UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM

ALEXANDRA DO ROSÁRIO TONIOLO

**CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE
HEMODIALISADORES PROCESSADOS PELO
MÉTODO AUTOMATIZADO E MANUAL APÓS O
NÚMERO MÁXIMO DE REUSOS**

SÃO PAULO
2014

ALEXANDRA DO ROSÁRIO TONIOLO

**CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE
HEMODIALISADORES PROCESSADOS PELO
MÉTODO AUTOMATIZADO E MANUAL APÓS O
NÚMERO MÁXIMO DE REUSOS**

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Enfermagem na
Saúde do Adulto.

Orientadora: Profa. Dra. Kazuko
Uchikawa Graziano.

Versão Revisada
Versão Original encontra-se disponível na
Biblioteca da EEUSP

SÃO PAULO

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Catálogo na Publicação (CIP)
Biblioteca “Wanda de Aguiar Horta”
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo

Toniolo, Alexandra do Rosário

Contaminação microbiana de hemodialisadores processados pelo método automatizado e manual após o número máximo de reusos / Alexandra do Rosário Toniolo. São Paulo, 2014.
110 p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kazuko Uchikawa Graziano
Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

1. Hemodiálise. 2. Desinfecção. 3. Esterilização. I. Título.

Nome: Alexandra do Rosário Toniolo

Título: Contaminação microbiana de hemodialisadores processados pelo método automatizado e manual após o número máximo de reusos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestra em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*A Meus Pais (in Memoriam) **Aldo Toniolo** e **Emilia do Rosário Toniolo** que nos deixaram em bases sólidas.*

*A minha avó **Nair R. Rosário** que continuou a caminhada, sem esmorecer!!*

*A meus irmãos **Angela Toniolo Botasso, Silvia R. Toniolo Teche e Mário José do Rosário Toniolo**, com muito amor.*

AGRADECIMENTOS

A professora **Kazuko Uchikawa Graziano**, pela confiança e ensinamentos e apoio.

À minha avó **Nair R. Rosário** por compreender minha ausência.

A meus irmãos **Angela Toniolo Botasso, Silvia R. Toniolo Teche e Mário José do Rosário Toniolo**, vocês são meu porto seguro.

Aos meus sobrinhos que são uma das belezas da vida: **João Henrique, Matheus, Caio, Ana Luiza, Bárbara, Maria Luiza, Lucas e Ana Emilia** amo vocês!!

Aos meus cunhados: **Carlos Henrique, Edimilson e Viviane** que somos como irmão.

Ao meu “Amorzão” **Laerte** pelo companheirismo.

A Dra **Luci Corrêa**, por todo apoio e compreensão que tornaram este trabalho possível.

A **Julia Y. Kawagoe**, por me colocar neste caminho e por me apoiar.

Ao Departamento de Diálise da Fundação Osvaldo Ramos, especialmente à Gerente de Enfermagem **Silvia R. Manfredi**, por me abrir as portas.

A toda equipe de enfermagem do Serviço de Diálise do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo especialmente a enfermeira **Cecilia**.

Aos meus amigos do Controle de Infecção do Hospital Albert Einstein: **Claudia Vallone, Maria Fatima, Priscila, Helena, Leonilda, Camila, Fernando e Paulo**, sem vocês não seria possível!

A Professora **Dra. Marina Ishii** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela disponibilidade, ajuda e carinho com que me recebeu.

A minha amiga **Maira** por compartilhar esta caminhada, com você ficou mais fácil.

Ao Dr. **Oscar Fernando Pavão dos Santos** e **Dr.Miguel Cendoroglo** Neto pelo apoio.

Ao meu amigo **Ivan** da Morfeu web e design e **Maria Gabriela**.

A 3 Albe Comercial LTDA na pessoa de **Maria Cristina Sarris**.

A Fresenius do Brasil na pessoa de **Gustavo Giandoso**.

Ao Grupo de Pesquisa **Camila, Alda, Rafael, Caroline** e **Simone**.

A toda equipe do Laboratório da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, em especial a **Cely** e **Suzete** pelas análises microbiológicas.

A **Dra Marinês** e **Paula Koga** do laboratório clínico do Hospital Albert Einstein pelas discussões e alguns empréstimos.

A **Giovana** da CME do Hospital Albert Einstein e toda equipe de enfermagem pelo carinho com que sempre sou tratada.

A **Neusa** do laboratório da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

A Probac do Brasil, especialmente à **Cely, Carlos Henrique** e **Celia**, pela ajuda com os meios de cultura.

Toniolo AR. Contaminação microbiana de hemodialisadores processados pelo método automatizado e manual após o número máximo de reusos. [Dissertação – Mestrado]. São Paulo (SP) Brasil: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2014.

RESUMO

Introdução: A hemodiálise é um procedimento invasivo, para pacientes em falência renal onde se realiza a filtração do sangue continuamente, utilizando-se circulação extracorpórea em um filtro hemodialisador. No Brasil, a prática do reuso de hemodialisadores atinge quase 100% nos serviços de diálise. Uma das justificativas para o reuso são os limitados recursos para a assistência à saúde. No entanto, esta prática, causa questionamentos relacionados à segurança. Erros técnicos no reprocessamento, qualidade da água e alteração da integridade da membrana do hemodiliasador podem afetar a qualidade do processamento expondo os pacientes ao risco de bacteriemia e sepse. **Objetivo:** Avaliar a contaminação microbiana dos hemodialisadores após o número máximo de reusos permitidos, comparando os resultados conforme tipo de processamento: manual e automatizado.

Método: Esta pesquisa caracterizou-se como estudo de campo, transversal, de caráter exploratório comparativo em dois serviços de diálise. A composição da amostra foi por conveniência conforme a disponibilidade destas, pelas instituições doadoras, sendo os grupos experimentais compostos por 11 hemodialisadores processados pelo método automatizado e quatro hemodialisadores processados manualmente. As amostras foram coletadas após o processamento obedecendo ao número máximo de reusos permitidos pela RDC ANVISA nº 11/2014, sendo 12 reusos para processamento manual e 20 reusos para processamento automatizado. Em Cabine de Proteção Biológica a solução salina e dialisadora foram drenadas dos compartimentos de sangue e dialisato, respectivamente, e injetados 150 mL de meio de cultura Tioglicolato de Sódio Fluido em cada compartimento. As amostras foram incubadas em estufa microbiológica por 14 dias, a temperatura de 35 °C $\pm$ 2°C. Após esse período alíquotas do meio de cultura foram semeadas em meios de ágar sangue, anaerinsol e sabouraud, capazes de recuperar a maioria dos microrganismos aeróbios, anaeróbios, bolores e leveduras. As placas foram incubadas por 48 horas a 35 °C $\pm$ 2°C, e procedida a identificação de gênero dos microrganismos. Realizados controles positivos com hemodialisadores contaminados intencionalmente e controles negativos, com novos esterilizados. Resultados: Das amostras submetidas ao processamento automatizado três amostras (3/11-27,3%) apresentaram crescimento microbiano no compartimento de sangue, sendo identificados dois diferentes microrganismos: de *Sphingomonas paucimobilis* (66,67%) e de *Penicillium* sp. (33,33%). Todas as amostras 11/11 (100%) apresentaram crescimento microbiano no compartimento de dialisato, sendo identificados 5 diferentes microrganismos: *Sphingomonas paucimobilis* (43,75%), *Stenotrophomonas maltophilia* (25%), *Pseudomonas aeruginosa* (18,75%), *Acinetobacter baumannii* (6,25%) e *Candida* sp (6,25%). Dos quatro hemodialisadores submetidos ao processamento manual, uma amostra (25%) apresentou crescimento de bacilo Gram-positivo no compartimento de sangue e uma amostra (25%) apresentou crescimento no compartimento do dialisato contaminados por três microrganismos distintos: de *Bacillus* sp, *Rhizobium radiobacter*, *Burkholderia* sp. Comparando os resultados da contaminação microbiana segundo os dois métodos de processamento analisados não houve diferença estatisticamente significativa ($p=1$) para o compartimento de sangue. Para o compartimento do dialisato o método automatizado apresentou maior número amostras positivas em relação ao manual ($p=0,008791$). **Conclusão:**

Os resultados demonstraram que o reuso dos hemodialisadores não é uma prática recomendada, podendo causar bacteriemia e sepse em pacientes em tratamento hemodialítico. Ressalta-se que a pesquisa foi conduzida no pior cenário após o número máximo de reusos permitidos sem determinar em qual número de reusos a contaminação aconteceu.

PALAVRAS-CHAVE: Diálise Renal, Unidades hospitalares de hemodiálise, desinfecção, esterilização.

Toniolo AR. Microbiological contamination of reprocessed dialyzers after maximal number of reuses . [Dissertation – Master's Degree].São Paulo (SP) Brasil: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2014.

ABSTRACT

Introduction: Hemodialysis is an invasive procedure for patients with kidney failure in which blood is continuously filtered using a dialyzer filter through extracorporeal blood flow. In Brazil dialyzers are nearly 100% reused in dialysis facilities. One of the main justifications to reuse dialyzers is economical. However, this practice often leads to concerns related to patient safety. Technical errors in reprocessing, water quality and the membrane dialyzer degradation may lead to different risks including bacteremia and sepsis.

Objective: To evaluate dialyzers regarding microbiological contamination after maximal number of reuses, comparing results in accordance with the type of reprocessing: manual and automated. **Method:** This research was characterized as a transversal, exploratory and comparative in two dialysis facilities. The sample was composed as convenience according to the availability of the facilities which donated the samples. The experimental groups were composed of 11 automated reprocessed dialyzers and four manually reprocessed dialyzers. The samples were collected after reprocessing in dialysis facilities according to the maximal number of reuses permitted by law (12 in manual reprocessing and 20 in automated reprocessing) and prepared in Biosafety Cabinets. Saline Solution and dialysate solution were drained from both the blood and the dialysate chambers, respectively, by applying suction and filled with 150 mL of culture medium sodium thioglicolato fluid in each chamber and they were incubated at a temperature of 35 ° C + or - 2 ° C for 14 days. After this period, the samples were cultured in medium adequate for the growth of aerobic and anaerobic organisms as well as fungi and yeasts. The samples were incubated for 48 hours at 35 ° C + or -2 ° C and identification of microorganisms was carried.

Results: The analyzed samples which were automated reprocessed, 3/11(27.3%) showed microbiological growth in the blood chamber, of this total, we identified two different microorganisms: *S.paucimobilis* (66,67%) and *Penicillium* sp. (33,33%). In the dialysate chamber 11/11 (100%) of microbiological growth was identified, of this total we identified five different microorganisms: *S.paucimobilis* (43,75%) , *S. maltophilia* (25%) , *P. aeruginosa* (18,75%) , *A. baumannii* (6,25%) and *Candida* sp. (6,25%). The four analyzed samples which were manually reprocessed, 1/4(25%) showed microbiological growth in the blood chamber. One sample with Gram-positive Bacillus was identified in the dialysate chamber and contaminated by *Bacillus* sp, *R. Radiobacter* and *Burkholderia* sp. Comparing the results related to microbiological growth according to the two methods in the blood chamber, we concluded that there was no statistically significant difference ($p=1$) and in the dialysate chamber, there was a higher number of positive samples among those which were automated reprocessed compared to manually reprocessed ($p = 0.008791$)

Conclusion: The results showed that dialyzers reuse is not a recommended practice and may cause bacteremia and sepsis for patients with chronic kidney disease. We highlight that this study was carried out considering the worst case scenario ,i.e. after the maximal number of reuses permitted by law, without specifying in which number of reuses the contamination occurred.

KEYWORDS: Renal dialysis, hemodialysis units, disinfection, sterilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Hemodialisador conectado às linhas de hemodiálise	30
Figura 2. Corte transversal do hemodialisador com múltiplas fibras ocas no interior	30
Figura 3- Fluxo de água passando pelo compartimento do sangue	44
Figura 4– Fluxo de água pressurizada conectado ao compartimento do dialisato.....	44
Figura 5: Esquema ilustrativo de filtração de Água por Osmose reversa.....	52
Figura 6: Esquema Representativo dos Grupos Experimentais e Grupos Controle.....	67
Figura 7- Procedimento de remoção de solução salina/dialisato do interior dos compartimentos.....	72
Figura 8- Procedimento de injeção de solução tioglicolato de sódio fluido no interior dos compartimentos	73
Figura 9- Procedimento de aspiração de tioglicolato de sódio fluido após 14 dias de incubação	73
Figura 10– Esquema representativo para avaliação microbiológica	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado das culturas microbiológicas dos hemodialisadores processados automatizadamente, após 20º reuso. São Paulo 2014	79
Tabela 2- Resultado das culturas microbiológicas dos hemodialisadores processados manualmente, após 12º reuso. São Paulo 2014.....	80
Tabela 3- Distribuição dos microrganismos identificados nas amostras processadas automatizadamente, após 20º reuso. São Paulo 2014.....	80
Tabela 4 - Distribuição dos microrganismos identificados nas amostras processadas manualmente, após 12º reuso. São Paulo 2014.....	81
Tabela 5 – Análise microbiológica comparando método automatizado e manual no compartimento de dialisato. São Paulo 2014.....	81
Tabela 6 – Análise microbiológica comparando método manual e automatizado no compartimento de sangue. São Paulo 2014.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características físicas e organolépticas da água potável	49
Quadro 2 - Padrão de água tratada utilizada na preparação de solução para diálise	51
Quadro 3 - Procedimento de manutenção do sistema de armazenamento de água.	53
Quadro 4 - Microrganismos identificados no presente estudo correlacionados as principais fontes de infecção relacionada à assistência à saúde	85

