, encontrou no ano de 2006 88% e em 2007 98% das amostras de água tratada para diálise, com resultados satisfatórios para o parâmetro endotoxina bacteriana. Em outro estudo com 50 amostras 12% apresentaram resultados aceitáveis, mas o limite era inferior a 0,25 EU/mL (ABBASS *et al.* 2006). No presente trabalho, verificou-se que 32% das amostras analisadas apresentaram resultado de endotoxina bacteriana inferior a 0,125 EU/mL, valor inferior ao limite máximo de 0,25 EU/mL estabelecido em países como a Itália, Suécia, Alemanha e Noruega (NYSTRAND, 2008a).

Verificou-se que 25 amostras, dos pontos 2 e 4 (água tratada para diálise), apresentaram concentração de endotoxina bacteriana acima de 2 EU/mL, e as contagens de bactérias heterotróficas, para estas amostras, variaram entre <1 a 1600 UFC/mL, sendo que, em 68% (17/25) as contagens de bactérias heterotróficas foram inferior a 50 UFC/mL. Pensava-se que a detecção de endotoxina poderia ser usado em vez da contagem de bactérias, embora, vários estudos mostrem a falta de correlação entre a contaminação microbiana e a concentração de endotoxina. (CANAUD, 2001).

4.6 Contagem de fungos

O quadro 12 mostra os resultados de contagem de fungos indicando o número de amostras analisadas em cada ponto, os métodos de contagem de fungos utilizados e número de amostras positivas e negativas. Como não existem limites para a contagem de fungos na legislação brasileira, foram consideradas positivas as amostras que apresentaram contagem igual ou superior a 10 UFC/ mL, pelo método de contagem em superfície e igual ou superior a 100 UFC/100 mL pelo método filtração por membrana.

CLÍNICAS	FUNGOS	P1						P2						P3						P4						T P3 e P4
		MF			MS			MF			MS			MF			MS			MF			MS			
		+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	+	-	T	
A	L	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	6	5	11	6	5	11	0	1	1	0	1	1	12
	F	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	11	11	1	10	11	0	1	1	0	1	1	12
B	L	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	9	9	1	8	9	0	4	4	0	4	4	12
	F	9	3	12	7	5	12	2	10	12	1	11	12	0	9	9	0	9	9	1	3	4	1	3	4	13*
C	L	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	1	9	10	1	9	10	0	2	2	0	2	2	13*
	F	4	8	12	2	10	12	0	12	12	1	11	12	0	10	10	2	8	10	0	2	2	0	2	2	12
D	L	0	12	12	0	12	12	2	10	12	1	11	12	0	10	10	0	10	10	0	2	2	0	2	2	12
	F	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	10	10	0	10	10	0	2	2	0	2	2	12
E	L	0	12	12	0	12	12	3	9	12	4	8	12	0	10	10	0	10	10	0	2	2	0	2	2	12
	F	5	7	12	2	10	12	2	10	12	3	9	12	0	10	10	0	10	10	0	2	2	0	2	2	12
F	L	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	12	12	0	8	8	0	8	8	1	3	4	0	4	4	12
	F	0	12	12	0	12	12	1	11	12	0	12	12	0	8	8	0	8	8	0	4	4	0	4	4	12

QUADRO 12- CONTAGEM DE LEVEDURAS DE ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

FONTE: O autor

NOTA: P1- água potável; P2- água tratada para diálise coletada nas torneiras da sala de reuso; P3- dialisato coletado na máquina de hemodiálise (pós-capilar); P4- água tratada para diálise, coletada em torneira após o tratamento antes da distribuição para sala de reuso e sala de hemodiálise; (+)- amostras positivas para o parâmetro contagem de fungos; (-)- amostras negativas para o parâmetro contagem de fungos; *foram coletas treze amostras do total dos pontos 3 e 4 devido à instalação de novo equipamento na clínica; L- leveduras hialinas; F- fungos filamentosos; MF- contagem de fungos pelo método filtração por membrana; MS- contagem de fungos pelo método em superfície; T- total

4.6.1 Contagem de leveduras pelos métodos de contagem em superfície e filtração por membrana

Quanto à presença de leveduras foi verificada em 26 % (57/217) das amostras, sendo recuperadas em 9% (19/217) das amostras pelo método por contagem em superfície (FIG.11b), e em 26% (56/217) amostras pelo método filtração por membrana (FIG. 11c). Verificou-se que 7 % (16/217) das amostras

analisadas pelos dois métodos foram positivas (considerando o nível proposto) e o maior índice de positividade foi no dialisato (ponto 3) 14% (8/58), na água do ponto 2 foi 10% (7/72), no ponto 4 foi 7% (1/15) e o ponto 1 não apresentou nenhuma das amostras (0/72) positivas (TAB. 3).

TABELA 3 – CONTAGENS DE LEVEDURAS PELOS MÉTODOS EM SUPERFÍCIE E FILTRAÇÃO POR MEMBRANA EM ÁGUA POTÁVEL (PONTO 1), ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE (PONTOS 2 E 4) E DIALISATO (PONTO 3) DAS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE AVALIADAS

Pontos de Coleta	Presença de leveduras		Positivas para leveduras	Limite de positividade proposto neste estudo
	Método contagem em superfície	Método contagem por filtração por membrana		
Todos os pontos	9% (19/217)	26% (56/217)	7% (16/217)	Igual ou superior a 10 UFC/ mL, pelo método de contagem em superfície Igual ou superior a 100 UFC/100 mL pelo método filtração por membrana
Ponto 1 (água potável)	1% (1/72)	12% (9/72)	0% (0/72)	
Ponto 2 (água tratada para diálise)	14% (10/72)	39% (28/72)	10% (7/72)	
Ponto 3 (Dialisato)	14% (8/58)	31% (18/58)	14% (8/58)	
Ponto 4 (água tratada para diálise)	0% (0/15)	7% (1/150)	7% (1/15)	

FONTE: O autor (2010)

Apesar de haver contaminação por fungos em sistemas de água de diálise, as normas nacionais e internacionais não incluem o parâmetro de contagem de fungos para avaliação da água de diálise. Na Suécia a legislação vigente, estabelece para água, o limite para contagem de micro-organismos de 100 UFC/mL, sendo que para fungos a contagem deve ser inferior a 10 UFC/mL (NYSTRAND, 2008a).

Pires-Gonçalves *et al.* (2008) encontraram em centros de hemodiálise no estado de São Paulo, 53% de *Candida parapsilosis* e 9% de *Rhodotorula rubra* no dialisato das máquinas valor maior em comparação a água potável e água tratada para diálise analisadas. Arvanitidou *et al.* (2000) em estudo realizado em centros de hemodiálise na Grécia, encontraram 8,2 % de leveduras na água tratada para diálise 12,9% de leveduras no dialisato. Estes estudos corroboram com os resultados observados no presente trabalho, indicando que o dialisato apresenta contaminação por leveduras superior em comparação com a água potável e a água tratada para diálise.

A incidência de infecções por leveduras do gênero *Candida* e outras infecções fúngicas tem aumentado nos últimos anos devido a vários fatores, como: aumento do uso de antibióticos, drogas imunossupressoras, procedimentos médicos invasivos e sobrevida dos pacientes. Em pacientes em hemodiálise, este tipo de infecção está geralmente associado ao tipo de acesso vascular (NGUYEN, YU, MORRIS, 1996; KATHRESAL *et al.*, 2008; PYRGOS *et al.* 2009).

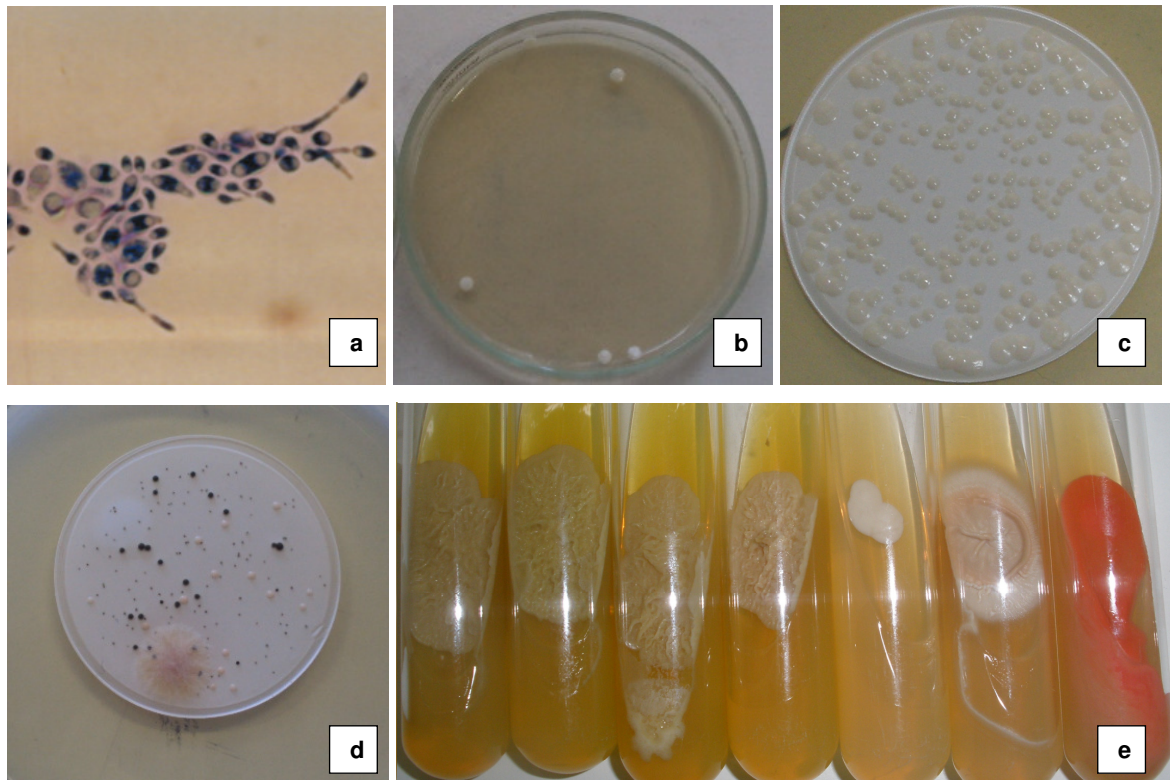


FIGURA 11 – LEVEDURAS ISOLADAS NOS SISTEMAS DE ÁGUA DE DIÁLISE AVALIADOS

FONTE: O autor (2010)

NOTA - a. Levedura isolada da amostra 132 aumento 1000x, submetido à coloração lactofenol azul de algodão; b. Contagem de leveduras pelo método contagem em superfície em meio PDA 7 dias de incubação na amostra 785; c. Contagem de levedura pelo método contagem em meio PDA após 7 dias de incubação na amostra 227; d. Crescimento de leveduras, fungos filamentosos hialinos e dematiáceos, isolados da amostra 947 pelo método filtração por membrana em meio PDA 7 dias de incubação; e. Tubos com crescimento de leveduras, em meio Agar Sabouraud.

4.6.2 Contagem de fungos filamentosos pelos métodos de contagem em superfície e filtração por membrana

Verificou-se presença de fungos filamentosos em 58% (125/217) das amostras analisadas. Destes foram isolados fungos dematiáceos em 46% (100/217) e fungos hialinos estiveram presentes em 27% (59/217) das amostras. Varo *et al.* (2007) em estudo realizado em água em unidade de hemodiálise recuperaram fungos filamentosos em 100% das amostras, utilizando a técnica de membrana filtrante.

Foram consideradas positivas, neste estudo, para fungos filamentosos 15% (32/217) das amostras, sendo que, 28% (20/72) na água potável, 11% (8/72) da água tratada para diálise (ponto 2), 5% (3/58) no dialisato e 7% (1/15) da água tratada para diálise (ponto 4) (TAB. 4).

Foi observada diferença de contagem de fungos filamentosos entres os dois métodos utilizados. A porcentagem de recuperação de fungos nas amostras foi de 21% (46/217) pelo método contagem em superfície, e de 52% (112/217) pelo método filtração por membrana.

TABELA 4 – CONTAGEM DE FUNGOS FILAMENTOSOS PELOS MÉTODOS EM SUPERFÍCIE E FILTRAÇÃO POR MEMBRANA EM ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO

Pontos de Coleta	Presença de fungos filamentosos		Positivas para fungos filamentosos	Limite de positividade proposto neste estudo
	Contagem em superfície	Filtração por membrana		
Todos os pontos	21% (46/217)	52% (112/217)	15% (32/217)	Igual ou superior a 10 UFC/ mL, contagem em superfície
Ponto 1 (água potável)	31% (22/72)	61% (44/72)	28% (20/72)	
Ponto 2 (água tratada para diálise)	18% (13/72)	60% (43/72)	11% (8/72)	
Ponto 3 (Dialisato)	16% (9/58)	36% (21/58)	5% (3/58)	Igual ou superior a 100 UFC/100 mL por filtração por membrana
Ponto 4 (água tratada para diálise)	13% (2/15)	27% (4/15)	7% (1/15)	

FONTE: O autor (2010)

No presente estudo, no ponto 1 (água potável), 67% das amostras apresentaram fungos filamentosos. Arvanitidou *et al.* (1999) obtiveram 95,2% de fungos filamentosos em água potável da rede municipal e 76,2% de amostras de água dentro de um hospital na Grécia.

Foi verificado que a metodologia contagem por filtração por membrana para recuperação de fungos foi mais eficiente comparada à metodologia contagem em superfície. A recuperação foi 77% e 30% respectivamente.

4.6.2.1 Identificação de fungos filamentosos por macro e micromorfologia

Foram isolados e identificados fungos filamentosos com características macro e micromorfológicas relacionados no quadro 13 e figura 12.

Clínicas	Gêneros de fungos identificados com o número de isolados encontrados			
	P1-água potável	P2- água tratada para diálise	P3- dialisato	P4- água tratada para diálise
A	<i>Cladosporium</i> spp. (1) Dematiáceo (2) Hialino (1) <i>Penicillium</i> spp. (2)	<i>Exophiala</i> spp. (2) Dematiáceo (2) Hialino (1)	<i>Cladosporium</i> spp. (1) <i>Exophiala</i> spp. (1) Hialino (5) Levedura (4)	Não isolado
B	<i>Beauveria</i> spp. (2) <i>Cladosporium</i> spp. (3) <i>Exophiala</i> spp. (15) Dematiáceo (3) <i>Fusarium</i> spp. (7) Hialino (2) Levedura (2) <i>Penicillium</i> spp. (1)	<i>Acremonium</i> spp. (2) <i>Exophiala</i> spp. (9) Dematiáceo (4) Hialino (3) Levedura (14) <i>Penicillium</i> spp. (2)	<i>Acremonium</i> spp. (3) <i>Cladosporium</i> spp. (2) Dematiáceo (4) <i>Exophiala</i> spp. (6) Hialino (1) Levedura (3)	<i>Cladosporium</i> spp. (1) Dematiáceo (1)
C	<i>Aspergillus</i> spp. (1) Dematiáceo (3) <i>Exophiala</i> spp. (12) Hialino (2) Levedura (1) <i>Penicillium</i> spp. (1) <i>Trichoderma</i> spp. (1)	<i>Acremonium</i> spp. (1) Hialino (3)	<i>Acremonium</i> spp. (2) Dematiáceo (2) <i>Exophiala</i> spp. (2) <i>Fusarium</i> spp. (1) Hialino (2) Levedura (1) <i>Penicillium</i> spp. (1)	Não isolado
D	<i>Cladosporium</i> spp. (1) Dematiáceo (3) <i>Exophiala</i> spp. (1) Hialino (4) Levedura (1)	<i>Cladosporium</i> spp. (1) Dematiáceo (5) <i>Exophiala</i> spp. (2) Hialino (2) Levedura (7)	<i>Cladosporium</i> spp. (1) Hialino (2) Levedura (1)	<i>Cladosporium</i> spp. (1)
E	<i>Exophiala</i> spp. (12) <i>Fusarium</i> spp. (2) Hialino (2)	Dematiáceo (1) <i>Exophiala</i> spp. (9) Levedura (10) <i>Penicillium</i> spp. (1)	Dematiáceo (3) <i>Exophiala</i> spp. (6) Levedura (2)	<i>Exophiala</i> spp. (1)
F	Hialino (1)	Dematiáceo (1) <i>Exophiala</i> spp. (1) Hialino (1) Levedura (2) <i>Rinocladiella</i> spp. (2)	Hialino (1) Levedura (1)	Não isolado

QUADRO 13 - IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA POTÁVEL, ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO, POR MACRO E MICROMORFOLOGIA

FONTE: O autor (2011)

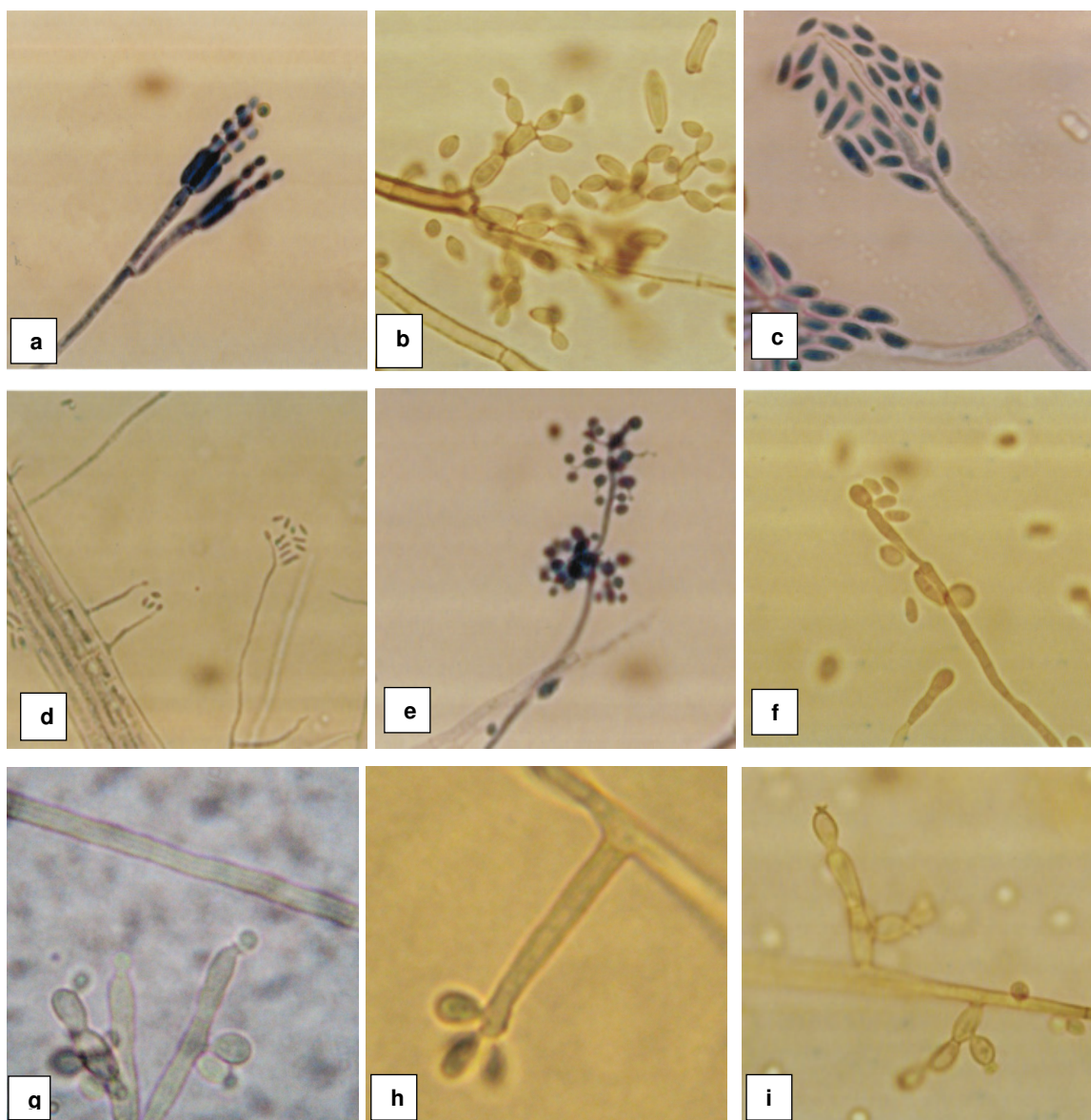


FIGURA 12 – ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA E DIALISATO POR MICROMORFOLOGIA

FONTE: O autor (2010)

NOTA: **a.** *Penicillium* sp. isolado da amostra 63/995-09 aumento 1000x; **b.** *Cladosporium* sp. isolado da amostra 115/1005-09D2 aumento 1000x; **c.** *Fusarium* sp. isolado da amostra 32/950-09B aumento 1000x; **d.** *Acremonium* sp. isolado da amostra 10/833-09 aumento 1000x; **e.** *Beauveria* sp. isolado da amostra 7/831-09 aumento 1000x; **f.** *Cladophialophora* sp. isolado 03/830-09 aumento 1000x **g.-** *Exophiala pisciphila* isolado 09/833-09B3 aumento 1000x; **h.** *Rhinocladiella* sp. isolado 78/1011-09F2 aumento 1000x; **i.** *Exophiala pisciphila*. isolado 160/137-10D2 aumento 1000x;

Infecções por fungos filamentos relacionados ao acesso vascular têm sido descritas. Labriola et al. (2009) relataram fungemia por *Paecilomyces lilacinus* em paciente crônico hemodialisado em 2003 no Marrocos, sendo a infecção associada ao cateter. Clark et al. (2006) relataram infecção causada por *Phialemonium* spp. em

pacientes que realizavam diálise em uma unidade de hemodiálise em Illinois, nos Estados Unidos, foram realizadas investigações quanto a origem da presença do fungo, mas este não foi recuperado na água e máquinas.