LISTA DE SIGLAS

AAMI - Association for advancement of Medical Instrumentation
AHL - N-acil homoserina lactonas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA - Ácido Peracético
CDC - Centers for Disease Control and Prevention
CEP - Câmara de Ética e Pesquisa
DESD - Departamento de Economia da Saúde e Desenvolvimento
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DP - Diálise Peritoneal
DRC - Doença Renal Crônica
EPI - Equipamentos de Proteção Individual
EPS- Substância Extracelular Polimérica
EUA - Estados Unidos da América
EU - Unidades de Endotoxinas
HD - Hemodiálise
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HU - Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
IRAS- Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde
h - Hora
KoA Coeficiente de Transferência de massa
 K_{uf} Coeficiente de Ultrafiltração
L - litros
log - Logaritmos
MS - Ministério da Saúde
mg - miligramas
mL- mililitros
mm/Hg - Milímetros de Mercúrio
min - Minutos
O/F- Oxidação/ Fermentação
PIA - Peptídeos Auto-indutores
pH - Potencial Hidrogeniônico
POP- Procedimento Operacional Padrão

ppm - Parte por Milhão
PS - Profissionais de Saúde
PVC - Polivinilcloride
QS - *Quorum Sensing*
RDC- Resolução da Diretoria Colegiada
RE Resolução
RNA - Ácido Ribonucleico
SS - Serviços de Saúde
SUS - Serviço Único de Saúde
TSI - Tríplice de Açúcar e Ferro
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
USP- Universidade de São Paulo
USRDS -United States Renal Data System

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Celsius

% Porcentagem

< Menor

> Maior

≤ Menor ou igual

≥ Maior ou igual

PSI Unidade de pressão

d. Daltons

μm micrômetro

β₂ Beta dois

β Beta

nm nanômetro

m² metro quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO	26
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA	26
2.2 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA	28
2.2.1 Hemodiálise.....	29
2.2.2 Membrana semipermeável	30
2.2.2.1 Características das membranas semipermeáveis.....	31
2.2.2.2 Tipos de membrana semipermeável	34
2.3 REPROCESSAMENTO DE HEMODIALISADORES	36
2.3.1 Etapas do processamento de hemodialisadores	39
2.3.2 Germicidas utilizados no processamento de hemodialisadores	46
2.3.3 Qualidade da água com enfoque no processamento.....	48
2.4 BIOFILME	54
2.4.1 Formação, crescimento, desenvolvimento e riscos para infecção ocasionados pelo biofilme	54
2.4.2 Resistência dos Biofilmes a Biocidas	57
2.4.3 Quorum Sensing.....	60
3 OBJETIVO.....	63
3.1 OBJETIVO GERAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
4 MATERIAL DE MÉTODO.....	65
4.1 TIPO DE ESTUDO.....	65
4.2 LOCAIS DE ESTUDO	65
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS HEMODIALISADORES PARA ANÁLISE	65
4.3.1 Critérios de Inclusão.....	65
4.3.2 Critérios de Exclusão.....	66
4.4 COLETA DE DADOS.....	66
4.4.1 Material.....	66
4.4.2 Composição dos Grupos Experimentais e Grupos Controle	67
4.4.3 Delineamento do estudo.....	68
4.4.3.1 Validação metodológica	68
4.4.4 Procedimento de Coleta dos Hemodialisadores	69
4.4.4.2 Análise microbiológica	70
4.4.5 Tratamento e Análise dos dados	77
4.4.6 Procedimentos Éticos	77
5 RESULTADOS	79
5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS	79
5.2 GRUPO CONTROLE.....	82
5.2.1 Controle Positivo	82
5.2.2 Controle Negativo.....	82
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS	100

1.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos prevalência de pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) vem aumentando. No Brasil, o número de pacientes mantidos em programa para tratamento de DRC aumentou em 98% em 2011 (91.314) quando comparado a 2001 em que 46.557 pacientes eram contemplados por esse programa (Sesso et al., 2011). Considerando-se os dados norte-americanos, estima-se que, em 2010, havia 594.374 pacientes em tratamento de DRC, 4% a mais que em 2009; no ano 2000, esse número aproximava-se de 400.000 pacientes (USRDS, 2012).

Uma das opções terapêuticas para pacientes com DRC em fase terminal da doença é a hemodiálise (HD); no Brasil, 90,6% dos pacientes com DRC encontram-se nessa fase terminal (Sesso et al., 2011). Dados norte-americanos reportam que 65% dos pacientes utilizam o procedimento de HD como terapia para DRC, sendo outras alternativas a diálise peritoneal e o transplante renal (USRDS, 2012).

A HD é um procedimento invasivo no qual se realiza a filtração do sangue, em um processo contínuo, utilizando-se a circulação extracorpórea, na qual o sangue passa por um filtro denominado hemodialisador. Neste processo, são retiradas as toxinas, e o sangue retorna depurado ao organismo. O hemodialisador (capilar ou filtro) é conectado a dois tubos chamados linhas para hemodiálise, ligados a acessos vasculares, arterial e venoso, para a realização da filtração do sangue (Brasil, 2010).

Pacientes portadores de DRC em tratamento por HD são de alto risco para o desenvolvimento de infecções, por várias razões, incluindo o estado de imunocomprometimento intrínseco à fase final da DRC, alta prevalência de Diabetes, exposição a outros pacientes durante as sessões de HD com uma frequência média de três vezes

por semana, expondo a diversas situações para a transmissão cruzada de agentes infecciosos. A invasividade requerida pelo procedimento hemodialítico, utilizando-se o acesso vascular por período prolongado em um circuito extracorpóreo, além da hospitalização frequente que aumenta a vulnerabilidade em adquirir infecções (APIC,2010; Patel, Thompson, Arduino, 2012).

As infecções adquiridas em serviços de saúde (SS), definidas como infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), constituem a segunda causa de hospitalização em pacientes portadores de DRC submetidos a tratamento por HD, com diagnósticos de bacteriemia e sepse. As causas cardiovasculares são as mais frequentes, sendo infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva as mais comuns. As reinternações em razão da infecção representam uma preocupação, pois aumentaram em 43%, desde 1994, elevando o risco de morte (USRDS, 2013).

A taxa Norte-Americana de mortalidade é de 266/mil pacientes/ano, sendo 10 vezes maiores que a população de um modo geral. As infecções representam a terceira causa de morte entre pacientes portadores de DRC (9,6%). A primeira causa é de origem cardiovascular (24,3%) e a segunda em razão do abandono do tratamento 11,4% (USRDS,2013).

No Brasil, a taxa de mortalidade é de 19,9% sem dados registrados quanto aos motivos infecciosos (Sesso et al., 2011).

O sistema de hemodiálise é complexo, contém uma variedade de componentes que transportam água, fluidos dialisadores e sangue. Este sistema pode ser contaminado com uma variedade de microrganismos, incluindo os de ambientes aquáticos, particularmente os Gram-negativos e micobactérias não tuberculosas. Desta forma, o sistema de HD pode funcionar como veículo para transmissão de agentes patogênicos ao sangue e vem sendo responsável por causar surtos (bacteriemia e reações

pirogênicas), frequentemente, relacionados ao processamento inadequado dos dialisadores ou água contaminada utilizada para o preparo do dialisato (CDC2001;Patel, Thompson, Arduino,2012).

Uma das justificativas para o reuso dos hemodialisadores são os limitados recursos para a assistência à saúde e vem sendo empregado nos Estados Unidos da América (EUA) desde, aproximadamente, 1960. Atualmente, especialistas estimam que cerca de 40% dos serviços dos EUA ainda reusam hemodialisadores (Finelli et al., 2005; Lacson, Lazarus, 2006). Em alguns países europeus, como Áustria, Dinamarca, Suécia, Finlândia e Holanda o uso único de dialisadores está estabelecido (Vinhas, Pinto dos Santos, 2000).

Em países com recursos econômicos escassos, incluindo Brasil, o reuso de hemodialisadores é uma prática rotineira, chegando a 100% (Cusumano et al., 2004; Manfredi , Canziani, 2005).

Atualmente, pela legislação recentemente revista (RDC nº11/2014) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estes podem ser reutilizados por 20 vezes se o processamento for automatizado, e se manual permite até 12 vezes, tendo sido estabelecido um prazo de 4 anos a partir da data de publicação, para a extinção do processamento manual. O que se continua questionando,desde a RDC ANVISA n154/2004, é a base científica que substanciou o número de reuso, correlacionando-se aos métodos de limpeza aplicados.

Práticas de reuso inadequadas dos hemodialisadores foram implicadas em oito dos 16 surtos investigados pelo CDC entre 1980 a 1999, quatro deles relacionados a inadequada concentração de agente esterilizante. Dois surtos estavam relacionados a micobactérias não tuberculosas, dois outros surtos de reação pirogênica e bacteriemias causadas por microrganismos Gram-negativos. A qualidade da água como fator predisponente para o

desenvolvimento de surtos foi relatada em três outras investigações que evidenciaram que a água usada nos serviços de diálise não atendia aos critérios da regulamentação local (Roth, Jarvis, 2000).

As consequências do reuso dos hemodialisadores vem sendo assunto preocupante em relação à morbidade e mortalidade dos pacientes. Em uma revisão sistemática da literatura, em que foram incluídos 14 estudos observacionais que avaliaram 956.807 pacientes, no período compreendido entre 1977 e 2009 avaliou o efeito do reuso de hemodialisadores na mortalidade de pacientes com DRC comparado a pacientes que utilizavam os de uso de único. Os pesquisadores concluíram não haver diferença estatisticamente significativa na taxa de mortalidade entre os dois grupos: hemodialisadores reutilizados versus hemodialisadores de uso único (Galvao et al., 2012).

Erros de técnica no processamento como inadequada limpeza, compromete a segurança da etapa seguinte por meio de esterilização química por imersão. Adicionalmente, alguns fatores contribuem para a degradação das fibras capilares de hemodialisadores, dentre eles, as forças físicas exercidas tanto pela pressão como pela vazão da água durante as etapas do processamento, a exposição a produtos de limpeza e germicidas, a qualidade e a temperatura da água e mudanças de pH no início da diálise (Taafe, 2001).

Desta maneira, a alteração nos poros das membranas pode resultar em permeabilidade a contaminantes biológicos como endotoxinas e outros particulados como proteínas levando à alteração da resposta imune do paciente. Estes fatos explicam o aumento da infecção e outros eventos adversos atribuídos ao reuso de hemodialisadores (Upadhyay, Sosa, Jaber, 2007).

Durante o procedimento de HD, pode haver circulação de microrganismos no sistema hemodialisador e potencialmente ocorrer

a formação de biofilmes. Este risco é aumentado por ocasião do processamento do hemodialisador com o uso de água purificada, sem ser esterilizada, utilizadas nas etapas de processamento.

Os biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos aderidos forte e irreversivelmente a uma superfície, ligados a um substrato ou uns aos outros por uma substância extracelular composta por exopolissacarídeos com a função de unir as células, formando uma matriz extracelular. A matriz é sobretudo composta por carboidratos e proteínas e tem a função de conferir proteção aos microrganismos (Donlan, Costerton, 2002). Em geral, os microrganismos contidos no biofilme são mais resistentes à ação de biocidas quando comparados aos microrganismos que se apresentam em forma livre (Donlan, 2001).

Os biofilmes presentes nos materiais utilizados na assistência à saúde representam um desafio para a execução da limpeza perfeita por apresentarem características que lhes conferem mecanismos de resistência a métodos usualmente empregados, sejam eles manuais ou automatizados.

Seguindo a definição da ANVISA (RDC 15/2012)*, justifica-se classificar os hemodialisadores, como de conformação complexa, possuindo espaços inacessíveis para a fricção mecânica por meio de escovas ou ultrassonicação, considerados métodos indicados para remoção de biofilmes.

Atualmente, os parâmetros adotados, inclusive pela ANVISA, dispostos na RDC nº11/2014 para avaliação do desempenho do hemodialisador para fins de reuso, é a avaliação do preenchimento das fibras que corresponde à medida indireta da capacidade de ultrafiltração, remoção de pequenos solutos e moléculas de tamanho médio (Cheung, Leyboldt, 1998).

Os pré-requisitos considerados para reuso dos hemodialisadores não consideram a segurança microbiológica. Este

pré-requisito corresponde à depuração de ureia de, no mínimo 90% do inicial, que foi validada por experimentos, utilizando fibras de celulose de baixo fluxo* e como germicida para efeitos de esterilização, o formaldeído. Para outros tipos de membrana e diferentes germicidas, esta correlação, embora também adotada não está definitivamente comprovada (Chemlamcharla, Leypoldt, Cheung, 2005; Robinson, Feldman, 2005).

No entanto, a avaliação sob o ponto de vista de segurança do processamento dos hemodialisadores vem sendo pouco valorizada, pois a decisão pelo reuso é motivada por questões financeiras, sofrendo pressão econômica dos sistemas de saúde.

Uma das etapas recomendadas do processamento após a etapa de limpeza é a avaliação do desempenho do hemodialisador por meio da verificação da integridade da membrana semipermeável. Este teste, denominado “*leak test*”, consiste na geração de gradiente de pressão através da membrana, podendo esta ser negativa ou positiva e mensurada em mmHg durante 30 segundos um período prédefinido de tempo. A variação da pressão permitida dentro de um determinado limite e caso os valores ultrapassem esse limite, o hemodialisador não deverá ser reutilizado, pois indica que a integridade da membrana está comprometida e poderá influenciar na qualidade da diálise alterando o coeficiente de ultrafiltração, além de possibilitar a circulação de microrganismos para o compartimento sanguíneo do hemodialisador, atingindo a corrente sanguínea do paciente (Miles, Friedman, 1997). Este teste não é rotineiramente realizado durante a limpeza manual; por outro lado, as máquinas de processamento possuem este recurso.