RAO *et al.* (2009) pesquisaram a fonte de contaminação por *Phialemonium* spp. que causou fungemia em dois pacientes em um centro de hemodiálise em Illinois, sendo isolado *P. curvatum* da água de uma torneira e da máquina da qual os dois pacientes realizavam a hemodiálise. Este achado reforça a necessidade da realização de controles referentes à presença de fungos em sistemas de água para diálise.

Arvanitidou *et al.* (1999) isolaram da água potável e água de hospital na Grécia os fungos filamentosos, dentre os vários gêneros estavam *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Cladosporium* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Exophiala* spp., sendo o gênero *Penicillium* spp. prevalente. Estes dados corroboram com os dados encontrados nas clínicas de hemodiálise de Curitiba, apesar de que *Penicillium* spp. foi isolado em 4 amostras do ponto 1. Em todos os pontos de coleta a prevalência foi de fungos dematiáceos.

Pires-Gonçalves *et al.* (2008) encontraram na água de um centro de hemodiálise em São Paulo, fungos dematiáceos como *Aureobasidium* spp. (5-3 %), *Cladosporium* spp. (4 %), *Exophiala* spp. (1-3 %) e *Curvularia* spp. (1-3 %).

No presente trabalho, dentre as 144 amostras que apresentaram crescimento de fungos filamentosos e leveduras, foram isolados 248, dos quais 123 eram dematiáceos e devido ao seu potencial patogênico, uma identificação cuidadosa destes foi realizada. Estes fungos dematiáceos foram avaliados por macro e micromorfologia e previamente identificados como pertencentes aos gêneros *Exophiala*, *Cladosporium* e *Rinocladiella*, e 12 isolados tiveram suas regiões ITS do DNA ribossomal sequenciadas, de modo que sua espécie fosse elucidada.

4.6.2.2 Identificação de fungos dematiáceos por sequenciamento de regiões ITS do rDNA

As bandas foram obtidas a partir da amplificação do DNA dos isolados com os *primers* VG9 e LS266, com tamanhos de aproximadamente 800 pb correspondem à região que compreende os genes rDNA 5.8 S, ITS1 e rDNA 18S.

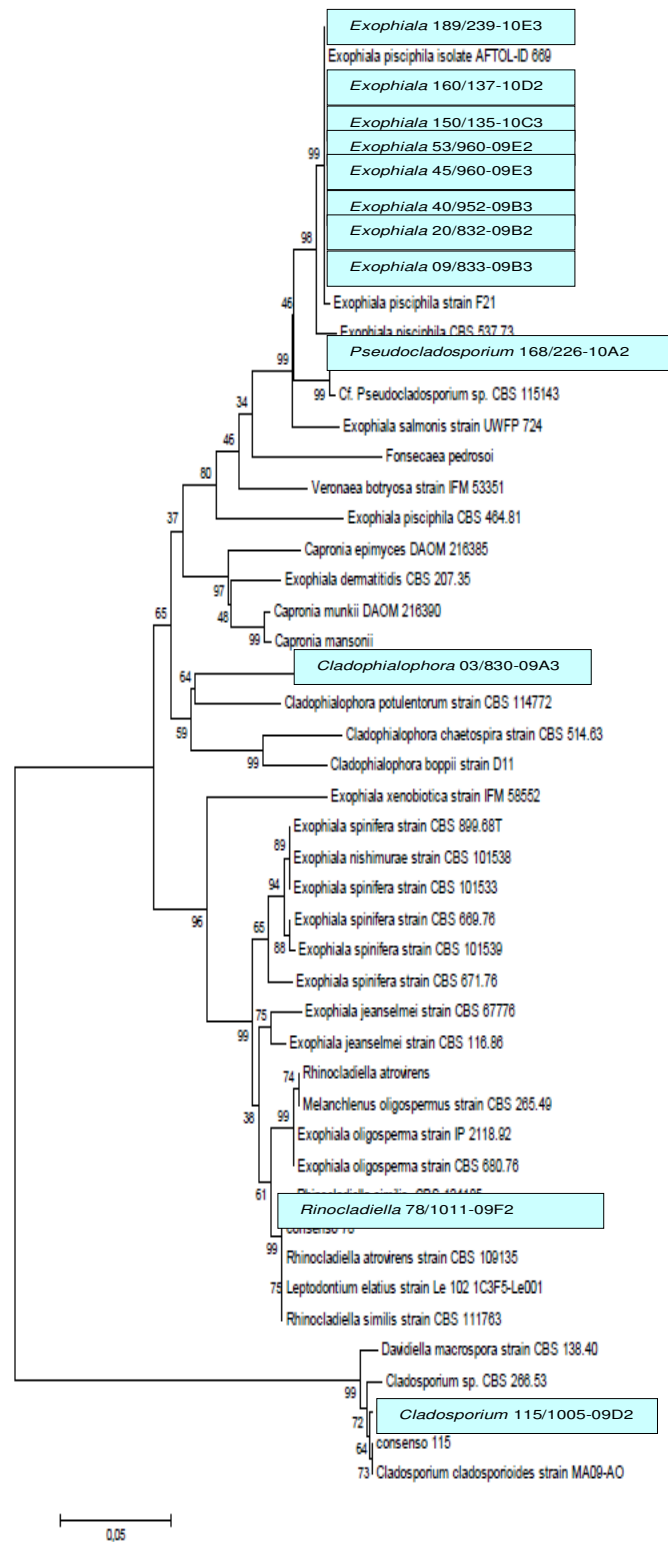


FIGURA 13 – DENDOGRAMA DAS LINHAGENS DE *Exophiala* sp., *Cladophialophora* sp., *Rinocladiella* sp., *Cladosporium* sp. e *Pseudocladosporium* sp. ISOLADAS NESSE ESTUDO E DE LINHAGENS PRÓXIMAS DEPOSITADAS NO GENBANK.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: valores de probabilidade posterior estão apresentados ao lado de cada ramo.

O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos (FUNGARO, 2000).

TABELA 5 – IDENTIFICAÇÃO POR CARACTERES MORFOLÓGICOS E POR COMPARAÇÃO COM SEQUENCIAS ITS 1, 5,8 S rDNA e ITS 2 DE FUNGOS ISOLADOS EM SISTEMAS DE ÁGUA DE SEIS CLÍNICAS DE HEMODIÁLISE DE CURITIBA/ PR

Isolado	Origem	Identificação morfológica	Fungos relacionados	Acesso GenBank	E-Value	% Identidade
03/830-09A3	Clinica A Dialisato	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Cladophialophora chaetospora</i> CBS 115468	EU035404.1	0.0	86%
115/1005-09D2	Clinica D Água diálise	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> MA09-AO <i>Davidiella macrospora</i> 138.40 <i>Cladodosporium</i> sp. SS-S12	GQ458030.1 EU167591.1 GU797141.1	0.0 0.0 0.0	99% 98% 99%
09/833-09B3	Clinica B Dialisato	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99%
20/832-09B2	Clinica B Água diálise	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99%
40/952-09B3	Clinica B Dialisato	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99%
45/960-09E2	Clinica E Água diálise	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99 %
53/960-09E2	Clinica E Água diálise	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	100 %
150/135-10C3	Clinica C Dialisato	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99%
160/137-10D2	Clinica D Água diálise	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	98%
189/239-10E3	Clinica E Dialisato	<i>Exophiala</i> sp.	<i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	AF050272.1	0.0	99%
78/1011-09F2	Clinica F Água diálise		<i>Rinocladiella atrovirens</i> CBS5109 <i>Rinocladiella</i> sp. <i>Rinocladiella similis</i> DH13054 <i>Rinocladiella similis</i> CBS124185	AY040855.1 AY163558.1 AY857529.1 GQ426972.1	0.0 0.0 0.0 0.0	98% 99% 99% 98%
168/226-10A2	Clinica A Água diálise	<i>Exophiala</i> sp.	Cf. <i>Pseudocladosporium</i> sp. CBS 115143 <i>Exophiala pisciphila</i> CBS 537.73	DQ0088140.1 AF050272.1	0.0 0.0	99% 98,00%

FONTE: O autor (2011)

As sequências obtidas foram submetidas ao Blastn e comparadas com demais sequências depositadas no *Genbank*. A identificação morfológica dos isolados foi, então, comparada com aquela obtida por meio da similaridade de sequências, conforme descrito na tabela 5. Para esta comparação, foi considerada a maior similaridade de sequência (com um máximo de 99% e um mínimo de 86%). Algumas sequências, que demonstraram alta similaridade com os isolados do presente trabalho, foram submetidas a uma análise p-distance, com 1000 bootstraps, por meio do programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011, submetido à publicação ²), para construção de um dendrograma, de modo a confirmar a sua identificação.

Os isolados 09/833-09B3, 20/832-09B2, 40/952-09B3, 45/960-09E2; 53/960-09E2, 150/135-10C3, 160/137-10D2 e 189/239-10E3, identificados morfológicamente como *Exophiala* sp., mostraram similaridade com sequências de *Exophiala pisciphila*, publicadas no *Genbank* (TAB. 5). No dendrograma (FIG 13), pode-se observar que estes isolados formam um agrupamento consistente (bootstrap 99%) com a espécie *Exophiala pisciphila* CBS537.73. Hoog *et al.* (2011, *on line* ¹) analisaram *Exophiala* originadas nas águas, *E. pisciphila* e outras espécies de *Exophiala* estão descritas no estudo, estas espécies pertencentes à clade Salmonis. Na literatura há um caso reportado de infecção por *Exophiala pisciphila* em humanos (SUGHAYER *et al.* 1991).

O isolado 168, identificado como *Exophiala* sp. por meio de sua morfologia, mostrou alta similaridade com sequência de Cf *Pseudocladosporium* CBS115143, agrupamento suportado por alto valor bootstrap (99%) (FIG. 13, TAB. 5).

O isolado 03/830-09A3, embora tenha sido identificado como *Exophiala* sp., mostrou 86% de similaridade de sequência com *Cladophialophora* spp. (FIG. 13, TAB. 5).

Além de serem associadas a doenças humanas, as espécies de *Cladophialophora* são encontradas como fitopatogênicas, ou ocorrem como sapróbios em material orgânico, ou em água, sucos de frutas, ou bebidas energéticas, juntamente com espécies de *Exophiala* (CROUS *et al.*, 2007). Em vários casos sinanamorfos de *Cladophialophora* são semelhantes aos encontrados em *Exophiala* (HOOG; GUARRO, 2004).

O isolado 78/1011-09F2, identificado como *Rhinocladiella* sp. agrupou com as espécies *Rhinocladiella similis* CBS 111763 e CBS124185, e, ainda, com *R.*

atrovirens CBS5109 e CBS109135, com 99%, 98%, 98% e 99% de similaridade, respectivamente (FIG. 13, TAB. 5).

O isolado 115/1005-09D2, previamente identificado como *Cladosporium* sp., mostrou alta similaridade com a espécie *Cladosporium cladosporioides* MA09 e com *Cladosporium* sp. SS-S12 (TAB. 5, FIG. 13).

A identificação morfológica permitiu que os isolados fossem caracterizados ao nível de gênero, enquanto o sequenciamento das regiões ITS do rdna possibilitou a confirmação da identificação e, ainda, resultou na elucidação das espécies às quais os isolados pertencem. Entretanto, em dois casos, isolados 03/830-09A3 e 168/226-10A2 (TAB. 5, FIG. 13), a identificação morfológica não foi concordante com a análise das sequências. O isolado 03/830-09A3, caracterizado com *Exophiala* sp., agrupou-se com *Cladophialophora* spp., muito embora a similaridade entre as sequências tenha sido de 86% e não próxima de 100%, como nos demais casos observados. O isolado 168/226-10A2, também identificado como *Exophiala* sp., pela morfologia, agrupou com *Pseudocladosporium* sp. com 99% de similaridade. Esta divergência na identificação pode ser devida à similaridade morfológica entre os fungos dematiáceos, o que dificulta a diferenciação dos mesmos.

A espécie *C. chaetospira* parece ser semelhante a outros exemplares de *Cladophialophora*, células conidiogênicas laterais e curtas, e longas cadeias ramificadas de conídios subcilíndricos que em grande parte permanecem ligados. No entanto, é bastante distinta dos outros membros de *Cladophialophora* por ter conídios castanho médio, e pela falta de conídios elipsóides observados em várias espécies. (CROUS et al, 2007).

Exophiala e *Cladophialophora* pertencem à Ordem Chaetotryiales, e dentro da família Herpotrichiellaceae, a delimitação genérica desta família é realmente complicada principalmente devido aos diversos gêneros anamórficos (*Cladophialophora*, *Ramichloridium*, *Phialophora*, *Exophiala*) (GUEIDAN, 2008).

Uma alternativa para a correta identificação destes isolados seria a utilização de outras sequências, mais discriminatórias, como os genes da β tubulina e 1α do fator de alongação da tradução. Badali *et al.* (2008) em pesquisa realizada sobre biodiversidade do gênero *Cladophialophora* utilizaram quatro genes para amplificação e sequenciamento de suas amostras o ITS rDNA, o 1α do fator de alongação da tradução (*EF1- α*), β tubulina (*TUB*) e pequena subunidade do RNA

ribossomal nuclear (nucSSU), o estudo foi realizado com 48 cepas e quatro novas espécies foram descobertas.

Zeng *et al.* (2007), analisaram espécies de *Exophiala* com regiões ITS do rDNA, 1 α do fator de alongação da tradução (*EF1- α*) e β tubulina (*TUB*), concluindo que a diversidade de sequência da região ITS do rDNA tem se mostrado confiável para diferenciação de espécies comuns de *Exophiala*.

Dados de sequências de DNA são utilizados para a montagem de árvores filogenéticas em organismos proximalmente ou distante relacionados. Portanto, os dados moleculares têm fornecido uma poderosa ferramenta de estudo da história evolutiva de forma a possibilitar a reconstrução da filogenia dos maiores grupos de organismos vivos (STRINGARI, 2009).

A presença de fungos em clínicas de hemodiálise requer melhor atenção. Apesar de 81% das amostras terem apresentado contagem inferior a 10 UFC/ mL, pelo método em superfície, e inferior a 100 UFC/100 mL pelo método filtração por membrana, existe a preocupação de alguns dos gêneros encontrados estarem relacionados diretamente com infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, como é caso dos pacientes que realizam hemodiálise. Existem poucos estudos que relacionam infecções por fungos a pacientes de hemodiálise e quando aparecem geralmente estão relacionados ao tipo de acesso vascular. Entretanto, seria pertinente, que quando um paciente apresentar infecção fúngica investigar a origem da infecção, se o fungo não está presente no ambiente ou na água do sistema de tratamento.

Infecções causadas por fungos dematiáceos são incomuns, mas tornaram-se cada vez mais reconhecidas em uma ampla variedade de síndromes clínicas (REVANKAR, 2010).

Alguns dos fungos encontrados são considerados contaminantes de ambientes, mas outros são considerados patogênicos, e existe um limiar desconhecido entre esta diferenciação entre fungos contaminantes e patogênicos. Então uma atenção maior para estes micro-organismos deve ser dispensada evitando assim possíveis complicações para os pacientes.

5 CONCLUSÕES

A realização do estudo de avaliação microbiológica com água tratada e dialisato dos sistemas de águas em clínicas de hemodiálise de Curitiba, durante doze meses permitiu concluir que:

- A contagem de bactérias heterotróficas esteve em conformidade com a legislação brasileira em 95% das amostras analisadas;
- Ausência de coliformes totais nas amostras analisadas.
- *P. aeruginosa* esteve presente em 4% das amostras analisadas.
- A concentração de endotoxina bacteriana dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira em 85% das amostras, sendo que, em 32% das amostras a concentração esteve abaixo de 0,125 EU/mL.

Existe a necessidade de padronização na legislação para o ensaio de contagem de bactérias referentes aos meios, tempo e temperatura de incubação.

A presença de fungos em 66% das amostras, como os gêneros *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp., e a incidência de fungos dematiáceos (*Exophiala pisciphila*, *Rinocladiella atrovirens*, *Cladophialophora* sp.) serve como alerta sobre a presença de contaminação fúngica em ambientes com pacientes imunocomprometidos. A inclusão de análise de fungos na água em sistemas de água de diálise é uma forma de prevenir patogenicidades por fungos em pacientes hemodialisados.

REFERÊNCIAS

- ABBASS, A.A.; EL SHAZLY, S.A.; EL KORALE, A.F.; HAZZAH, W.A. Bacteriological monitoring of dialysis fluid in two haemodialysis centers in Alexandria. **Alexandria Bulletin**, Alexandria, v. 42, n. 4, 2006.
- ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NIEDA, N.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Rapid Identification of genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 2, p.873-876, feb.2003.
- ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NIEDA, N.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Specific oligonucleotide primers for Identification of causative agent of chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p.404-407, jan.2004.
- ALEXANDRAKI, I.; SULLIVAN, R.; ZAIDEN, R.; BAILEY, C.; MCCARTER, Y.; KHAN, A.; OFFUTT, J.K.; BHATT, U.Y.; PLOTT, D.; NAHMAN JR., N.S. Blood culture isolates in hemodialysis vascular catheter-related bacteremia. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 336, n. 4, p. 297-302, oct. 2008.
- ALLON, M.; RADEVA, M.; BAILEY, J.; BEDDHU, S.; BUTTERLY, D.; COYNE, D.W.; DEPNER, T.A.; GASSMAN, J.J.; KAUFMAN, A.M.; KAYSEN, G.A.; LEWIS, J.A.; SCHAWAB, S.J. The spectrum of infection-related morbidity in hospitalized haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 20, p. 1180-1186, 2005.
- AL-OBAID, I.; AHMAD, S.; KHAN, Z.U.; DINESH, B.; HEJAB, H.M. Catheter-associated fungemia due *Exophiala oligosperma* in a leukemic child and review of fungemia cases caused by *Exophiala species*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 25, p. 729–732, 2006.
- AMATO, R. L. Water treatment for hemodialysis-undated to include the latest AAMI standards for dialysate (RD52:2004). **Nephrology Nursing Journal**, Pitman, v. 32, n. 2, p. 151-167, mar-apr 2005
- ANDREOLI, M. C. C.; NADALETTO, M. A. Diálise. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?dialise&menu=8>> Acesso em 11/12/2008.

APHA; AWWA; WPCF. **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 21 th edition. Washington: American Public Health Association, 2005.

ARDUINO, M. J.; BLAND, L. A. AGUERO, S. M.; FAVERO, M. S. Effects of Incubation Time and Temperature on Microbiologic Sampling Procedures for Hemodialysis Fluids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 7, p. 1462-1465, jul. 1991.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; KATSINAS, C.; PANGIDIS, P.; CONSTANTINIDIS, T.; KATSOUYANNOPOULOS, V.; VAYONAS, G. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 13, p. 949-954, 1998.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; CONSTANTINIDES, T.C.; KATSOUYANNOPOULOS, V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 81-84, 1999.

ARVANITIDOU, M.; SPAIA, S.; VELEGRAKI, A.; PAZARLOGLOU, M.; KANETIDIS, D.; PANGIDIS, P.; ASKEPIDIS, N.; KATSINAS, C.; VAYONAS, G.; KATSOUYANNOPOULOS, V. High level of recovery of fungi from water an dialysate in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 45, p. 225-230, 2000.

ARVANITIDOU, M.; VAYONA, A.; SPANAKIS, N.; TSAKRIS, A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 96, p. 180-185, 2003.

AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; FUNGARO, M. H. P. Molecular Characterization of *Paecilomyces fumoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) Isolates. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.4, p.729-732, 2000.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.H.G.; VAN DEN ENDE, G.; HOOG, G.S de. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 61, p.175-191, 2008. Disponível em: <www.studiesinmycology.org> Acesso em 17/11/2010.

BAMBAUER, R.; SCHAUER, M.; JUNG, W.K.; DAUM, V.; VIENKEN, J. Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. **Asaio Journal**, Hagerstown, v. 40, n. 4, p. 1012-6, 1994.