Considerando o custo expressivo de aproximadamente R\$100,00 dos hemodialisadores acredita-se que o abandono da prática de sua reutilização no Brasil é remota. Não exatamente pelo custo unitário dos hemodialisadores, mas principalmente pelo fato dos pacientes realizarem HD em média três vezes por semana, o

Alto fluxo Kuf >12ml/h/mmHg

Baixo fluxo Kuf <12ml/h/mmHg

que resultaria em um custo aproximado de R\$ 1.200,00/mês por paciente.

Assim sendo, a questão norteadora da pesquisa é: os métodos de processamento dos hemodialisadores, tanto manuais como automatizados são seguros do ponto de vista de controle de contaminação microbiana?

Considerando que não existem estudos suficientes que garantam a segurança do processamento do ponto de vista da contaminação microbiológica dos hemodialisadores é necessário que a academia responda às questões contribuindo para a prática atual do processamento de hemodialisadores quanto à segurança no reuso e consequentemente na segurança do paciente portador de DRC.

2.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os rins são responsáveis pela eliminação de resíduos tóxicos do organismo, pelo controle de líquidos, bem como de sais. Tem também como função produzir e secretar hormônios, como a eritropoetina, vitamina D e a renina. Quando o funcionamento dos rins está comprometido, o organismo passa a reter líquidos, a pressão arterial aumenta e há acúmulo de resíduos prejudiciais ao organismo. A doença renal crônica consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função desse órgão, ocorrendo perda da função glomerular, endócrina e tubular. Em sua fase avançada é chamada fase terminal de insuficiência renal crônica, e os rins não estabelecem a homeostasia. As duas principais causas para o desenvolvimento da DRC são: hipertensão arterial sistêmica e Diabetes mellitus (Romão Júniorr,2004; KDIGO,2013).

Nos pacientes com DRC, o estágio de evolução da doença deve ser classificado de acordo com o nível de função renal, sendo dividido seis estágios funcionais.

Fase de função renal normal, sem lesão renal:

Inclui pessoas integrantes dos chamados grupos de risco para o desenvolvimento da doença renal crônica, mas não desenvolveram lesão renal. São eles: hipertensos, diabéticos ou parentes de hipertensos, diabéticos e portadores de DRC.

Fase de lesão com função renal normal:

Corresponde à fase inicial de lesão renal com filtração glomerular preservada, ou seja, o ritmo de filtração glomerular está acima de 90mL/min/1,73m².

Fase de insuficiência renal funcional ou leve:

Ocorre no início da perda da função dos rins. Nesta fase, os níveis de ureia e creatinina plasmáticos são normais, não apresentam sinais e sintomas clínicos relevantes só os somente métodos acurados de avaliação da função renal detectarão anormalidades. Os rins mantêm razoável controle do meio interno e compreendem um ritmo de filtração glomerular de 60 a 89mL/min/1,73m².

Fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada:

Sinais e sintomas de uremia são detectados, mas o paciente mantém-se clinicamente bem. A avaliação laboratorial demonstra níveis plasmáticos elevados de uréia e creatinina. O ritmo de filtração glomerular está compreendido entre 30 e 59 mL/min/1,73m².

Fase de insuficiência renal clínica ou severa

Demonstra sinais de disfunção renal com sinais e sintomas acentuados de uremia. Dentre estes, anemia, hipertensão arterial, edema, fraqueza, mal estar e sintomas digestivos. O ritmo de filtração glomerular está compreendido entre 15 e 29 mL/min/1,73m².

Fase terminal de Insuficiência renal crônica

Nesta fase, o paciente encontra-se intensamente sintomático e os rins perderam o controle do meio interno, tornando-se incompatíveis com a vida. Suas opções terapêuticas são os métodos de depuração do sangue por meio de diálise peritoneal, hemodiálise ou transplante renal. O ritmo de filtração glomerular está compreendido abaixo 15 mL/min/1,73m² (Romão Júnior, 2004; KDIGO,2013).

2.2 TERAPIA RENAL SUBSTITUTIVA

A terapia renal substitutiva visa a remover o excesso de líquidos e de substâncias tóxicas acumuladas no organismo do paciente em função da insuficiência renal. Essas substâncias são provenientes do metabolismo das células e da ingestão de alimentos e líquidos. A diálise não promove o restabelecimento dos rins nem restaura suas funções. É, portanto, uma terapia funcional substitutiva que realiza parcialmente as funções renais, prevenindo prejuízos a outros órgãos (BRASIL, 2010).

Há dois tipos de diálise: a peritoneal e a hemodiálise. A Diálise Peritoneal (DP) é um procedimento de depuração do sangue no qual a transferência de solutos e líquidos ocorre através de uma membrana semipermeável, o peritônio, que separa a cavidade abdominal e a membrana peritoneal, onde se encontram os capilares sanguíneos com excesso de escórias nitrogenadas, potássio e outras substâncias.

O peritônio é uma membrana semipermeável que age como um filtro, pelo processo de osmose. O dialisato é transferido à cavidade peritoneal por meio de um cateter instalado no abdome. Líquidos, resíduos e substâncias químicas que necessitam ser depurados, passam pelo processo de osmose por minúsculos vasos sanguíneos da membrana peritoneal para o dialisato. Depois de algumas horas, o dialisato é escoado do abdome e leva eliminando as toxinas (ureia e sódio) presentes. A seguir, iniciam-se os repetidos ciclos de depuração (BRASIL, 2010).

O processo de hemodiálise, objeto deste estudo, será detalhado a seguir.

2.2.1 Hemodiálise

A HD é o procedimento que filtra o sangue de onde são retiradas as substâncias que, quando em excesso, trazem prejuízos ao corpo, são elas: ureia, creatinina, potássio, sódio e água. A filtração é feita com o auxílio de um dialisador (capilar ou filtro), que é formado por um conjunto de pequenos tubos agrupados em feixes. Estes se comunicam com as "linhas" que são conectadas a um acesso vascular do paciente para hemodiálise. Neste processo, o hemodialisador é banhado por uma solução aquosa denominada dialisato ou fluido de diálise (composto de eletrólitos, bicarbonato e glicose dissolvidos em água purificada), que não entra em contato direto com o sangue, mas troca substâncias através da membrana semipermeável do dialisador. Durante a HD, parte do sangue é retirada do corpo através de uma veia cirurgicamente ligada a uma artéria ou acesso vascular central que passa através da linha em um lado onde o sangue é filtrado e retorna ao paciente pela linha do lado oposto através de uma veia (Fig1). Em um processo contínuo, o sangue passa pelo filtro que retira as toxinas e volta depurado para o organismo. O tratamento da DRC com HD é individualizado, pois a composição do dialisato, a duração da sessão de HD e a frequência variam de acordo com as necessidades e características de cada paciente, baseando-se em avaliações médicas e exames complementares (BRASIL, 2010).

Figura 1: Hemodialisador conectado às linhas de hemodiálise

Fonte: ANVISA- Manual de Tecnovigilância, 2010

2.2.2 Membrana semipermeável

Nas membranas dialisadoras também chamadas capilares, o sangue entra pelo compartimento sanguíneo passando por milhares de capilares agrupados em feixes. O sangue flui por dentro dos capilares e o dialisato circula ao redor pelo lado de fora das fibras. Após a filtragem, o sangue é direcionado a outra extremidade do compartimento sanguíneo e retorna ao paciente, após a filtração. (Van Stone, 2000)

Figura 2. Corte transversal do hemodialisador com múltiplas fibras ocas no interior

Fonte: Própria do autor

2.2.2.1 Características das membranas semipermeáveis

As características da membrana são os mais importantes determinantes do desempenho do dialisador, e estão relacionadas ao tamanho dos poros, espessura da membrana, adsorção de proteínas, área de superfície e espessura da membrana (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung, 2005).

Tamanho dos poros

Uma membrana de dialisador ideal deve assemelhar-se ao glomérulo, no que diz respeito as suas propriedades de filtração e transporte de solutos urêmicos de diferentes pesos moleculares. Além disso, deve evitar a perda de albumina sérica e outras proteínas fisiologicamente benéficas. O tamanho do poro é a mais importante característica da membrana para o controle da transferência de solutos. As membranas de celulose não substituídas possuem poros pequenos o que permitia o transporte apenas de água e de solutos de baixo peso molecular como ureia e creatinina. Solutos com maior peso molecular superiores a 1.000 d. como toxinas urêmicas não possuem uma eficiente remoção. As membranas sintéticas que possuem características seletivas para toxinas urêmicas. Além disso, o tamanho dos poros é também um importante determinante da ultrafiltração de água. As membranas atualmente comercializadas são fabricadas com poros de tamanhos variados de a 0,1 μm a 10 μm (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung, 2005;

Área de superfície do hemodialisador

A área de superfície de um hemodialisador é uma relação entre o comprimento e o diâmetro interno das fibras ocas individuais e o número total de fibras no hemodialisador. Uma das vantagens de fibras de pequenos diâmetros fibras é a diminuição da camada estática de sangue na interface com a membrana, o que por sua vez leva a um aumento na difusão de solutos. No entanto, as fibras de

pequeno diâmetro interno têm a desvantagem de aumentar a resistência do fluxo de sangue, requerendo um aumento da pressão hidrostática para perfundir as fibras. As fibras tem comprimento de 20 a 24 cm e possuem diâmetro entre 180 a 220 μm . Em geral os hemodialisadores possuem 12.000 fibras e uma área de superfície que excede 2m^2 . (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005; Clark, Gao,2001).

Espessura da membrana:

As membranas de celulose possuem de 20 a 40 μm de espessura. As de celulose substituídas são muito mais finas com aproximadamente 8 μm de espessura, permitindo um aumento no transporte de massa. Diferente das membranas de celulose que são simétricas e finas, as membranas sintéticas são assimétricas e possuem uma camada interna que entra em contato com o sangue e uma camada externa que exerce um suporte estrutural para a camada interna. O tamanho dos poros da fibra de suporte é duas ou três vezes maior que a fibra interna. Portanto, a fibra de suporte não é maior barreira para a transferência de soluto (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005)

Densidade dos poros:

A densidade dos poros é um importante determinante do fluxo de água e depuração de solutos. As toxinas urêmicas geralmente são classificadas pelo seu peso molecular. Moléculas de tamanho médio são definidas como toxinas urêmicas com pesos moleculares abaixo do peso molecular da albumina (60.000 daltons-d.). Um importante marcador da presença de moléculas de tamanho médio na depuração de do sangue são as β_2 microglobulinas, com peso molecular de 11.800d (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

. Adsorção de proteínas

Embora muitas toxinas urêmicas e água sejam removidas do sangue pela difusão e convecção, peptídeos e pequenas proteínas

são removidos pela adsorção à superfície da membrana durante a hemodiálise. A adsorção ocorre principalmente dentro das estruturas dos poros quando o sangue entra em contato com a membrana.. Outra característica importante das membranas está relacionada a hidrofobicidade. Quanto maior a hidrofobicidade maior a capacidade de adsorção. O mecanismo de adsorção também é parcialmente responsável pela a prevenção transferência de endotoxinas e substâncias indutoras de citocinas do compartimento do dialisado para o sangue (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005)

Eficiência

Por convenção, o termo eficiência refere-se à capacidade do hemodialisador em remover solutos urêmicos de baixo peso molecular. A uréia é o marcador mais estudado destes solutos. O coeficiente de transferência de massa (KoA) é expresso em mL/ min, para um dado soluto é o resultado é avaliado a partir de um calculo entre o de fluxo de sangue e fluxo de dialisato. Em geral esses valores são fornecidos pelos fabricantes, sendo classificados de alta eficiência ou baixa eficiência. Os classificados como de alta eficiência têm um valor de KoA superior a 600 ml / min, enquanto que uma baixa eficiência tem um valor KoA menor que 450 ml / min. Essas definições são arbitrárias e não foram sancionados por agencias de regulamentação (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005)

Permeabilidade

Por definição, a permeabilidade de uma membrana de dialisador geralmente indica a capacidade da membrana em depurar moléculas de tamanho médio. Deve notar-se que, além do peso molecular a carga e outras propriedades físico-químicas da molécula também determinam a depuração por diferentes tipos de membranas. Membranas de alta permeabilidade têm valores de depuração maior que 20 mL / min β_2 microglobulinas. Em contraste, as de baixa permeabilidade tem valores abaixo de 10mL / min de

depuração de proteínas de peso molecular de tamanho médio (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005)

Ultrafiltração

Refere-se a capacidade de transferência de água através da membrana dialisadora, é expresso em K_{uf} e é calculado em mL/hora/mmHg pela pressão transmembrana. As membranas são classificadas em alto fluxo e baixo fluxo. Alto fluxo tem valores de K_{uf} de 12ml/h/mmHg a 80 ml/h/mmHg, as de baixo fluxo K_{uf} menor que 12ml/h/mmHg (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005; Clark, Gao,2001)

2.2.2.2 Tipos de membrana semipermeável

A composição das membranas que integram o hemodialisador pode ser classificada em três tipos, de acordo com a composição química: membranas de celulose não substituídas, membranas de celulose substituídas e membranas sintéticas (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

Celulose não substituída:

As únicas membranas utilizadas entre os anos 1940 e 1960 eram as de celulose não substituídas. Estas membranas eram produzidas com base na celulose que é um polissacarídeo derivado de algodão prensado, originando o celofane. Membranas de celulose não substituídas têm grupos hidroxilas em seus anéis de glucosano, ao que é atribuída a propensão em ativar o sistema complemento do sistema imunológico quando estas proteínas entram em contato com o sangue. Esta ativação do complemento é parcialmente responsável pela ativação subsequente dos neutrófilos e outros leucócitos, tornando estas membranas bioincompatíveis (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

As membranas de celulose recebem diferentes nomes ,como celulose regenerada, celulose de cupramônio, raio cupramônio e éster de celulose saponificado (Van Stone,2000).