BIBASHI, E.; MEMMOS, D.; KOKOLINA.E.; TSAKIRIS, D.; SOFIANOU, D.; PAPADIMITRIOU. Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during na 11-year period: report of 46 cases. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v.36, p. 927-931, 2003.

BORGES, C.R.; LASCOWSKI, K.M.; FILHO, N.R.; PELAYO, J.S. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa -PR, Brazil. **Journal Applied Microbiology**, Washington, v. 103, n. 5, p. 1791-7, 2007.

BRASIL. RDC n. 154, de 15 de junho de 2004. Versão Republicada - 31.05.2006. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 16/10/2010.

BRASIL. PORTARIA n. 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 16/10/2010.

BRUNET, P.; BERLAND, Y. Water quality and complications of haemodialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v.15, p.578 – 580, 2000.

BUGNO, A.; ALMODÓVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C. Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: comparison of the efficiency of reasoner'2 agar and plate count agar. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, p. 15-18, 2010.

CANAUD, B. Monitoring the microbial purity of the treated water and dialysate. **Saudy Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, Riyadh, v. 12, n. 3, p. 325-336, 2001. Disponível em<<http://www.sjdt.org>>. Acesso: 12/07/2009.

CAPELLI, G.; SERENI, L.; SCIALOJA, M.G.; MORSELLI, M.; PERRONE, S.; CIUFFREDA, A.; BELLESIA. M.; INGUAGGIATO, P.; ALBERTAZZI, A.; TETTA, C. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, p. 2105-2111, 2003.

CARVALHO, I. M. P.; MELO, R. L.; ANDRAUS, L. M. S. - Produção científica de enfermagem em nefrologia, no Brasil, no período de 1989 até 1999. **Revista Eletrônica de Enfermagem (online)**, Goiânia, v.3, n.2, jul-dez. 2001. Disponível em: <<http://www.fen.ufg.br/revista>>. Acesso em 10/01/2010

CLARK, T.; HUHN, G. D.; CONOVER, C.; CALI, S.; ARDUINO, M.J.; HAJJEH, R.; BRANDT, M.E.; FRIDKIN, S.K. Outbreak of bloodstream infection with the mold *Phialemonium* among patients receiving dialysis at a hemodialysis unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 27, n. 11, p. 1164-1170, nov 2006.

CORNELY, O. A. Aspergillus to Zygomycetes: Causes, Risk Factors, Prevention, and Treatment of Invasive Fungal Infections. **Infection**, v. 36, n. 4, p. 296-313, 2008.

CROUS, P.W.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U.; HOOG, G.S. de; HOCKING, A.D.; SHIN, H.-D.; GROENEWAL, J.Z. Opportunistic, human-pathogenic species in the Herpotrichiellaceae are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the Venturiaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 58, p. 185-217, 2007. Disponível em: <<http://www.studiesinmycology.org>>. Acesso: 11/01/2011.

DERBER, C.; ELAM, K.; BEARMAN, G.; Invasive sinonasal disease due to dematiaceous fungi in immunocompromised individuals: case report and review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14 S, p. 329-332, 2010. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ijid>. Acesso em: 23/11/210.

DUCKI, S.; FRANCINI, N.; BLECH, MF. Circuit de traitement d'eau pour hémodialyse: mais ou se caché Le Bacille pyocyanique? **Nephrologie & Thérapeutique**, Paris, v. 1, p. 126-130, 2005.

DE FILIPPIS, P.; SPINACI, A.; SPITALERI, G.; DAMIANI, F.; PANÀ, A. Testing for *Pseudomonas aeruginosa*: na additional parameter assessing microbiological quality of dialysis water. **Igiene e Sanità Pubblica**, Roma, v. 61, n. 5, p. 467-474, sep./oct. 2005.

DE FILIPPIS, P.; SPITALERI, G.; DAMIANI, F.; PANÀ, A. Microbiological quality of haemodialysis water in various hospitals and private clinics in the Lazio region (Italy): 2000-2004. **Igiene e Sanità Pubblica**, Roma, v. 63, n. 1, p. 21-29, jan./feb. 2007.

FERREIRA, J. A. B. Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva. 63 f. Dissertação (Mestrado Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

FRANCO, B D G M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.14, p.12-16, mai./jun., 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio14/pcrnamicologia.pdf>> Acesso em 26/01/2011.

GARCÍA-AGUDO, R.; GARCÍA-MARTOS, P. Clinical and microbiological aspects of fungal peritonitis in peritoneal dialysis. **Nefrologia**, Madrid, v.29, n. 6, p. 506-517, 2009. Disponível em: <<http://www.senefro.org>> acessado 12/01/2011.

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

GUEIDAN, C. Chaetothyriales. Disponível em: <<http://tolweb.org/Chaetothyriales/29305>>. Acesso em: 30/01/2011.

HARRISON, K.; MOSER, S.; PALMER, C.A. Central Nervous System Infections in Transplant Recipients by *Cladophialophora bantiana*. **Southern Medical Association**, Birmingham, v. 101, n. 3, p. 292-296, mar. 2008.

HOENICH, N.; LEVIN, R. The implications of water quality in hemodialysis. Renal Research Instituto Symposium, Seminars in dialysis, v. 16, n. 6, p. 492-497, nov.-dec. 2003.

HOENICH, N.; RONCO, C. Haemodialysis Fluid: Composition and Clinical Importance. **Blood Purification**, Basilea, v. 25, p. 62-68, 2007.

HOENICH, N.; THIJSEN, S.; KITZLER, T.; LEVIN, R.; RONCO, C. Impact of Water Quality and Dialysis Fluid Composition on Dialysis Practice. **Blood Purification**, Basilea, v. 26, n. 1, p. 6-11, 2008.

HOOG, G. S.; GERRITS van den ENDE, A. H. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**, Berlin, v.41, p.183-189, 1998.

HOOG, G.S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R.B.; KANTARCIOGLU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS van den GERRITS, A.H.G.; HAASE, G. Species Diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-

like fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n. 10, p. 4767-4778, 2003.

HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, ed. 2004.

HOOG, G.S.; NISHIKAKU, A.S.; FERNADEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADIN-GONGÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; GERRITS van den ENDE, A.H.G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrioni* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p. 219-234, 2007.

HOOG, G.S.; GRUBE, M. Black fungal extremes. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.61, 2008. Disponível em:
<http://www.cbs.knaw.nl/publications/1061/000_Cover.pdf> Acesso em: 30/01/2011.

HOOG, G.S.; VICENTE, V.; NAJAFZADEH, M.J.; BADALI, H.; TASIEH, S.S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Studies in Mycology**, Utrecht, p.1-20, 2011. available online at www.studiesinmycology.org Studies in Mycology XX: 1–20. 2011. doi:10.3114/sim.2011.XX.01. Disponível em:
<http://www.gia.org.br/sistema/up_anexos/6dd73dda4b8edd39d3f06a63601abefc.pdf> Acesso em: 30/04/2011.

HUANG, J-W.; CHU, T-S.; WU, M-S.; PENG, Y-S.; HSIEH, B-S. Visible *Penicillium* spp. Colonization plaques on a Tenckhoff catheter without resultant peritonitis em a peritoneal dialysis patient. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 15, n. 11, p.1872-1873, 2000.

KATHRESAL, A.; BIUNDO, J.; BLAIS, C.M.; MORSE, S.; REISIN, E. A rare case of *Candida arthritis* in a hemodialysis patient. **The American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 336, n. 5, p. 437-440, 2008.

KERN, M. E., K. S. BLEVINS. **Micologia Médica**. São Paulo: Premier, 1999.

KLEIN, E.; PASS, T.; HARDING, G.B.; WRIGHT, R.; MILLION, C. Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the central United States. **Artificial Organs**, Kentucky, v. 14, n. 2, p. 85-94, 1990.

LABRIOLA, L.; VANDERCAM, B.; SWINNE, D.; JADOUL, M. Successful treatment with voriconazole of prolonged *Paecilomyces lilacinus* fungemia in a chronic

hemodialyzed patient. **Clinical Nephrology**, New Jersey, v. 71, n. 3, p. 355-358, 2009.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZÁLEZ, V.; JULIÁN, M. C.; RUBIO, V. Design of a *primer* for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 187-194, 1999.

LEME, I.L.; SILVA, V.G. Recomendações para a garantia da qualidade da água para uso em unidades de hemodiálise. Associação Brasileira de Centros de Diálise e Transplantes, 2003.

LEMAIRE, X.; MORENA, M.; LERARY-MORAGUÉS, H.; HENRIET-VIPREY, D.; CHENINE, L.; DEFEZ-FOUGERON, C.; CANAUD, B. Analysis of risk factors for catheter-related bacteremia in 2000 permanent dual catheters for hemodialysis. **Blood Purification**, Baselea, v. 28, n. 1, p. 21-28, mar. 2008.

LIU, Y.L.; HUANG, C.C.; KAO, M.T. Residual Renal Function Predicts Outcome of Fungal Peritonitis in Peritoneal Dialysis Patients. **Peritoneal Dialysis International**, New York, v. 26, n. 3, p. 407-409, 2006.

LUPATINI, M.; MELLO, A.H.; ANTONIOLLI, Z.I. Caracterização do DNA ribossômico do isolado de Scleroderma UFSMSc1 de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex- maiden. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, 2008.

MADARIAGA, M.G.; TENORIO, A.; PROIA, L. *Trichosporon inkin* peritonitis treated with caspofungin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 12, p. 5827-5829, 2003.

MASSAGUER, P. R. de. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

MCCORMACK, J.; POLLARD, J. *Aspergillus* endocarditis 2003-2009. **Medical Mycology**, London, informa healthcare, **Early Online**, 1-5, 2010. Disponível em: <http://130.88.242.202/medicine/Aspergillus/articlesoverflow/20608781.pdf>. Acesso em: 28/01/2011.

MESQUITA, M.; DAMRY, N.; GAZAGNES, M.D. Fatal cerebrites and brain abscesses following a nontraumatic subdural hematoma in a chronic hemodialyzed patient. **Hemodialysis International**, Milton, v. 12, p. 426-430, 2008

MING, D.; HOOG, S.G. Cerebral phaeohyphomycosis- a cure at what lengths? **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 9, p. 376-383, 2009.

MONTANARI, L.B.; SARTORI, F.G.; CARDOSO, M. J.O.; VARO, S.D.; PIRES, R. H.; LEITE, C. Q. F.; PRINCE, K.; MARTINS, C.H.G. Contaminação microbiológica no sistema de distribuição de água de um centro de hemodiálise. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2009.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>> (acesso 01/2011).