As denominadas cupramônio são produzidas a partir da celulose regenerada e foram amplamente utilizadas na década de 1960 e ainda são usadas em algumas partes do mundo, sobretudo por causa de seu baixo custo. São membranas finas, resistentes e fornecem razoável transporte por difusão de pequenas toxinas urêmicas, como ureia e creatinina. Possuem pequenos tamanhos de poros, o que as torna menos eficazes na remoção de moléculas de maior tamanho (Cheung, Leypoldt,1998; Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

Celulose substituída:

O polímero da celulose apresenta um grande número de grupos hidroxilas livres, e as membranas de acetato de celulose possuem um grande número destes grupos ligados quimicamente ao acetato (Van Stone,2000). A substituição dos grupos hidroxilas superficiais por grupos acetatos diminui a ativação do complemento, aumentando, assim, a biocompatibilidade. As primeiras membranas deste grupo são as de monoacetato, seguidas pelas de diacetato e triacetato, estas últimas possuem mais de 3/4 dos grupos hidroxilas substituídos, tornando ainda menores as chances da ativação do sistema complemento (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

Dentro desta categoria, ainda se encaixam as membranas denominadas celossintéticas: um composto aminoterciário é adicionado à celulose liquefeita durante a formação da membrana. A superfície da membrana é alterada, e a biocompatibilidade aumentada, pois os grupos hidroxilas livres são substituídos por porções de dietilaminoetil. Embora esta substituição seja inferior a 5%, os grupos dietilaminoetis são capazes de mascarar os grupos hidroxilas, assim diminuindo a ativação do sistema complemento. Estas membranas também têm a vantagem de serem hidrofóbicas

em comparação com as membranas de celulose não substituídas, que são hidrofílicas. Mais recentemente, membranas celulósicas com outras substituições foram surgindo, tais como os grupos benzil (Van Stone,2000; Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

Sintéticas:

São fabricadas com substâncias de origem não celulósica que incluem a poliacrilonitrila, polissulfona, policarbonato, poliamida e polimetilmetacrilato (Van Stone,2000).

Possuem elevada permeabilidade e foram desenvolvidas a partir de 1960, essencialmente com o objetivo de hemofiltração. Em comparação com as membranas de celulose, que são finas e simétricas, estas membranas são mais grossas $\geq 20\mu\text{m}$ e podem ser simétricas ou assimétricas (ex:polissulfona). A composição assimétrica das membranas refere-se à estrutura de duas camadas de parede da fibra oca quando vista em secção transversal, com uma fina camada interna que entra em contato com o sangue e desempenha um papel importante na regulação da remoção de soluto e na espessura da camada externa que determina as propriedades térmicas e mecânicas da membrana (Chelamcharla, Leypoldt, Cheung,2005).

Atualmente estas membranas são as mais utilizadas atualmente por permitirem maior biocompatibilidade.

2.3 REPROCESSAMENTO DE HEMODIALISADORES

A RDC ANVISA nº 11/2014 que dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise, define o reuso em HD, como a utilização do hemodialisador por mais de uma vez para o mesmo paciente, após os respectivos processamentos. O processamento em diálise é o conjunto de procedimentos executados, desde a retirada do hemodialisador do

paciente, incluindo a limpeza, verificação da integridade e medição do volume interno das fibras, esterilização, registro, armazenamento e enxague imediato, antes do uso dos hemodialisadores no mesmo paciente (Brasil, 2014).

Com relação aos requisitos de estrutura física, conforme o mesmo regulamento, as salas de processamento de hemodialisadores devem ser exclusivas contíguas às salas de tratamento hemodilítico e possuírem:

- sistema de ventilação e/ou exaustão de ar;
- bancadas específicas para a área de limpeza, constituídas de material resistente e passível de limpeza e desinfecção, abastecidas de água tratada para hemodiálise, com esgotamento individualizado. Cada bancada deve ser dotada de uma cuba profunda de forma a impedir a troca de líquidos entre as cubas;
- bancada específica para a etapa de esterilização do hemodialisador, constituída de material resistente e passível de limpeza e desinfecção;
- dimensionamento da sala adequado à demanda e realização das atividades envolvidas;
- devem ser respeitadas as barreiras técnicas para o fluxo do processamento

Para os serviços de diálise que processam hemodialisadores, sejam por métodos manuais ou automatizados, o seguimento de normas e procedimentos no processamento devem ser criteriosamente obedecidos. É fundamental que o processamento seja realizado por profissional capacitado utilizando-se de Equipamentos Proteção Individual (EPI), em ambiente próprio, especialmente projetado para esta finalidade. Todo o procedimento de processamento deve estar documentado, assim como o cumprimento dos requisitos, conforme os regulamentos técnicos (AAMI, 2008; Brasil 2014).

O processamento automatizado possibilita a reprodutibilidade dos ciclos de limpeza, realização de testes de controle de qualidade para medir a capacidade das fibras, o coeficiente de ultrafiltração e as pressões. Além disso, é possível a impressão de etiquetas para identificação dos hemodialisadores e o registro automatizado dos parâmetros do ciclo. Já o processamento manual é executado sem auxílio de sistemas automatizados, gera uma maior necessidade de manipulação dos hemodialisadores pelo profissional que executa o processamento quando comparado ao método automatizado. Adicionalmente, a reprodutibilidade do processo bem como o controle de qualidade dependerá do seguimento rigoroso do Procedimento Operacional Padrão (POP) pelo profissional executante (Kaufman, Levin, 2000; AAMI2008).

Conforme definido na RDC ANVISA nº 11/2014, o hemodialisador, cujo rótulo não esteja identificado como “proibido reprocessar”, pode ser utilizado para o mesmo paciente no máximo 20 (vinte) vezes, após ser submetido ao processamento automático, observando-se a medida mínima permitida do volume interno das fibras, conhecida como “*priming*”. Não há evidências científicas que embasem esta recomendação correlacionada ao tipo de método de processamento utilizado. Conforme comentado na introdução, possivelmente, o número de reusos foi arbitrado pela impossibilidade dos Serviços de HD atenderem às recomendações do fabricante de uso único dos dispositivos. Ressalta-se que o mercado disponibiliza hemodialisadores em cujo rótulo há orientações de uso único, proibido reprocessar, descartável ou nenhuma recomendação. Muitos termos considerados sinônimos foram utilizados pelos fabricantes de hemodialisadores para configurar como sendo um material cujo processamento é proibido, como uso único, descartável, proibido reprocessar e recomenda-se uso único. Atualmente, conforme a nota técnica da ANVISA nº01/2013 somente os hemodialisadores em cujo rótulo consta a orientação recomenda uso único, poderiam, a rigor da lei, serem reusados. Não foi o que se

constatou nas amostras analisadas pois o fabricante recomenda a destruição após o uso. Independente das indicações do fabricante utilizando expressões variadas, nenhum fabricante assume a segurança do reuso do dispositivo em análise nem tampouco fornece POP para o reuso.

O reuso de hemodialisadores está proibido para pacientes portadores de HIV e pacientes com sorologia positiva para Hepatite B e C (tratados ou não) e pacientes com sorologia desconhecidas para Hepatite B, C e HIV (Brasil,2014). Todos os pacientes, por força regulatória, devem ter seu status sorológico para hepatites B, C e HIV atualizados.

2.3.1 Etapas do processamento de hemodialisadores

As etapas de processamento compreendem:

Pré-Limpeza, limpeza, mensuração do volume interno das fibras, teste de integridade da membrana, armazenamento, preparo para a próxima diálise e testes químicos residuais. O processamento de hemodialisadores deve iniciar com a pré-limpeza executada manualmente, tanto antes do processo manual como automatizado.

Pré-Limpeza: seu objetivo é remover sujidade grosseira de sangue, fibrinas e outros produtos depositados na parede do capilar, por meio do fluxo contínuo de água no compartimento dialisador através da membrana semipermeável (AAMI,2008). Seu objetivo é facilitar as etapas subsequentes do processamento.

Limpeza: A etapa de limpeza, seja por método manual ou automatizado, deve ser realizada meticulosamente, pois é considerada essencial no processamento de materiais, precedendo a etapa de esterilização química (AAMI, 2006; Rutala, Weber, 2008; AORN, 2011). Sem esta etapa não é possível alcançar a consecutiva esterilização pretendida. A presença de resíduos orgânicos, como biofilmes, carga microbiana, endotoxinas e resíduos

inorgânicos compromete a efetividade do processamento, atuando como barreira física, dificultando a ação de agentes esterilizantes e desinfetantes (Rutala, Weber, 2008).

A água utilizada para a limpeza e diluição de agentes de limpeza deve estar de acordo com os requisitos contidos nos regulamentos técnicos, conforme descrito na RDC ANVISA nº 11/2014 (AAMI, 2008). Nesta fase, alguns produtos químicos com a finalidade de limpeza podem ser empregados, por exemplo, hipoclorito de sódio a 1%, uma vez que este dissolve depósitos proteínáceos que podem ocluir as fibras. Outros agentes com a finalidade de limpeza, como peróxido de hidrogênio, ácido peracético são comumente utilizados.

Outro aspecto importante no uso de agentes químicos na fase da limpeza é assegurar o completo enxágue em níveis seguros, para que não causem danos estruturais às fibras capilares, sobretudo quando o agente de limpeza é diferente do agente químico utilizado na esterilização, podendo apresentar incompatibilidade química e produção de resíduos tóxicos desconhecidos (AAMI, 2008).

Teste para mensuração do volume interno das fibras: A medida do volume interno dos capilares (*priming*) é o indicador de superfície efetiva da hemodiálise e deve ser realizado após cada sessão de hemodiálise. Todo hemodialisador independente do número de processamentos deverá ser descartado quando perder 20% da capacidade inicial, pois acima deste valor a depuração de solutos é ineficiente (Miles, Friedman, 1997; Manfredi, Canziani, 2005).

Este parâmetro estabelecido sinaliza que é impossível a remoção total dos componentes orgânicos que impregnam a parede interna dos capilares por meio da limpeza.

As características do hemodialisador podem modificar-se durante o processamento, ocorrendo alteração na capacidade de ultrafiltração que pode estar relacionada ao produto químico usado

ou à presença de coágulos, ocasionando alterações na permeabilidade da membrana. O propósito do teste é verificar indiretamente a capacidade da membrana do hemodialisador ao remover as moléculas de baixo peso, tais como sódio e ureia, avaliando o volume de preenchimento e as fibras capilares viáveis. O valor máximo permitido é $\geq 80\%$ do valor inicial do volume do preenchimento, a redução de 20% do volume interno das fibras corresponde a 10% de redução na depuração de solutos de baixo peso molecular. Além disso, o aspecto do hemodialisador deve ser inspecionado visualmente quanto à limpeza da superfície externa, integridade do hemodialisador e a completa eliminação dos resíduos de sangue. Estes aspectos são fatores determinantes para o descarte do produto (AAMI, 2008).

Teste de integridade de membrana: é recomendável um teste de integridade de membrana utilizando-se ar pressurizado (AAMI,2008).

Um gradiente de pressão positiva ou negativa, é gerado através da membrana semipermeável do hemodialisador, e a queda da pressão gerada inicialmente é mensurada. O gradiente de pressão pode ser gerado por meio da pressurização de ar comprimido ou nitrogênio a uma pressão 20%, abaixo da pressão máxima de operação no compartimento de sangue ou também pode ser realizada uma pressão negativa no compartimento do dialisato de 250 mm/Hg durante 30 segundos. Uma alteração na pressão menor que 0,83mm/hg indica a preservação da integridade da membrana. Para membranas de alto fluxo, uma variação na pressão de até 1,25 mm/Hg é aceitável (Miles, Friedman,1997). Algumas máquinas reprocessadoras realizam este teste, submetendo o compartimento de dialisato à pressão negativa de 250 mmHg, enquanto o compartimento de sangue permanece à pressão atmosférica. A análise é feita pela perda de pressão, variando de

acordo com o tipo de hemodialisador processado (alto ou baixo fluxo).

Esterilização: A esterilização é o processo que utiliza agentes químicos, físicos ou físico-químicos para destruir todas as formas de vida microbiana (Padoveze, Graziano, 2011). Produtos para saúde classificados, como críticos, são os que entram em contato com tecidos estéreis ou sistema vascular e devem ser esterilizados, pois seu uso predispõe um alto risco para o desenvolvimento de infecção, caso estejam contaminados com algum microrganismo (Rutala, Weber, 2008).

Os hemodialisadores, após a utilização, são submetidos ao processo de esterilização química líquida, subsequentemente, à limpeza. A RDC ANVISA nº31/2011, trata da indicação de uso dos produtos saneantes na categoria "Esterilizante" para máquinas e equipamentos para hemodiálise, sendo os únicos dispositivos que estão autorizados à esterilização química líquida no território nacional (Brasil, 2011).

O conjunto dialisador deve ser preenchido completamente com soluções esterilizantes químicas líquidas. O uso de esterilizantes, registrados nos órgãos competentes, é fundamental em concentrações adequadas, mantendo o tempo de exposição mínima ao agente químico, conforme recomendação do fabricante. Deve-se observar a data de validade do produto, bem como data de validade após a ativação da solução (Manfredi, Canziani, 2005; AAMI, 2008).

Neste aspecto, é importante observar que o volume de água proveniente do enxague seja completamente escoado, a fim de não rediluir a concentração do germicida.