NGUYEN, M. H.; YU, V. L.; MORRIS, A. J. Candida infection of the arteriovenous fistula used for hemodialysis. **American journal of kidney diseases**, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 596-598, apr. 1996.

NUCCI, M.; AKITI, T.; BARREIROS, F.S.; REVANKAR, S.G.; WICKES, B.L.; SUTTON, D.A.; PATTERSON, T.F. Nosocomial outbreak of *Exophiala jeanselmei* fungemia associated with contamination of hospital water. **Clinical Infectious diseases**, Oxford, v. 34, p. 1475-1480, 2002.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBO, A.M.; RESTREPO, A. COLOMBO, A.L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in latin America. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

NYSTRAND, R. Microbiology of Water and Fluids for Hemodialysis, review article. **Journal Chinese Medical Association**, Taipei, v. 71, n. 5, p.223–229, 2008.

NYSTRAND, R. The microbial world and fluids in dialysis. **Biomedical Instrumentation & Technology**, Arlington, v. 42, n. 2 p. 150-159, mar./apr. 2008.

OIE, S.; KAMIYA, A.; YONEDA, I.; UCHIYAMA, K.; TSUCHIDA, M.; TAKAI, K.; NAITO, K. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 54, p. 115-119, 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, V.T. Água filtrada na hemodiálise. **Meio Filtrante**, ano VII, n. 32, mai.-jun. 2008. Disponível em: <http://www.meiofiltrante.com.br/materias_ver.asp?action=detalhe&id=382&revista=n32>. Acesso em: 21/01/2011.

OUYANG, J.; PEI, Z.; LUTWIC, L.; DALAL, S.; YANG, L.; CASSAI, N.; KULDIP, S.; HANNA, B.; WIECZOREK, R. L.; BLUTH, M.; PINCUS, M. R. Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, Middlebury, v. 38, n. 4, p. 393-400, 2008.

OGAWA, M.M.; GALANTE, N.Z.; GODOY, P.; FISCHMAN-GOMPORTZ, O.; MARTELLI, F.; COLOMBO, A.L.; TOMIMORI, J.; MADINA-PESTANA, J.O. Treatment of subcutaneous phaeohyphomycosis and prospective follow-up of 17 kidney transplant recipients. **Journal American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 61, n. 6, p. 977-985, 2009.

PIMENTEL, J.D.; MAHADEVAN, K.; WOODGYER, L.S.; GIBAS, C.; HARRIS, O.C.; LUPINO, M.; ATHAN, E. Peritonitis due to *Curvularia inaequalis* in an elderly patient undergoing peritoneal dialysis and a review of six cases of peritonitis associated with other *Curvularia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, vol. 43, n. 8, p. 4288-4292, 2005.

PIRES-GOLÇALVES, R.H.; SARTORI, F.G.; MONTANARI, L.B.; ZAIA, J.E., MELHEM, M.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; MARTINS, C.H. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 542-547, 2008.

PISANI, B.; SIMÕES, M.; PRANDI, A.G.; ROCHA, M.M.M.; GONÇALVES, C.R.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59 (1/2), p. 51-56, 2000.

PONTORIERO, G.; POZZONI, S.A.; LOCATELLI, F. The quality of dialysis water. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, suppl. 7, p. 21-25, 2003.

PRASAD, N.; GUPTA, A. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis patients. **Peritoneal Dialysis International**, Toronto, v. 25, p. 207-222, 2005.

PROIA, L.A.; HAYDEN, M.K.; KAMMEYER, P.L.; ORTIZ, J.; SUTTON, D.A.; CLARK, T.; SCHROES, H.-J.; SUMMERBELL, R.C. *Phialemonium*: An emerging mold pathogen that caused 4 cases of hemodialysis-associated endovascular infection. **Clinical Infectious Diseases**, Arlington, v. 39, p. 379-379, 2004.

PYRGOS, V.; RATANAVANICH, K.; DONEGAN, N.; VEIS, J.; WALSH, T.J.; SHOHAM, S. *Candida* bloodstream infections in hemodialysis recipients. **Medical Mycology**, London, v. 47, p. 463-467, aug. 2009.

QUIRIN, N.; DESNOS-OLLIVER, M.; CANTIN, J.F.; VALERY, J.C.; DOUSSY, Y.; GOURSAUD, R.; DROMER, F.; TIVOLLIER, J.M. Peritonitis due to *Blastobotrys proliferans* in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 10, p. 3453-3455, oct. 2003.

RAMIREZ, S. S. Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007. 54f. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

RAPARIA, K.; POWELL, S.Z.; CERNOCH, P.; TAKEI, H. Cerebral mycosis: 7-year retrospective series in a tertiary center. **Neuropathology**, Sendai, v. 30, p. 218–223, 2010.

RAO, C.Y.; PACHUCKI, C.; CALI, S.; SANTHIRAJ, M.; KRANKOSKI, K.L.K.; NOBLE-WANG, J.A.; LEEHEY, D.; POPLI, S.; BRANDT, M.E.; LINDSLEY, M.D.; FRIDKIN, S.K.; ARDUINO, M.J. Contaminated product water as the source of *Phialemonium curvatum* bloodstream infection among patients undergoing hemodialysis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, 30, n. 9, p. 840-847, sep. 2009.

REVANKAR, S.G. Clinical and Treatment Aspects of Brown–Black Fungi. **Current Fungal Infection Reports**, Philadelphia, v. 4, p. 46–51, 2010.

ROMÃO JUNIOR, J.E. (2004). O rim e suas doenças. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/index.html>>. Acesso em: 11/12/2008.

ROMÃO JUNIOR, J.E. Os 60 anos de hemodiálise no Brasil. **Nefro SP**, n.16, 2009. Disponível em:<www.sonesp.org.br>. Acesso em:10/01/2011.

SAVANI, S. GHODS, A. AFSHAR, R. Catheter associated infections in hemodialysis patients. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, Riyadh, v. 18, n. 1, p. 43-46, 2007. Disponível em:<<http://www.sjkdt.org>>. Acesso em: 5/07/2009

SESSO, R.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F.S.; BEVILACQUA, J. L.; ROMÃO, J. E. J.; LUGON, J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v.30, n. 4, p. 233-238, 2008.

SILVA, A.M.M.; MARTINS, C.T.B.; FERRABOLI, V.J.; ROMÃO JUNIOR, J.E. Revisão/ Atualização em diálise: Água para hemodiálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 180-188, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de Análise microbiológica de alimentos**. 3° ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

SMEETS, E.; KOOMAN, J.; VAN DER SANDE, F.; STOBBERING, E.; FREDERIK, P.; CLAESSENS, P.; GRAVE, W.; SCHOT, A.; LEUNISSEN, K. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. **Kidney International**, New York, v. 63, p. 1574-1576, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo 2009. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/centro.asp>>. Acesso em: 01/2011.

STADEN, R, JUDGE D P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of biochemical Analysis**, New York, v. 43, p.303-322, 2001.

STRINGARI, D. Sistemática e diversidade genética de isolados de *Guinardia* spp. e *Phyllosticta* SP. nos estados do Paraná e São Paulo. 209 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SZETO, C-C.; CHOW, K-M.; LEUNG, C-B.; WONG, T. Y-H.; WU, A. K.L.; WANG, A. Y-M.; LUI, S-F.; LI, P.K-T. Clinical course of peritonitis due to *Pseudomonas* species complicating peritoneal dialysis: a review of 104 cases. **Kidney International**, New York, v. 59, p. 2309-2315, 2001.

SUGHAYER, M.; DE GIROLAMI, P.C.; KHETTRY, U.; KORZENIOWSKI, D.; GRUMMEY, A.; PASSARELI, L. McGINNIS, M.R. Human infection caused by *Exophiala pisciphila*: case report and review. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 13, p. 379-382, 1991.

TAJ-ALDEEN, S.J.; EL SHAFIE, S.; ALSOUB, H.; ELDEEB, Y.; HOOG, S. Isolation os *Exophiala dermatitidis* from endotracheal aspirate of a cancer patient. **Mycoses**, Berlin, v. 49, p. 1-6, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood,

Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, 2011, submetido a publicação.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n.22, p. 4673-4680, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Microbiologia Ambiental. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2005. p. 761-791.

USP 31 - THE UNITED States Pharmacopeia. USP 31. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Method 85 Bacterial endotoxins test – método semi-quantitativo, 2008.

VARO, S.D.; MARTINS, C. H. G.; CARDOSO, M. J. O.; SARTORI, F. G. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 40, n. 3, p. 326-331, 2007.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. 172 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Bolsa Sanduiche Cbs Holanda, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

VICENTE, V. A.; ATILLI-ANGELLIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLEZ, F.; CRUZ, L.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of Black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Micology**, Utrecht, v.61, p. 137-144, 2008. Disponível em: www.studiesinmicology.org. Acesso em: 11/2010

WEGMANN, F.; HEILESEN, A.M.; HORN, T. Tenckhoff catheter penetrated by *Aspergillus fumigatus*: a case report. **Peritoneal Dialysis International**, Milton vol. 8, p. 281-283, 1988.

WHITE, T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315–322. London: Academic Press, San Diego, 1990.

ZENG, J.S.; SUTTON, D.A.; FOTHERGILL, A.W.; RINALDI, M.G.; HARRAK, M.J., HOOG, G.S. Spectrum of clinically relevant *Exophiala* species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 11, p. 3713-3720, 2007.

ZENG, J.S.; HOOG de, G.S. *Exophiala spinifera* and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding. **Medical Mycology**, London, v. 46, p. 193-208, 2007.