Armazenamento: Os hemodialisadores, após serem submetidos a todas as etapas de processamento e inspeção, devem ser armazenados em caixas plásticas fechadas, previamente limpas e desinfetadas, a fim de evitar recontaminação até o próximo uso.

(Manfredi, Canziani, 2005). O período máximo para acondicionamento foi arbitrado em um mês, e se não utilizados dentro desse período, deverão ser descartados ou reprocessados (AAMI,2008).

Preparo para próxima diálise e testes químicos residuais:

O preparo para a próxima HD deve acontecer no máximo até 2 horas antes do início da sessão de HD. O hemodialisador deve passar por inspeção visual, a fim de verificar: a identificação de rótulo, a integridade estrutural, as conexões devidamente tampadas, o completo preenchimento com solução esterilizante, tempo mínimo de exposição ao agente químico esterilizante, as condições de armazenamento apropriadas e o aspecto do hemodialisador. O hemodialisador deve ser enxaguado na própria máquina para hemodiálise, preenchido com solução salina e solução de dialisato de acordo com procedimentos operacionais estabelecidos. A verificação do volume residual do desinfetante deve ser realizada com o emprego de testes específicos, conforme o esterilizante químico utilizado, devendo estar abaixo dos parâmetros máximos estabelecidos (AAMI, 2008).

Pré Limpeza de Hemodialisadores (Processamento Manual e Automatizado):

Ocorre a aplicação de fluxo de água tratada por osmose reversa (AAMI, 2008) durante aproximadamente 5 minutos. Este fluxo é obtido pela conexão do compartimento de sangue ao fluxo de água tratada por osmose reversa, conforme ilustra a **Figura 3**. Após a eliminação de maior parte da sujidade grosseira, os hemodialisadores passam por um processo de ultrafiltração reversa, que consiste na aplicação de água com fluxo inverso ao da filtração do sangue, do compartimento do dialisato para o compartimento sanguíneo, tampando a outra extremidade de saída do compartimento do dialisato e submetendo à pressão de água, conforme ilustra a **Figura 4**. Este procedimento tem o objetivo de

remoção máxima possível de partículas de sangue e fibrina depositadas na parede do capilar. Novo enxágue do compartimento de sangue deve ocorrer ao final da desse procedimento, para eliminação máxima possível das partículas depositadas na parede interna do capilar (Manfredi, Canziani, 2005; AAMI, 2008).

Figura 3- Fluxo de água passando pelo compartimento do sangue

Fonte: Própria do autor

Figura 4– Fluxo de água pressurizada conectado ao compartimento do dialisato

Fonte: Própria do autor

Método de Processamento Automatizado de hemodialisadores nos serviços doadores :

O hemodialisador é acoplado à máquina processadora, sendo submetido a um fluxo de solução limpadora com ácido peracético a 0,05% para a remoção dos resíduos que, eventualmente, permaneceram no interior das câmaras. Ao final desse processo, a máquina inicia o teste do volume celular total das fibras hemodialisadoras (*Priming*). Se o preenchimento obtido for menor que 80% do volume inicial informado, a processadora não passará à

etapa seguinte, sendo o hemodialisador reprovado para o próximo uso. Em seguida, ocorre o teste de integridade das fibras com o objetivo de verificar a ocorrência de fibras rompidas. O compartimento de dialisato é submetido à pressão negativa de 250 mmHg, enquanto o compartimento de sangue permanece à pressão atmosférica. A análise é feita pela perda de pressão, caso seja evidenciado uma perda de pressão igual ou maior do que 0,83 mmHg, o hemodialisador deverá ser descartado. Após a aprovação no teste de integridade de membrana, ocorre a injeção de ácido peracético a 0,2% nos compartimentos de sangue e dialisato até o completo preenchimento das câmaras, as saídas são vedadas com tampas próprias e acondicionados em caixas plásticas, tampadas em temperatura ambiente, até o preparo para a próxima hemodiálise.

Antes do início da próxima HD, ocorre o enxágue das câmaras internas e externas na própria máquina hemodialisadora; ao final deste processo, realiza-se o teste para verificação residual de ácido peracético, por meio de um reagente colorimétrico qualitativo à base de sal de titânio e ácido sulfúrico. Este produto ao reagir com ácido peracético > 1ppm apresenta uma cor amarelo clara.

Método de Processamento Manual de Hemodialisadores dos serviços doadores:

Ocorre a reaplicação de fluxo contínuo de água tratada por osmose reversa para hemodiálise no compartimento de sangue e dialisato, até a completa remoção de sujidade. Em seguida o teste para verificação do preenchimento das fibras é realizado. O compartimento de sangue é preenchido com água tratada por osmose reversa, para hemodiálise em um medidor graduado é verificado capacidade do seu preenchimento sendo valores aceitáveis até 20% menor que a capacidade inicial. Em seguida, com auxílio de uma bomba peristáltica, os compartimentos de

sangue e dialisato são preenchidos com solução de ácido peracético a 0,2%. Neste processo manual, fica a cargo do profissional responsável pelo processamento a remoção de eventuais bolhas de ar que se formam no interior dos compartimentos, pois, caso haja contato insuficiente com o agente químico o processo de esterilização poderá ser ineficaz. Antes do início da próxima HD, ocorre o enxágue das câmaras internas e externas na própria máquina hemodialisadora e, ao final deste processo, realiza-se o teste para verificação residual de ácido peracético, por meio de um reagente colorimétrico qualitativo à base de sal de titânio e ácido sulfúrico. Este produto ao reagir com o ácido peracético > 1ppm apresenta uma cor amarelo clara.

2.3.2 Germicidas utilizados no processamento de hemodialisadores

Ao longo dos anos, os programas de reutilização norte-americanos de hemodialisadores empregaram diferentes germicidas entre eles: quaternário de amônia, formaldeído, glutaraldeído, ácido peracético e termodesinfecção com ou sem o uso de ácido cítrico (AAMI,2008). Em 2002, nos EUA, 20% dos centros de HD que praticavam o reuso utilizavam formaldeído,72% ácido Peracético ,4% glutaraldeído e 4% termodesinfecção a 85°C (Twardiwsju,2006)

Não há registros sobre os esterilizantes químicos mais empregados no processamento de hemodialisadores em território nacional.

Nos centros onde foram coletadas as amostras o ácido peracético é usado como esterilizante químico:

Ácido Peracético:

É um desinfetante esterilizante com largo espectro de ação antimicrobiana. O ácido peracético (APA) é representado pela fórmula química $\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$ e, comercialmente, disponível como um

composto contendo ácido acético, peróxido de hidrogênio e água (Kitis, 2004).

O APA é um líquido claro, incolor, de odor forte e pungente, semelhante ao vinagre e solúvel em água.

É considerado instável, uma solução a 40% perde de 1% a 2% de seus compostos ativos por mês. Soluções mais diluídas são ainda mais instáveis: uma solução diluída a 1% perde metade de seus compostos ativos pelo mecanismo de hidrólise num período de 6 dias (Kitis, 2004). O APA é decomposto em ácido acético, peróxido de hidrogênio e água. Existem três reações onde o APA é degradado em solução aquosa: decomposição espontânea, hidrólise e decomposição por catalisação.

Caracteriza-se por rápida ação microbicida e age pela desnaturação de proteínas, ruptura de parede celular e oxidação de proteínas, enzimas e outros metabólitos. Destrói bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos em 5 minutos na concentração de 100 ppm e ausência de matéria orgânica. Em concentração de 500ppm apresenta ação mesmo na presença de matéria orgânica. Para a ação contra vírus, a concentração deve ser entre 1.500 e 2.250 ppm. Contra micobactérias atua em concentração 2.600 ppm por um tempo de 20 a 30 minutos e tem ação esporicida em uma concentração a 10.000 ppm em até 30 minutos (Rutala, Weber, 2008; Psaltikidis, 2011).

Formaldeído:

A atividade germicida do formaldeído deve-se à alquilação de radicais amino e grupos sulfidril de proteínas e ácidos nucleicos microbianos (Rutala, 2008). As soluções com formaldeído têm ação de desinfecção de alto nível em 30 minutos de contato e ação esterilizante em 18 horas (Psaltikidis, 2011). A concentração letal para a maioria dos vírus é de 2% em solução aquosa, para micobactérias a concentração ideal é de 4%, e a ação esporicida se dá também a uma concentração de 4% (Rutala, Weber, 2008).

Glutaraldeído:

Apresenta amplo espectro de ação com desinfetante de alto nível e esterilizante. O modo de ação ocorre pela alquilação dos radicais sulfidril, hidroxil e carboxil e do grupo amino dos microrganismos, alterando DNA, RNA e a síntese proteica. Em concentração alcalina a 2%, tem ação contra bactérias vegetativas em 2 minutos, elimina *Mycobacterium tuberculosis*, fungos e vírus em 10 minutos e para esporos uma exposição de 3 horas. Em função da resistência de alguns microrganismos (*Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium mesophilicum*, *Trichosporon* e *Mycobacterium massiliense* que possui resistência intrínseca ao glutaraldeído), foi indicado um aumento do tempo de exposição para 8 a 12 horas (Rutala, Weber 2008; Psaltikidis, 2011).

2.3.3 Qualidade da água com enfoque no processamento

A água é um componente presente em todas as etapas do processamento, sendo consumidos cerca de 15 litros por hemodialisador durante um ciclo de processamento. O controle de qualidade da água é muito importante, pois pode comprometer a qualidade do processamento dos hemodialisadores, levando à transmissão de agentes infecciosos e endotoxinas a um grande número de pacientes simultaneamente (Manfredi, Canziani, 2005).

O sistema de distribuição de água tratada para hemodiálise exige cuidados específicos, como manutenção e desinfecção do periodicamente, pois, em razão da água não ser estéril pode abrigar uma ampla variedade de microrganismos Gram-negativos, micobactérias e fungos e transformarem-se em riscos aos pacientes. Os microrganismos Gram-negativos podem desenvolver-se em ambientes pobres em nutrientes (Favero, 1975).

No Brasil, um caso de muita notoriedade foi um surto ocorrido, em 1996 em Caruaru-Ce. A qualidade da água estava comprometida pela contaminação com cianobactérias, acarretando a morte de 48 pacientes por falência hepática. Este surto poderia ter sido evitado com o adequado tratamento da água, tanto do município como da unidade de diálise (Arduino,2000).

Conforme as recomendações da RDC ANVISA nº 11/2014, a água de abastecimento dos serviços de diálise provenientes de rede pública, de poços artesianos ou mananciais deve ter seu padrão de potabilidade em conformidade com a Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 ou instrumento legal que venha a substituí-la. A Portaria MS nº 2.914/2011 dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, conforme os dados do **Quadro 1**.

Quadro 1 - Características físicas e organolépticas da água potável

Parâmetro/ CAS(1)	Valor Máximo Permitido(VPM)
Alumínio (7429-90-5)	0,2 mg/L
Amônia (como NH ₃) 7664-41-7	1,5mg/L
Cloreto (16887-00-6)	250mg/L
Cor Aparente (2)	15 uH
1,2 diclorobenzeno (95-50-1)	0,01 mg/L
1,4 diclorobenzeno (106-46-7)	0,03 mg/L
Dureza total	500mg/L
Etilbenzeno (100-41-4)	0,2 mg/L
Ferro (7439-89-6)	0,3 mg/L
Gosto e odor (3)	Intensidade 6
Manganês(7439-96-5)	0,1 mg/L
Monoclorobenzeno (108-90-7)	0,12 mg/L
Sódio(7440-23-5)	200 mg/L
Sólidos dissolvidos totais	1000 mg/L
Sulfato (14808-79-8)	250 mg/L
Sulfeto de hidrogênio (7783-06-4)	0,1 mg/L
Surfactantes (como LAS	0,5 mg/L
To l u e n o (108-88-3)	0,17 mg/L
Turbidez (4)	uT 5
Zinco (7440-66-6)	5 mg/L
Xilenos (1330-20-7)	0,3 mg/L

Fonte: Portaria MS nº 2914/2011

- (1) CAS é o número de referência de compostos e substâncias químicas adotado pelo Chemical Abstract Service
(2) Unidade Hazen (mgPt-Co/L).
(3) Intensidade máxima de percepção para qualquer característica de gosto e odor com exceção do cloro livre, nesse caso por ser uma característica desejável em água tratada.
(4) Unidade de turbidez.

De acordo com a RDC ANVISA nº 11/2014, a frequência de verificação da cor, turbidez, sabor, odor, cloro residual livre e pH deve ser diária. A qualidade da água de abastecimento deve ser inspecionada por profissional técnico responsável pela operação, com capacitação específica para esta atividade, atestada por certificado de treinamento. As amostras de água devem ser coletadas na entrada do reservatório e na entrada do pré-tratamento do sistema de água do serviço (Brasil, 2014).

O sistema de água tratada que abastece os serviços de HD, inclusive a sala de processamento, deve estar em conformidade com a RDC nº ANVISA 33/2008, que estabelece os requisitos para planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação dos sistemas de tratamento e distribuição de água para hemodiálise. Os reservatórios de água tratada para a hemodiálise devem ter as seguintes características, conforme recomenda a RDC ANVISA nº 11/2014:

- devem ser constituídos de material opaco, liso, resistente, impermeável, inerte e isento de amianto;
- possuir sistema de fechamento hermético que impeça contaminações provenientes do exterior;
- permitir o acesso para inspeção, limpeza e desinfecção;
- possuir sistema automático de controle da entrada da água e filtro de nível bacteriológico no sistema de suspiro;
- ser dotado de sistema de recirculação contínua de água 24 horas por dia, 7 dias por semana e a uma velocidade que garanta regime turbulento de vazão no retorno do *loop* de distribuição ao tanque fechado e de fundo cônico;
- estar protegido da incidência direta da luz solar;e

- possuir, em sua parte inferior, canalização de drenagem que possibilite o esgotamento total da água.

Os dados do **Quadro 2** apresentam o padrão de água usada no preparo da diálise.

Quadro 2 - Padrão de água tratada utilizada na preparação de solução para diálise

Componentes	Valor máximo permitido	Frequência de Análise
Coliforme Total	Ausência em 100 mL	Mensal
Bactérias heterotróficas	100 UFC/mL	Mensal
Endotoxinas	0,25 EU/mL	Mensal
Nitrato(NO ₃)	2mg/L	Semestral
Alumínio	0,01 mg/L	Semestral
Arsênico	0,005mg/L	Semestral
Cloro total	0,01 mg/L	Semestral
Cobre	0,1 mg/L	Semestral
Fluoreto	0,2 mg/l	Semestral
Sódio	70 mg/L	Semestral
Cálcio	2mg/L	Semestral
Magnésio	4mg/L	Semestral
Potássio	8mg/L	Semestral
Bário	0,1 mg/L	Semestral
Zinco	0,1 mg/L	Semestral
Sulfato	100mg/L	Semestral
Chumbo	0,005 mg/L	Semestral
Prata	0,005 mg/l	Semestral
Cádmio	0,001 mg/L	Semestral
Cromo	0,014 mg/L	Semestral
Selênio	0,09 mg/L	Semestral
Mercúrio	0,0002 mg/L	Semestral
Berílio	0,0004 mg/L	Semestral
Tálio	0,002 mg/L	Semestral
Antimônio	0,006 mg/L	Semestral

Fonte: RDC ANVISA nº 11/2014

A qualidade bacteriológica da água deve ser verificada toda vez que houver manifestações pirogênicas ou suspeitas de sepse nos pacientes. O nível de ação para bactérias heterotróficas é de 50 UFC/mL, ou seja, indica a necessidade de adoção de providências para identificação do foco de contaminação (Brasil, 2014).

A fim de se obter as características recomendadas é necessária a instalação de um sistema de tratamento de água exclusivo para diálise. No Brasil, a maioria dos sistemas de tratamento é por osmose reversa (Montanari et al.,2009).

No sistema de tratamento de água por osmose reversa, em razão da ausência de cloro ocorre uma maior susceptibilidade a contaminação da água. Em geral, pode ser contaminada por bactérias Gram-negativas fermentadoras e não fermentadoras, micobactérias não tuberculosas, além de produtos bacterianos, como endotoxinas e biofilmes (Menezes, Santana, Camargo,2005).

O processo de tratamento por osmose reversa inicia-se na captação de água do sistema de abastecimento e passa por diversas etapas. Inicialmente, a água é submetida a um processo de filtração através de filtros de areia onde são removidas grandes partículas (5 - 500µm); filtros deionizadores são empregados na sequência removendo eletrólitos indesejáveis. A próxima etapa de filtração é pelo emprego de carvão ativado que é importante para remoção do cloro e de outros componentes orgânicos ,e por último, ocorre a filtração por meio de membranas semipermeáveis, em formato de espirais ou rocambole, denominadas osmose reversa que são fundamentais para a retenção de 99% de sais orgânicos, microrganismos e endotoxinas (Menezes, Santana, Camargo, 2005; Ribeiro,2010).

Após esse processo, a água é armazenada em tanques para posterior distribuição às máquinas dialisadoras e unidades de processamento de dialisadores.

Figura 5: Esquema ilustrativo de filtração de Água por Osmose reversa

Fonte: Montanari et al.,2009

Todo o sistema de abastecimento de água de diálise deve obedecer a um plano de manutenção, conforme preconizado na RDC ANVISA nº11/2014

Os dados do **Quadro 3** refere-se a periodicidade de manutenção do sistema de água tratada para HD.

Quadro 3 - Procedimento de manutenção do sistema de armazenamento de água.

Procedimento de manutenção do sistema de armazenamento de água	Frequência dos procedimentos
Limpeza do reservatório de água potável	Semestral
Controle bacteriológico do reservatório de água potável	Mensal
Limpeza e desinfecção do reservatório e da rede de distribuição de água tratada para diálise	Mensal

Fonte: RDC ANVISA nº11/2014

2.4 BIOFILME

2.4.1 Formação, crescimento, desenvolvimento e riscos para infecção ocasionados pelo biofilme

O mecanismo de formação, desenvolvimento e crescimento de biofilmes, vem sendo estudado ao longo dos últimos 30 anos. As primeiras publicações datam de 1978 e descrevem o comportamento da maioria das bactérias encapsuladas em uma matriz de biofilme aderida à superfícies dos ambientes aquáticos ricos em nutrientes e demonstraram que bactérias na forma séssil diferem em muitos aspectos da forma planctônica (Donlan, 2002).

Os biofilmes são definidos, como uma comunidade caracterizada pela presença de células sésseis, envoltas em uma matriz extracelular polimérica e estão fortemente aderidas a um substrato, a uma interface ou umas às outras e exibem uma alteração fenotípica em relação à taxa de crescimento e transcrição genética (Donlan, Costerton, 2002).

Os biofilmes podem formar-se em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, sistemas de água e dispositivos utilizados na assistência à saúde (Donlan, 2002). Vem sendo detectados em diferentes produtos, como cateteres vasculares, cateteres urinários, dispositivos intrauterinos, próteses de valvas cardíacas, lentes de contato, próteses articulares, dentre outros (Donlan, 2001; Donlan, 2002).

Os biofilmes exercem um grande problema de saúde pública, pois os microrganismos neles contidos desenvolvem mecanismos de resistência à terapia antimicrobiana. Estes mecanismos de resistência podem ser intrínsecos correlacionados ao próprio desenvolvimento dos microrganismos no interior dos biofilmes ou adquiridos em razão da transferência de genes de resistência entre os microrganismos no interior do biofilme (Donlan, 2001). Além

disso, os microrganismos na forma sésil liberam antígenos que estimulam a produção de anticorpos em que fagócitos são atraídos para os biofilmes, mas não são eficientes para a fagocitose dos microrganismos contidos no biofilme, mesmo assim liberam enzimas fagocitárias que causam prejuízo às células ao redor do biofilme. Neste momento as bactérias são liberadas do biofilme, podendo causar disseminação e infecção nos tecidos próximos (Costerton, Stewart, Greenberg, 1999).

As etapas de formação de biofilmes em superfícies de produtos para a saúde, assim como em outras superfícies ocorrem em uma sequência de eventos: aderência inicial a um substrato, multiplicação microbiana, produção de matriz de substâncias poliméricas extracelulares e desprendimento das células sésseis, ocasionando a formação de novos biofilmes em outros locais ou causando infecção no hospedeiro (Santos, Watanabe, Andrade, 2011). Em ambientes com presença de fluidos, como por exemplo urina, saliva e sangue, ocorre a adsorção de uma fina camada de moléculas orgânicas, denominada filme condicionante. O transporte de microrganismos à superfície do substrato é a segunda etapa no processo de formação do biofilme. O mecanismo de transporte de microrganismos depende das condições do meio (estáticos ou dinâmicos) incluindo movimento Browniano, gravitação, difusão, convecção ou motilidade. Alternativamente, alguns microrganismos podem ser transportados por coagregação, por meio da aproximação entre eles (Bos, Van der Mei, Busscher, 1999). Subsequente acontece adesão inicialmente reversível e com o tempo torna-se irreversível, iniciando a produção de substância extracelular polimérica (Bos, Van der Mei, Busscher, 1999; Donlan, 2002; Roberts, 2010). A adesão a superfícies pode ser influenciada pelas condições do meio, assim como por coinfeções causadas por outros patógenos (Auler et al., 2010).

A adesão microbiana a superfícies inertes ou a outras células microbianas sofre influência das interações de forças moleculares.

Quando os microrganismos atingem uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre forças atrativas e repulsivas (ex: interações eletrostáticas, forças de Van der Waals e interações ácido-base) geradas entre as duas superfícies (Bos, Van der Mei, Busscher, 1999). Além das características da superfície, outro fator de grande importância na adesão microbiana são as características próprias dos microrganismos, como por exemplo, presença de flagelos, fimbrias, pili ou glicocálix que impactam na taxa de adesão microbiana, pois uma vez atraídas para a superfície necessitam vencer as forças repulsivas e estas estruturas são consideradas como facilitadoras dos mecanismos de adesão (Donlan, 2001).

Os biofilmes são compostos primordialmente por células microbianas e substância extracelular polimérica (EPS). De todo o carbono orgânico contido no biofilme, 50% a 90% encontram-se na matriz. O EPS varia em sua composição química, mas consiste primordialmente de polissacarídeos. A matriz é altamente hidratada, viscosa, hidrofóbica e atua como barreira para a difusão de nutrientes e outros componentes químicos, como antibióticos (Donlan, 2002).

Os microrganismos associados a biofilme crescem mais lentamente do que as células planctônicas e podem se desprender do biofilme levando ao desenvolvimento de infecção, dependendo das condições do hospedeiro. A dispersão das células contidas no biofilme ou parte da estrutura do biofilme pode ser considerada um processo ativo e permite a colonização de outros tecidos. A estrutura do biofilme oferece um grau de proteção às células microbianas. Microambientes locais dentro de biofilmes pode ser notavelmente heterogêneos favorecendo a limitação de nutrientes, inconstante fluxo de fluidos, diferenças de temperatura e pH. Sendo assim, a formação de biofilme representa uma estratégia de sobrevivência onde os microrganismos, incluindo os patógenos, estabelecem um

equilíbrio dinâmico, amadurecendo, desprendendo-se e colonizando outras superfícies (Hall-Stoodley, Stoodley, 2005).

2.4.2- Resistência dos Biofilmes aos Biocidas

As infecções relacionadas à presença de biofilme constituem-se um grave problema de saúde pública, em razão da resistência a antimicrobianos. Populações planctônicas são de 100 a 1000 vezes mais susceptíveis a antimicrobianos em comparação à população de biofilmes (Gilbert Mc, Bain, 2001).

Existem algumas razões que explicam a resistência a antimicrobianos:

Os antimicrobianos e biocidas devem passar através da matriz de substância extracelular polimérica para ter contato com os microrganismos contidos no biofilme e inativá-los. A justaposição das células no interior da matriz aniônica do biofilme, composto por polímeros extracelulares e incorporando enzimas extracelulares, estabelece uma barreira de reação e difusão resultando em baixa penetração dos antibióticos catiônicos e nutrientes. As substâncias extracelulares poliméricas podem retardar essa difusão por estabelecerem reações químicas ou limitarem a difusão aos antimicrobianos e agentes químicos (Gilbert Mc, Bain, 2001; Lewis, 2001). A penetração limitada de drogas no interior do biofilme pode ser explicada devido à ocorrência de inativação do agente pelo glicocálix, ocorrendo interações entre o glicocálix aniônico e as substâncias químicas catiônicas. A habilidade do glicocálix em inativar estas substâncias aumenta significativamente em função da deposição de enzimas com atividades antimicrobianas, como enzimas β lactamase, formaldeídeses, formaldeído-hidrogenase (Gilbert Mc, Bain, 2001).

As células mais profundas no interior do biofilme não só são expostas a baixas concentrações de antibióticos/germicidas químicos como também são severamente limitadas de nutrientes e oxigênio. Esse estado metabólico das células influencia na taxa de absorção dos antibióticos e mecanismos cinéticos. Como resultado, estas células expressam fenótipos com reduzida sensibilidade. Específicos mecanismos relacionados à resistência incluem a expressão de bombas de efluxo e aumento na síntese de exopolímeros. OS microrganismos, com baixas taxas de crescimento sendo expostos a doses subletais, sobreviverão e expressarão fenótipos e genótipos com menor susceptibilidade a antimicrobianos e biocidas. Sendo assim, a susceptibilidade das células microbianas reflete seu estado fisiológico. Desse modo, dentro do biofilme há uma heterogeneidade fenotípica que assegura que haverá uma infinidade de fenótipos, com base na população pode ser selecionada (Gilbert Mc , Bain, 2001).

As estruturas que envolvem as células fazem a função de proteção, podendo haver neste caso, principalmente pelo íntimo contato entre as diferentes células uma transferência de plasmídeos. A transferência de plasmídeos também pode ocorrer por forças de cisalhamento que danificam as estruturas das células e facilitam a conjugação de plasmídeos (Donlan, 2001).

Um estudo que avaliou o efeito dos desinfetantes no interior de tubos de Polivinilcloride (PVC), similares aos utilizados em procedimentos de HD, realizou a contaminação de seu interior com água contaminada contendo 10^2 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *P. aeruginosa* e 10^2 UFC de *P.pickettii*, permanecendo por 8 semanas em contato com os tubos. Utilizando-se do método de microscopia eletrônica de varredura, observou-se o desenvolvimento de colônias, bem como estruturas organizadas envoltas em material extracelular, sugestivo de biofilmes. Após esse período, os tubos foram esvaziados e preenchidos com soluções desinfetantes, entre eles: desinfetantes iodóforos, fenólicos, quaternário de amônia , iodóforo na apresentação antisséptica, glutaraldeído a 2%,

hipoclorito de sódio, formaldeído e álcool etílico a 70%, permanecendo por 7 dias. Durante o experimento, foram coletadas alíquotas das amostras com desinfetantes/antissépticos havendo recuperação *P.aeruginosa* nos tubos de PVC correspondentes a desinfetantes iodóforos e fenólicos, além de iodóforo na apresentação antisséptica. Após esta etapa, os mesmo tubos foram esvaziados e preenchidos com água estéril com o objetivo de avaliar o reestabelecimento de colônias microbianas (após a exposição por período prolongado a agentes químicos). Houve recuperação de *P.aeruginosa* em cinco tubos de PVC (desinfetantes iodóforos e fenólicos, iodóforo antisséptico, quaternário de amônia e hipoclorito de sódio) e de *P. pickettii* em três tubos de PVC (desinfetantes iodóforos, álcool etílico 70% e hipoclorito de sódio). Isto é uma forte evidência de que estes microrganismos sobreviveram dentro dos tubos de PVC resistindo à ação de agentes químicos. A matriz extracelular que se formou na superfície dos tubos de PVC, provavelmente, tenha protegido os microrganismos da ação dos agentes químicos, sendo o tubo de PVC um contínuo reservatório microbiano (Anderson et al.,1990).