ZOYSA, J.R. Successful treatment of CAPD peritonitis caused by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Peritoneal Dialysis International**, Milton, v. 21, n. 6, p. 628.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 -	CODIFICAÇÃO DOS APÊNDICES.....	94
APÊNDICE 2 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A PONTO 1.....	95
APÊNDICE 3 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A PONTO 2.....	96
APÊNDICE 4 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A PONTOS 3 e 4.....	97
APÊNDICE 5 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B PONTO 1.....	98
APÊNDICE 6 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B PONTO 2.....	99
APÊNDICE 7 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B PONTOS 3 e 4.....	100
APÊNDICE 8 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C PONTO 1.....	101
APÊNDICE 9 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C PONTO 2.....	102
APÊNDICE 10 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C PONTOS 3 e 4.....	103
APÊNDICE 11 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D PONTO 1.....	104
APÊNDICE 12 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D PONTO 2.....	105
APÊNDICE 13 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D PONTOS 3 e 4.....	106
APÊNDICE 14 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E PONTO 1.....	107
APÊNDICE 15 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E PONTO 2.....	108
APÊNDICE 16 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E PONTOS 3 e 4.....	109
APÊNDICE 17 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F PONTO 1.....	110
APÊNDICE 18 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F PONTO 2.....	111
APÊNDICE 19 -	QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F PONTOS 3 e 4.....	112
APÊNDICE 20 -	PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS DEMATIÁCEOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO UTILIZANDO OS <i>PRIMERS</i> V9G E LS266.....	113

APÊNDICE 1 - CODIFICAÇÃO DOS QUADROS

COD	Código da amostra
BAC	Contagem de bactérias
COL	Contagem de coliformes totais
PSE	Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
END	Concentração de Endotoxina Bacteriana
BOL-S	Contagem de fungos filamentosos pelo método contagem em superfície
BOL-F	Contagem de fungos filamentosos pelo método filtração por membrana
LEV-S	Contagem de leveduras pelo método contagem em superfície
LEV-F	Contagem de leveduras pelo método filtração por membrana
FUNG	Código numérico de cada fungo isolado para identificação
ND	Não detectado
NI	Não isolado para identificação
X	Sem isolados
NR	Não realizado
	Fungo isolado em 1mL de amostra
	Fungos hialinos
	Fungos dematiáceos
	Leveduras hialinas
	Suspeita de <i>Pseudomonas</i> SP
	Diferença de contagem de bactérias nas leituras de 48 horas e 5 dias
	Concentração de endotoxina bacteriana inferior a 0,125 EU/mL
	Confirmação
	Turvação do meio lauril sulfato de sódio

APÊNDICE 2 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A – PONTO 1

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	23/03/10	28/04/10	26/05/10	30/06/10	28/07/10	30/08/10	28/09/10
COD	828	947	995	42	127	225	345	431	632	783	944	1037
BAC UFC/mL	<1	<1	<1	<1	2,5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	ND	ND	2	ND	ND	ND	2	ND	1	1	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUNG	121	122	62	80	X	X	220	X	NI	NI	X	X
	X	X	63	X	X	X	221	X	X	X	X	X
	X	X	64	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	104	X	X	X	X	X	X	X	X	X

As coletas foram realizadas no hidrômetro da clínica, somente na coleta de setembro a amostra do ponto 1 foi coletada na torneira da pia na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 3 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A – PONTO 2

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	23/03/10	28/04/10	26/05/10	30/06/10	28/07/10	30/08/10	28/09/10
COD	829	948	996	43	128	226	346	432	633	784	945	1038
BAC UFC/mL	<1	99	15	20	1,5 / 43	3 / 25	<1 / 1	<1 / 27	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	<2	>2	<2	>2	>2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	1	ND	7	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	1	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	1	ND
FUNG	01	X	65	81	X	168	X	X	X	NI	NI	X
	02	X	66	X	X	169	X	X	X	X	X	X

APÊNDICE 4- QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA A – PONTOS 3 e 4

	20/10/09 Máquina	24/11/09 Máquina	08/12/09 Máquina	27/01/10 Máquina	23/02/10 Máquina	23/03/10 Máquina	28/04/10 Pós- osmose	26/05/10 Máquina	30/06/10 Máquina	28/07/10 Máquina	30/08/10 Máquina	29/09/10 Máquina
COD	830	949	997	44	129	227	347	433	634	785	946	1039
BAC UFC/mL	<1	<1	<1	30	240 / 430	6 / 15	<1 / 4,5	<1 / 4,5	265	18	1200	260 / 370
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	>2	≤2	<2	>2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	2	ND	ND	ND	1	ND	ND	46	ND	ND	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	200	10	<10	<10	150	55	140	140
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	>150	253	ND	2	>150	>150	>150	>150
FUNG	03	79	X	X	132	170	X	223	NI	NI	NI	NI
	22	128	X	X	133	X	X	224 NI	X	X	X	X
	23	X	X	X	134	X	X	244	X	X	X	X

Ponto 3 – Dialisato - Coleta na máquina de hemodiálise n° 09 - serie 09c2597P Diamax/ Nipro

Ponto 4 – Água para diálise – pós osmose - Torneira sala de tratamento

APÊNDICE 5 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B – PONTO 1

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	23/03/10	28/04/10	26/05/10	28/06/10	28/07/10	30/08/10	27/09/10
COD	831	950	998	45	130	228	348	434	635	786	947	1033
BAC UFC/mL	<1	22	190	410	1,5/ 590	<1/ 160	19/200	39/ 57	142	30	25/ 55	81/100
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	15	65	10	<10	10	<10	40	30	<10	10	<10
BOL-F UFC/100mL	7	467	>150	>150	164	204	>150	>150	>150	280	77	3
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	2	ND	1	ND	ND	ND	1	ND	15	ND
FUNG	4	30	59	84	135	171	199	225	NI	NI	NI	NI
	5	31	60	85	136	172	200	248	NI	X	NI	X
	6	32	61	86	137	173	216	X	NI	X	NI	X
	7	33	105	87	138	196	X	X	X	X	X	X
	47	X	106	116	139	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	107	X	167	X	X	X	X	X	X	X

As coletas foram realizadas na sala de tratamento de água da clínica em torneira no ponto pré osmose, somente na coleta de setembro a amostra do ponto 1 foi coletada na torneira da pia na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 6- QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B – PONTO 2

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	23/03/10	28/04/10	26/05/10	28/06/10	28/07/10	30/08/2010	27/09/10
COD	832	951	999	46	131	229	349	435	636	805	948	1034
BAC UFC/mL	3,5	260	27	170	1,5 / 160	25	1/43	223 / 380	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	<2	NR	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	10	11	28	225	20	175	19	31	ND	2	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	3	9	4	ND	33	ND	ND	3	ND	ND	ND	ND
FUNG	17	34	54	88	140	174	201	227	X	NI	X	X
	18	35	55	120	141	175	202	228	X	X	X	X
	19	36	56	X	142	176	203	229	X	X	X	X
	20	37	57	X	143	177	204	232	X	X	X	X
	21	38	108	X	X	X	212	X	X	X	X	X
	24	X	109	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	25	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

APÊNDICE 7 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA B – PONTOS 3 e 4

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	23/03/10	28/04/10	26/05/10	28/06/10	28/07/10		30/08/10	27/09/10
COD	833 Máquina	952 Máquina	1000 Máquina	47 Máquina	132 Máquina 07	230 Máquina 09	350 Pós osmose	436 Máquina	637 Pós ozonizador	788 Máquina	787 Pós ozonizador	949 Pós ozonizador	1035 Máquina
BAC UFC/mL	<1	27	<1	43	<1 / 47	<1 / 25	3/40	32 / 52	<1	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	<2	<2	≤2	≤2	<2	>2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100MI	13	11	16	5	13	12	>150	2	ND	ND	ND	ND	1
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	56	ND	ND	ND	ND	2	ND	14	ND	3	ND	ND	ND
FUNG	08	39	67	82	144	178	203	230	X	NI	X	X	NI
	09	40	68	89	145	179	204	231	X	X	X	X	X
	10	X	69	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Coleta na máquina de hemodiálise n° 8- 40085 OV5AL436 – Fresenius – sala 03

Ponto 3 – Dialisato - Máquina 07 e 09- coleta em outra máquina devido ao não funcionamento da máquina n° 8

Ponto 4 – Água para diálise - Pós-osmose- Torneira sala de tratamento

Ponto 4 – Água para diálise - Pós-ozonizador- Torneira na sala de tratamento após ozonizador

APÊNDICE 8 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C – PONTO 1

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	26/03/10	30/04/10	28/05/10	30/06/10	03/08/10	31/08/10	30/09/10
COD	834	953	1001	48	133	231	364	446	638	789	950	1058
BAC UFC/mL	<1	44	7	700	38 / 190	21 / 29	55	2	<1	3,5	1 / 18	4,5
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	10	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	1	131	>150	>150	>150	12	59	ND	ND	ND	ND	2
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
FUNG	11	41	58	83	146	191	213	X	X	X	X	NI
	X	48	110	91	147	195	214	X	X	X	X	NI
	X	129	111	92	165	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	112	93	166	X	X	X	X	X	X	X
				117								

Coletas de outubro de 2009 a maio de 2010 realizadas na torneira dentro da clínica. Coletas de junho e julho de 2010 realizadas na sala de tratamento no ponto pré- osmose. Coletas de agosto e setembro de 2010 realizadas na torneira da pia localizada na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 9 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C – PONTO 2

	20/10/09	24/11/09	08/12/09	27/01/10	23/02/10	26/03/10	30/04/10	28/05/10	30/06/10	03/08/10	31/08/10	30/09/10
cod	835	954	1002	49	134	232	365	447	639	790	951	1059
BAC UFC/mL	40	59	9	15	24 / 77	<1	<1	<1	2	1	7,5/1200	78
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	>2	>2	>2	>2	>2	≤2	>2	>2	>2	>2	<2	>2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	35	<10
BOL-F UFC/100mL	ND	ND	2	ND	18	1	ND	ND	ND	ND	8	3
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9
FUNG	X	42	70	118	148	192	X	X	X	X	X	NI
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	NI
	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	NI

APÊNDICE 10- QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA C – PONTOS 3 e 4

	20/10/09 Máquina	24/11/09 Máquina	08/12/09 Máquina	27/01/10 Máquina	23/02/10 Máquina	26/03/10 Máquina	30/04/10 Máquina	28/05/10 Máquina	30/06/10 Pós- osmose	03/08/10 Pós- osmose	31/08/10 Máquina	30/09/10 Máquina
COD	836	955	1003	50	135	233	366	448	640	791	952	1060
BAC UFC/mL	13	35	6,5	1,5	20/470	<1	1300	15	158 / 200	2	330	1700
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	> 23	1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	>2	>2	>2	>2	>2	<2	>2	>2	<2	>2	<2	>2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	>150
LEV-F UFC/100mL	ND	1	ND	35	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	>150
FUNG	125	42	113	94	149/153	X	X	X	X	NI	NI	NI
	X	X	X	X	150/151	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	X	X	164	X	X	X	X	X	X	X
	X	X	X	X	152	X	X	X	X	X	X	X

Ponto 3 – Dialisato - Coleta na máquina de hemodiálise n° 8-06ª0422S – Nipro IB – Conforme solicitação do responsável da clínica a coleta foi realizada antes do paciente iniciar a hemodiálise após desinfecção da máquina.