Em outro estudo onde o objetivo foi avaliar a eficácia de desinfetantes à base de peróxido de hidrogênio e ácido peracético, também utilizado como desinfetante para hemodialisadores, provocou-se a formação de biofilme em corpos de prova de aço inoxidável, utilizando os seguintes microrganismos: *Listeria innocua*, *Pseudomonas putida*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus hominis*. A concentração de desinfetante a 0,5% durante um tempo de exposição de 10 minutos, conforme recomendação do fabricante, foi ineficaz para inativar os microrganismos contidos no biofilme, houve redução de um a dois logaritmos (log). A média de UFC alcançada no interior dos biofilmes foi de 6,68 log ufc/cm² - *M.luteus*, 6,56 log UFC /cm² - *P. putida*, 6,13 log UFC /cm² - *S.hominis*, 5,87 log UFC /cm² - *L.innocua*. O aumento da concentração para 1% durante 30 minutos resultou na redução de cinco logaritmos, não sendo

suficiente para inativar a maioria dos microrganismos presentes no biofilme (Króslasik et al., 2010)

2.4.3 Quorum Sensing

Microrganismos podem comunicar-se por meio da produção de moléculas sinalizadoras difusíveis denominadas autoindutoras. Estas moléculas podem ser produzidas em níveis basais e acumularem-se durante o crescimento. Quando uma concentração crítica é alcançada os autoindutores podem ligar-se a receptores no interior dos microrganismos e ativar comportamentos em função das condições encontradas. Quando a população encontra-se no meio da fase logarítmica ou no início da fase estacionária de crescimento, a quantidade de autoindutor produzido alcança uma concentração limite, suficiente para disparar o processo de alteração da expressão gênica. O fenômeno é denominado *Quorum Sensing* (QS) em razão do controle do gene de expressão dos autoindutores ser densidade celular dependente (Antunes et al., 2010).

Primeiramente este fenômeno foi descrito baseado na observação do comportamento de bactérias marinhas que apresentavam luminescência, a *Vibrio fischeri*. Atualmente, este comportamento tem sido reconhecido em diversos microrganismos e, especialmente, relacionado à virulência dos microrganismos (Antunes et al., 2010).

Os mecanismos de QS podem ser divididos em duas classes: LuxI/ LuxR para as bactérias Gram-negativas e oligopeptídeos (2 componentes) em bactérias Gram-positivas. Em bactérias Gram-negativas, a proteína LuxI é a enzima responsável pela produção de autoindutores do tipo N-acil homoserina lactonas (AHL). Cada espécie de Gram-negativos produz uma única combinação de AHL, ou seja, somente microrganismos da mesma espécie reconhecem e respondem à sinalização. A detecção de AHL e a subsequente alteração do gene de expressão é mediada pela proteína LuxR. A partir da síntese de

AHL, moléculas autoindutoras difundem-se livremente para dentro e para fora das células, sendo a concentração de AHL equivalente no meio externo e no meio interno (citoplasma), aumentando com o aumento da densidade celular. Quando uma concentração crítica de AHL é alcançada, os autoindutores ligam-se à proteína LuxR citoplasmática, ativando elementos transcrpcionais de genes específicos que controlam a produção dos genes de virulência, como enzimas extracelulares e lisinas que são importantes na patogênese infecciosa (Federle;Bassler,2003; HØiby et al.,2011).

Normalmente, em microrganismos Gram-positivos, os oligopetídeos funcionam como autoindutores, também conhecidos como peptídeos autoindutores (PIA). A membrana da célula Gram-positiva não é permeável ao PIA, sendo necessário um oligopetideo de transporte para facilitar a secreção de PIA para o meio extracelular. A detecção de PIA é mediada por sistemas sensoriais de transdução. Estes dois sistemas funcionam com uma reação de fosforilação em cascata envolvendo um sensor quinase e um par de reguladores de resposta (Federle, Bassler, 2003).

O QS vem sendo estudado como influente no comportamento dos microrganismos no interior do biofilme, e a inibição dos mecanismos bacterianos de QS sugere medidas de controle na formação de biofilmes ou, até mesmo, no desenvolvimento de fármacos mais eficazes no tratamento dos microrganismos resistentes (Donlan, 2002; HØiby et al.,2011).

3.

Objetivo

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o tipo de contaminação microbiana presente nos hemodialisadores após o número máximo de reusos permitidos comparando o processamento manual e automatizado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o crescimento microbiano identificando os microrganismos dos hemodialisadores processados manualmente após o 12º reuso.

Avaliar o crescimento microbiano identificando os microrganismos dos hemodialisadores processados por método automatizado após o 20º reuso.

Comparar o crescimento microbiano dos hemodialisadores reprocessados, conforme os métodos empregados: manual e automatizado.

4.

Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa caracterizou-se como um estudo de campo, transversal, de caráter exploratório comparativo.

4.2 LOCAIS DE ESTUDO

Coleta de Dados

- Centro de Diálise do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU), onde o processamento manual é praticado
- Unidade de diálise Fundação Osvaldo Ramos, onde o processamento automatizado é praticado

Preparo e análise das amostras

- Laboratório de Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foram preparadas e incubadas as amostras.
- Laboratório de Microbiologia do Serviço de Infecção Hospitalar da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo da Faculdade de Ciências Médicas, onde foram realizadas a identificação microbiana a partir das amostras.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS HEMODIALISADORES PARA ANÁLISE

4.3.1 Critérios de Inclusão

Hemodialisadores processados no 12º reuso por método manual (último uso).

Hemodialisadores processados no 20º reuso por método automatizado (último uso).

4.3.2 Critérios de Exclusão

Hemodialisadores utilizados por pacientes portadores de HIV, Hepatite B e C, pois pela legislação atual (RDC ANVISA nº 11/2014) é proibido reprocessar.

4.4 COLETA DE DADOS

4.4.1 Material

O material do estudo constituiu-se de hemodialisadores, que são definidos como tubos com 4 conexões. Duas conexões comunicam-se com um compartimento sanguíneo e as outras duas com um compartimento dialítico; possuem uma membrana semipermeável, separando os dois compartimentos. A área limítrofe entre os dois compartimentos é maximizada, usando-se uma membrana dividida em múltiplas fibras ocas.

O material analisado após o processamento manual constituiu-se hemodialisadores Hemoflow HPS F10 ® Fresenius Medical Care AG& CO.KGaA ($K_{uf}=21\text{mL/hXmmHg}$)

O material analisado após o processamento autoamtizado foram hemodialisadores Hemoflow ® HF 80S Fresenius Medical Care AG& CO.KGaA ($K_{uf}=55\text{mL/hXmmHg}$)

4.4.2 Composição dos Grupos Experimentais e Grupos Controle

A composição da amostra foi por conveniência conforme a disponibilidade das amostras pelas instituições participantes do estudo.

Para avaliar a contaminação microbiana dos hemodialisadores foram constituídos os grupos experimentais e grupos controle, como detalhados a seguir:

- **Grupo Experimental Automatizado:** constituído de 11 unidades de hemodialisadores, após o 20º uso, subsequentemente, ao processamento automatizado;
- **Grupo Experimental Manual:** constituído por quatro unidades de hemodialisadores, após o 12º uso, subsequentemente, ao processamento manual;
- **Grupo Controle Negativo:** constituído de três unidades de hemodialisadores novos esterilizados à vapor pelo fabricante; e
- **Grupo Controle Positivo:** constituído de três unidades de hemodialisadores, após o número máximo de reusos, onde procedeu-se a inoculação intencional com, aproximadamente, 10^2 UFC de *S.aureus* (ATCC25923)

Figura 6: Esquema Representativo dos Grupos Experimentais e Grupos Controle

4.4.3 Delineamento do estudo

Para avaliar a contaminação microbiana dos hemodialisadores, após o processamento manual e automatizado, as validações metodológicas foram realizadas, antes da coleta das amostras.

Para analisar a contaminação microbiana nos compartimentos de sangue e dialisato, foi necessário avaliar:

- a permeabilidade do caldo de cultura tioglicolato de sódio fluido no interior dos capilares;
- a capacidade em mL em cada compartimento (sangue e dialisato);e
- escolha do método para semeadura e identificação dos microrganismos.

Estes procedimentos de validação constituíram a primeira etapa dos experimentos detalhados a seguir.

4.4.3.1 Validação metodológica

Três unidades de hemodialisadores processados foram usadas após o número máximo de reusos.

Com o auxílio de seringas de 20 mL , os conteúdos de solução fisiológica e dialisato foram drenados, respectivamente, dos compartimentos de sangue e dialisato.

Com o auxílio de seringas de 60 mL o meio de cultura tioglicolato de sódio fluido (*Fluid Thioglycollate Medium*-Difco®) foi introduzido no interior do compartimento de sangue e dialisato. Neste momento foi avaliada resistência oferecida pelos capilares à permeabilidade do meio, não sendo encontrada dificuldade no preenchimento dos compartimentos.

Com o objetivo de avaliar e padronizar o volume do meio de cultura que deveria ser introduzido no compartimento de sangue e dialisato, o seguinte procedimento foi adotado: com a auxílio de seringas de 60 mL foi realizada a introdução do meio de cultura até o completo preenchimento dos dois compartimentos (sangue e dialisato), resultando em um volume de 150mL, tanto para o compartimento de sangue como ao dialisato.

Para a escolha do método de avaliação da recuperação microbiana e identificação do gênero, foi realizado um pré-teste utilizando a técnica de filtração por membrana, o caldo de cultura tioglicoalto de sódio fluido não se mostrou permeável a membrana Millipore® de 0,45µm.

Optou-se, então, pelo emprego de aspiração do conteúdo do hemodialisador com o auxílio de seringa de 20 mL esterilizadas e a transferência em placas contendo meio de cultura sólido.

4.4.4 Procedimento de Coleta dos Hemodialisadores

As amostras foram coletadas nos serviços de diálise após o número máximo de reusos, sendo 12 reusos para processamento manual e 20, para o processamento automatizado. Após submeter o hemodialisador à esterilização química líquida com ácido peracético a 0,2%, os hemodialisadores foram enxaguados na própria máquina para diálise. Os compartimentos de sangue e dialisato foram preenchidos com solução salina e solução para diálise respectivamente. A monitoração residual do APA foi realizada qualitativamente por meio de um reagente colorimétrico. A seguir, os hemodialisadores foram colocados em embalagens plásticas esterilizadas (Sterifarma® 50X70 cm), acondicionados em caixas térmicas e transportados ao laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a execução da avaliação microbiológica.

4.4.4.2 Análise microbiológica

Com a finalidade de identificar os microrganismos após o processamento dos hemodialisadores, as seguintes etapas foram seguidas, respeitando técnica asséptica apresentada a seguir

Em Cabine de Proteção Biológica Modelo VFLS12 com filtro HEPA, (*High Efficient Particulate Air*)r os procedimentos a seguir foram adotados:

- Drenada a solução salina contida no compartimento de sangue com auxílio de seringa de 20 ml;
- drenada a solução para diálise contida no compartimento de dialisato com auxílio de seringa de 20 ml;
- injetados cerca de 150 mL de meio de cultura tioglicolato de sódio fluido no compartimento de sangue com auxílio de seringa de 60 mL e vedado com tampa esterilizada;
- injetados cerca de 150 mL de meio de cultura tioglicolato fluido no compartimento de dialisato com auxílio de seringa de 60 mL e vedado com tampa esterilizada;
- colocados para incubação em estufa microbiológica por 14 dias, a temperatura de 35 °C $\pm$ 2°C
- decorrido o período de 14 dias as amostras foram transportadas em caixas térmicas para o laboratório de Microbiologia do Serviço de Infecção Hospitalar da Irmandade Santa Casa de São Paulo para identificação microbiana;
- o conteúdo do compartimento de sangue foi extraído com auxílio de seringa de 20 mL e transferido uma alíquota quantificada em 0,1 mL às placas contendo meio ágar sangue, sabouraud e anaerinsol com auxílio de alças de platina esterilizadas;
- o conteúdo do compartimento de dialisato foi drenado com auxílio de seringa de 20 mL e transferido uma alíquota quantificada em 0,1 mL às placas, contendo meio ágar

sangue, sabouraud e anaerinsol com auxílio de alças de platina esterilizadas;

- as amostras em placas de Agar *sabouraud* foram incubadas a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- as amostras de Agar sangue foram incubadas a temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- as amostras de Agar anaerinsol foram incubadas a temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em jaras para anaerobiose

O ágar sangue é um meio de cultura não seletivo que permite o crescimento da maioria dos microrganismos, além de possibilitar a leitura das hemólises produzidas pelos *Streptococcus* spp.

O ágar Anaerinsol permite o crescimento de todas as bactérias anaeróbicas. Neste, as placas foram colocadas em jaras de anaerobiose com envelope, contendo substâncias que produzem hidrogênio e dióxido de carbono, formando um ambiente anaeróbio.

O agar Sabouraud permite o crescimento de bolores e leveduras.