Ponto 4 – Água para diálise – ponto pós-osmose- Torneira sala de tratamento

APÊNDICE 11 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D – PONTO 1

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	25/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	29/06/10	29/07/10	31/08/10	28/09/10
COD	841	956	1004	51	136	234	356	437	641	792	953	1040
BAC UFC/mL	<1	4	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1 / 11	4,5	<1	<1 / 15
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	1	1	1	ND	38	14	ND	1	ND	1	ND	2
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	1	ND	ND	ND
FUNG	12	49	103	119	163	197	205	243	NI	NI	X	NI
	X	130	X	X	X	198	X	X	X	X	X	X

Coletas de outubro de 2009 a agosto de 2010 realizadas no hidrômetro. Coleta de setembro de 2010 realizada na torneira da pia localizada na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 12 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D – PONTO 2

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	25/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	29/06/10	27/07/10	31/08/10	28/09/10
COD	842	957	1005	52	137	235	357	438	642	793	954	1041
BAC UFC/mL	<1	5	11	<1	7	3 /3,5	7,5	6	<1	1	<1	<1/34
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	1.1
END EU/mL	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	4	2	ND	4	5	1	4	1	1	ND	ND	7
LEV-S UFC/mL	<10	<10	16	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	8	>150	12	6	ND	103	5	ND
FUNG	13	50	71	100	159	180	206	233	NI	NI	NI	NI
	123	X	72	101	160	181	207	234	X	X	X	X
	X	X	115	X	X	182	X	X	X	X	X	X
	X	X	X	X	X	183	X	X	X	X	X	X

APÊNDICE 13 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA D – PONTOS 3 e 4

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	25/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	29/06/10	29/07/10	31/08/10	28/09/10
COD	843 Máquina	958 Máquina	1006 Máquina	53 Máquina	138 Máquina	236 Máquina	358 Pós- osmose	439 Máquina	643 Pós- osmose	794 Máquina	955 Máquina	1042 Máquina
BAC UFC/mL	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	<2	<2	<2	<2	<2	>2	<2	>2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUNG	X	43	X	X	X	184	218	X	X	X	X	X
	X	51	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Ponto 1 – Dialisato - Coleta na máquina de hemodiálise n° 13- serie 6VCAEG39 – Sala 2

Ponto 2 – Água para diálise – pós-osmose- Torneira sala de tratamento

APÊNDICE 14 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E – PONTO 1

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	24/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	30/06/10	29/07/10	31/08/10	30/09/10
COD	844	959	1007	54	139	237	359	440	644	795	956	1061
BAC UFC/mL	3	560	<1	<1	<1	<1	1,5	10	8	14	230	77
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	<10	10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	102	192	163	9	3	101	5	ND	97	53	1	151
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	8
FUNG	14/126	44	73	95	154	185	219	X	NI	NI	NI	NI
	27	52	74	X	155	186	X	X	X	NI	X	NI
	28	131	114	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	124	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Coletas de outubro de 2009 a agosto de 2010 realizadas na torneira dentro da clínica. Coleta de setembro de 2010 realizada na torneira da pia localizada na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 15 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E – PONTO 2

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	24/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	30/06/10	29/07/10	31/08/10	30/09/10
COD	845	960	1008	55	140	238	360	441	645	796	957	1062
BAC UFC/mL	12	49	25	420	37 / 49	1600	46	84	20	1	28 / 110	27
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	<2	<2	<2	<2	>2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	60	10	<10	<10	<10	<10	25
BOL-F UFC/100mL	32	26	25	24	34	ND	166	26	136	65	ND	9
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	10	55	<10	<10	10	<10	<10	85
LEV-F UFC/100mL	ND	1	ND	76	165	>150	29	17	89	67	13	>150
FUNG	15	45	75	96	156	187	209	236	NI	NI	NI	NI
	26	46	X	97	157	188	210	237	NI	NI	X	NI
	127	53	X	98	158	X	211	238	NI	X	X	X
	X	X	X	X	X	X	217	239	X	X	X	X

APÊNDICE 16 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA E – PONTOS 3 e 4

	21/10/09	25/11/09	09/12/09	28/01/10	24/02/10	25/03/10	29/04/10	27/05/10	30/06/10	29/07/10	31/08/10	30/09/10
COD	846 Máquina	961 Máquina	1009 Máquina	56 Máquina	141 Máquina	239 Máquina	361 Pós- osmose	442 Máquina substituta	646 Máquina	797 Pós- osmose	958 Máquina	1063 Máquina
BAC UFC/mL	<1	370	<1	820	12000	1/2	1,5	150	3,5	1,5	29/39	56
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	2.2	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/mL	<2	<2	<2	<2	>2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	12	ND	5	5	ND	9	1	44	4	5	ND	15
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19	ND	ND	21	ND
FUNG	16	X	76	99	X	189	222	240/241	DEM	DEM	LEV	NI
	29	X	X	X	X	X	X	247	X	X	X	X
	X	X	X	X	X	X	X	242	X	X	X	X
	X	X	X	X	X	X	X	246	X	X	X	X

Ponto 3 – Dialisato -Coleta na máquina de hemodiálise n° 9- 4008 B OV5AP877 – Fresenius

Ponto 3 – Dialisato - Máquina substituta- coleta em outra máquina devido a manutenção da máquina n° 9

Ponto 4 – Água para diálise -pós-osmose- Torneira sala de tratamento

APÊNDICE 17 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F – PONTO 1

	09/12/09	28/01/10	24/02/10	26/03/10	30/04/10	28/05/10	28/06/10	30/07/10	30/08/10	29/09/10	29/10/10	29/11/10
COD	1010	57	142	240	367	443	647	798	959	1047	1210	1374
BAC UFC/mL	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1 / 3,5	1,5	<1	<1	<1	<1
COL NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100mL	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	3.6	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
BOL-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100mL	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEV-S UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUNG	X	X	X	193	X	X	X	X	X	X	X	X

Coletas de dezembro de 2009 a agosto de 2010 realizadas na sala de tratamento de água – água de poço artesiano. Coletas de setembro, outubro e novembro de 2010 realizadas em torneira da pia localizada na sala de hemodiálise.

APÊNDICE 18 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F – PONTO 2

	09/12/09	28/01/10	24/02/10	26/03/10	30/04/10	28/05/10	28/06/10	30/07/10	30/08/10	29/09/10	29/10/10	29/11/10
COD	1011	58	143	241	368	444	648	799	960	1048	1211	1375
BAC UFC/ML	<1	<1	41	2 / 3	1300	2	40 / 44	<1	23	18 / 25	<1	58,5/62
COL NMP/100ML	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100ML	<1.1	<1.1	>23	<1.1	<1.1	<1.1	1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	1.1
END EU/ML	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/ML	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100ML	2	ND	159	ND	1	2	ND	ND	1	1	ND	1
LEV-S UFC/ML	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100ML	1	ND	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
FUNG	77	102	161	X	215	245	X	X	NI	TRIC	X	TRIC
	78	X	162	X	X	X	X	X	X	X	X	X

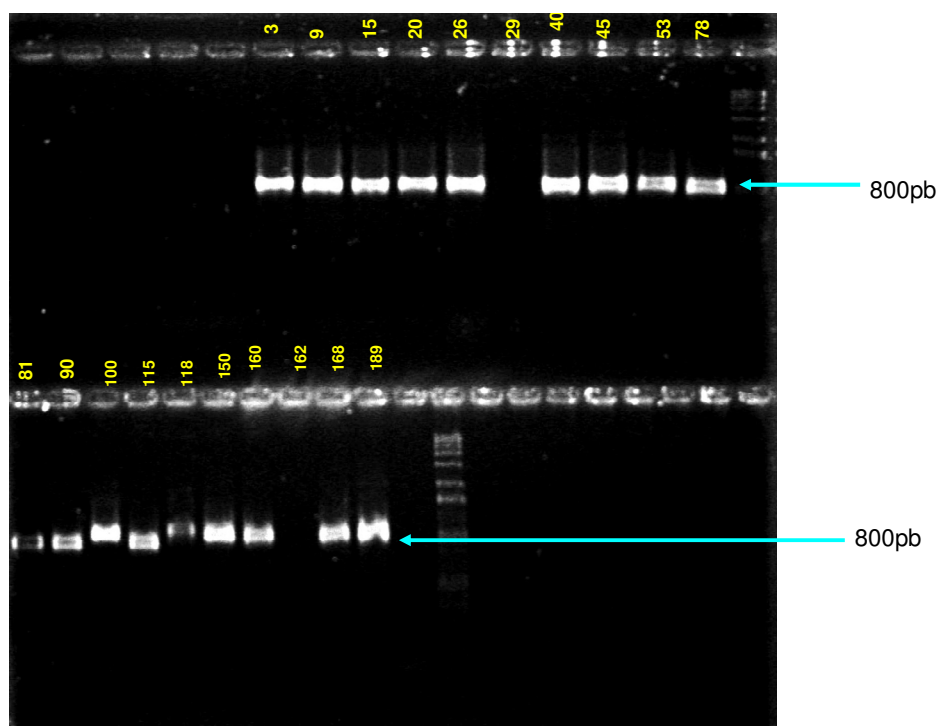
APÊNDICE 19 - QUADRO DE RESULTADOS CLÍNICA F – PONTOS 3 e 4

	09/12/09	28/01/10	24/02/10	26/03/10	30/04/10	28/05/10	28/06/10	30/07/10	30/08/10	29/09/10	29/10/10	29/11/10
COD	1012 Maquina	59 Maquina	144 Maquina	242 Maquina	369 Pós- osmose	445 Pós- osmose	649 Maquina	800 Pós- osmose	961 Pós- osmose	1049 Maquina	1213 Maquina	1376 Maquina
BAC UFC/ML	<1	<1	<1	<1	3,5	<1	<1	<1	2,5	<1	<1	<1
COL NMP/100ML	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
PSE NMP/100ML	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1	<1.1
END EU/ML	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
BOL-S UFC/ML	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
BOL-F UFC/100ML	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LEV-S UFC/ML	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
LEV-F UFC/100ML	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>150	ND	ND	ND
FUNG	NI	X	X	X	X	X	X	X	NI	X	X	X

Ponto 3 – Dialisato - Coleta na máquina de hemodiálise n° 2- 8VCAKA69 – Fresenius

Ponto 4 – Água para diálise - pós-osmose- Torneira sala de tratamento

APÊNDICE 20 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE FUNGOS
DEMATIÁCEOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA
DIÁLISE E DIALISATO UTILIZANDO OS *PRIMERS* V9G E LS266



NOTA: Eletroforese em gel de agarose 1,4 % das linhagens estudadas; L: Ladder (marcador molecular de 1 kb); BR: Branco (controle negativo da reação). Isolados de amostras de água tratada para diálise e dialisato das clínicas de hemodiálise avaliadas em 2009 e 2010. Amostras 29 e 162 sem amplificação.