O meio de Tioglicolato de Sódio propicia o crescimento de vários microrganismos: aeróbios, microaerófilos, anaeróbios e fungos. O potencial de oxidação e redução baixo do meio neutraliza efeitos antibacterianos das espécies preservadas com mercúrio. A resazurina presente, que é um composto integrante do meio e indica a posição de oxidação de aeróbios e a dextrose incluída na fórmula, é para os microrganismos que têm crescimento vigoroso na presença do carboidrato (ANVISA,2013).

Após 48 horas de incubação os microrganismos foram identificados inicialmente quanto às características morfotintoriais por meio de coloração de Gram.

A seguir, para a identificação das bactérias aeróbias, as placas com crescimento bacteriano positivo tiveram suas UFCs, identificadas por morfologia macroscópica.

Para os cocos Gram-positivos, realizou-se a prova de catalase que diferencia a família dos *Stapyilococcus* spp que degradam a água oxigenada em água e gás carbônico dos *Streptococcus* spp que são catalase negativa.

Os bacilos Gram-negativos foram identificados pela série bioquímica composta pelas provas Tríplice de açúcar e ferro (TSI), motilidade, citrato, fenilalanina e indol. Esta prova permite a identificação dos microrganismos Gram-negativos não fermentadores de glicose. A seguir, foram realizadas as provas bioquímicas para não fermentadores, utilizando o *kit* Não fermentadores NFII (Probac do Brasil®) que possui as provas oxidases, crescimento em Mac Conkey, liquefação da gelatina, O/F de glicose, fermentação de maltose e lactose, descarboxilação de lisina e arginina e controle da prova de descarboxilação.

As placas de Sabouraud com crescimento sugestivo de fungo, foram submetidas à coloração de Gram, para diferenciação entre outros tipos de bactérias e repicadas em meio cromogênico para identificação da espécie (CHROMagar Candida Probac do Brasil®)

Figura 7- Procedimento de remoção de solução salina/dialisato do interior dos compartimentos

Fonte: Própria do Autor

Figura 8- Procedimento de injeção de solução tioglicolato de sódio fluido no interior dos compartimentos

Fonte: Própria do Autor

Figura 9- Procedimento de aspiração de tioglicolato de sódio fluido após 14 dias de incubação

Fonte: Própria do Autor

Procedimentos para controle positivo

Foram utilizadas três unidades de hemodialisadores com a finalidade de controle positivo:

- os hemodialisadores utilizados para teste de controle positivo foram coletados, após o último reuso;

- foram drenados do compartimento de sangue e dialisato dos hemodialisadores o conteúdo de solução fisiológica e a solução para diálise, respectivamente, com auxílio de seringa de 20 mL;
- Injetados 150 mL de meio de cultura tioglicolato de sódio fluído com auxílio de seringas de 60mL adicionados, de uma carga microbiana de aproximadamente 10^2 UFC de *S.aureus* (ATCC25923) no compartimento de sangue e vedado com tampa esterilizada;
- injetados cerca de 150 mL de meio de cultura tioglicolato de sódio fluído adicionados de uma carga microbiana de aproximadamente 10^2 UFC de *S.aureus* no compartimento de dialisato e vedado com tampa esterilizada;
- colocado para incubação em estufa por 72 horas, a temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- decorridas as 72 horas, as amostras foram transportadas em caixas térmicas ao laboratório de Microbiologia do Serviço de Infecção Hospitalar da Irmandade Santa Casa de São Paulo para identificação de gênero;
- o meio de cultura foi drenado do interior dos compartimentos de sangue e dialisato com auxílio de seringa de 20 ml;
- transferida uma alíquota quantificada em 0,1 mL às placas, contendo meio ágar sangue;
- As amostras de Agar sangue foram incubadas a temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Após 72 horas avaliou-se o crescimento microbiano de *S.aureus*

Procedimento de Controle Negativo

Foram usadas três unidades de hemodialisadores novos esterilizados a vapor pelo fabricante para testes de controle negativo:

- injetados cerca de 150 ml de tioglicolato fluido nos compartimentos de sangue e dialisato dos hemodialisadores e vedados com tampa esterilizada;
- Após 14 dias, o meio de cultura foi drenado dos compartimentos de sangue e dialisato com auxílio de seringa de 20 ml;
- transferida uma alíquota quantificada em 0,1 mL às placas, contendo meio ágar sangue contendo meio de cultura Agar sangue, Agar Anaerinsol e Agar Sabouraud;
- As amostras em placas de Agar Sabouraud foram incubadas a $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- As amostras de Agar sangue foram incubadas à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;e
- As amostras de Agar anaerinsol foram incubadas à temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em jarras para anaerobiose
- a leitura foi procedida após 48 horas

Figura 10– Esquema representativo para avaliação microbiológica

4.4.5 Tratamento e Análise dos dados

Os resultados foram sintetizados com o auxílio de tabelas. Os dados foram organizados com base no crescimento microbiano encontrado nos grupos experimentais, controle positivo e controle negativo.

Para a análise estatística, foi adotado o nível de significância de 5% (0,05) foi adotado.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* estatístico R 3.1.1 (R Core Team, 2014).

4.4.6 Procedimentos Éticos

A doação das amostras para o estudo seguiu os preceitos éticos das Instituições doadoras, e o projeto foi encaminhado à Câmara de Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, obtendo o parecer favorável sob o número de registro CEP-HU/USP 1338/13

5.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Os hemodialisadores foram analisados do ponto de vista de contaminação microbiana, após o número máximo de reusos (12 vezes manual e 20 vezes automatizado). Os compartimentos de sangue e dialisato foram analisados em todas as amostras, sendo avaliados no total, 15 hemodialisadores, totalizando 30 amostras.

Dos 11 compartimentos de sangue analisados que foram submetidos ao processamento automatizado, três amostras (27,3%) apresentaram crescimento microbiano. Dos 11 compartimentos de dialisato, 11 amostras (100%) apresentaram crescimento microbiano no compartimento de dialisato. Destas, uma amostra apresentou crescimento de três microrganismos e três amostras com dois microrganismos, conforme os dados da Tabela 1.

Tabela 1- Resultado das culturas microbiológicas dos hemodialisadores processados automatizadamente, após 20º reuso. São Paulo 2014

Hemodialisador	Compartimento Sangue	Compartimento Dialisato
Hemod 1	<i>Penicillium</i> sp	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Candida</i> sp <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Hemod 2	Negativo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Hemod 3	Negativo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Hemod 4	Negativo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Hemod 5	Negativo	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Hemod 6	Negativo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Hemod 7	Negativo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Hemod 8	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Hemod 9	Negativo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Hemod 10	Negativo	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Hemod 11	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

Dos quatro hemodialisadores submetidos ao processamento manual, uma amostra (25%) apresentou crescimento microbiano no compartimento de sangue e uma amostra (25%), crescimento no compartimento do dialisato, sendo esta positiva para três microrganismos, conforme os dados da tabela 2 a seguir.

Tabela 2- Resultado das culturas microbiológicas dos hemodialisadores processados manualmente, após 12º reuso. São Paulo 2014.

Hemodialisador	Compartimento Sangue	Compartimento Dialisato
Hemod 1	Negativo	<i>Bacillus</i> sp. <i>Rhizobium Radiobacter</i> <i>Burkholderia</i> sp.
Hemod 2	Bacilo Gram-positivo	Negativo
Hemod 3	Negativo	Negativo
Hemod 4	Negativo	Negativo

Os resultados apresentados na Tabela 3 referem-se à distribuição dos microrganismos identificados nas diferentes amostras processadas automatizadamente, após o 20º reuso, em relação ao número total de microrganismos identificados.

Tabela 3- Distribuição dos microrganismos identificados nas amostras processadas automatizadamente, após 20º reuso. São Paulo 2014.

	Compartiment o dialisato		Compartiment o sangue	
		%		%
<i>Stenotrophomonas . maltophilia</i>	4	25 18,7	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	5 43,7	0	66,6
<i>Sphingomonas .paucimobilis</i>	7	5	2	7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	6,25	0	
<i>Candida</i> sp.	1	6,25	0	
				33,3
<i>Penicillium</i> sp.	0		1	3
Total	16	100	3	100

Os microrganismos identificados nas diferentes amostras processadas manualmente, após 12º reuso, estão apresentados na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 - Distribuição dos microrganismos identificados nas amostras processadas manualmente, após 12º reuso. São Paulo 2014.

	Compartimento dialisato	%	Compartimento sangue	%
<i>Bacillus</i> sp.	1	33,33	0	
Bacilo Gram-positivo	0		1	100
<i>R. Radiobacter</i>	1	33,33	0	
<i>Burkholderia</i> sp.	1	33,33	0	
Total	3	100	1	100

Os resultados da análise microbiológica comparando os dois métodos empregados para o compartimento do dialisato estão dispostos nos dados da Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Análise microbiológica comparando método automatizado e manual no compartimento de dialisato. São Paulo 2014.

Compartimento dialisato	Automatizado	%	Manual	%
Negativo	0	0	3	75
Positivo	11	100	1	25

Comparando os dois métodos de processamento, houve diferença estatisticamente significativa, aplicando-se o teste exato de Fisher ($p=0.008791$).

Os dados da Tabela 6 apresentam a comparação do crescimento microbiano nos dois tipos de processamento, manual e automatizado a seguir.

Tabela 6 – Análise microbiológica comparando método manual e automatizado no compartimento de sangue. São Paulo 2014

Compartimento sangue	Automatizado	%	Manual	%
Negativo	8	72,73	3	75
Positivo	3	27,27	1	25

Na análise estatística pelo teste exato de Fisher, não houve diferença entre os dois métodos testados ($p=1$) quanto ao crescimento microbiano no compartimento de sangue entre os métodos automatizado e manual.

5.2 GRUPO CONTROLE

5.2.1 Controle Positivo

Dos três hemodialisadores submetidos ao controle positivo com a inoculação intencional de 10^2 UFC de *S.aureus* (ATCC 25923) um compartimento de sangue e um compartimento de dialisato apresentou positividade para o microrganismo inoculado.

5.2.2 Controle Negativo

Nas três amostras analisadas para o controle negativo, não houve crescimento microbiano, conforme esperado.

6.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A investigação conduzida pela presente dissertação é pioneira no contexto nacional e internacional. Os resultados desta pesquisa demonstraram o risco de bacteriemia e sepse aos pacientes portadores de DRC em tratamento hemodialítico, pois houve a identificação de microrganismos, tanto nos compartimentos de sangue como nos de dialisato dos hemodialisadores submetidos ao processamento manual e automatizado.

Os estudos até hoje publicados, sendo a maioria observacional, não confirmam o aumento da mortalidade em função do reuso de hemodialisadores (Galvao et al.,2012). No entanto, este assunto frequentemente gera dúvidas em relação à sua segurança.

Analisando os resultados, evidencia-se que a água é uma das principais fontes de contaminação dos hemodialisadores processados, Sobretudo em função da maioria dos microrganismos serem com frequência reportados como contaminantes de água de diálise (Gomila et al.,2005;Pires-Gonçalves et al.,2008; Montanari et al.,2009).

Quando observamos os reservatórios naturais dos microrganismos identificados na presente pesquisa, uma grande maioria encontra-se na água, além disso, estes microrganismos também são descritos como contaminantes de ambientes hospitalares e infecções associadas à dispositivos, incluindo hemodialisadores, como disposto no quadro a seguir.

Quadro 4 - Microrganismos identificados no presente estudo correlacionados as principais fontes de infecção relacionada à assistência à saúde

Microrganismos	Reservatórios	Microbiota Humana	Reservatórios Hospitalares	Infecções Associadas à Dispositivos	Infecções Associadas à Hemodialisadores
<i>S. maltophilia</i>	Água, Solo e Esgoto	Trato Gastro Intestinal	Pia, Germicidas, Equipamentos, Objetos e Superfícies	Ventilação Mecânica, Nebulizadores	Presente
<i>P. aeruginosa</i>	Solo, Água, Vegetais, Alimentos, Animais	#	Soluções, Medicamentos Parenterais, Equipamentos, Hemoderivados, Objetos e superfícies	Ventilação Mecânica, Sistemas coletores de urina, sistemas de aspiração, endoscópio, cistoscópio	
<i>S. paucimobilis</i>	Água e Solo	#	Soluções Parenterais e Equipamentos	Ventilação Mecânica, Cateter Venoso Central incluindo de HD, Cateter Peritoneal, Derivação ventrículo Peritoneal, Cateter vesical	Presente
<i>A. baumannii</i>	Água, Solo Úmido, Animais Silvestres, Domésticos	Pele, Conjuntiva, nariz, faringe	Água, Pia, Soluções Parenterais, equipamentos, objetos e superfícies, hemoderivados	Cateteres de Angiografia, Ventilação Mecânica, duodenoscópios, laringoscópios, Cateter Peritoneais	Presente
<i>R. Radiobacter</i>	Solos e plantas	#	#	Cateter para diálise peritoneal, nefrostomia, cateter venoso central, próteses valvares	#
<i>Burkholderia spp</i>	Água, Esgoto e Plantas	#	Germicidas, soluções parenterais, equipamentos e hemoderivados	Ventilação Mecânica	Presente
Bacilo gram positivo	#	Pele e Glândulas Sebáceas	Medicamentos, Alimentos	#	#
<i>Bacillus spp</i>	#	Pele e Glândulas Sebáceas	Medicamentos, Alimentos	#	#
<i>Penicillium spp</i>	Solo e Ambientes úmidos	#	#	#	#
<i>Candida spp</i>	Solo e Água se contaminados por dejetos humanos e animais	Trato Gastro Intestinal, orofaringe, vagina e pele	Nutrição Parenteral	Cateter venoso Central, Cateter Peritoneal Para diálise, Válvulas de derivação Ventrículo Peritoneal	#

Fonte: Arnow PM, Flaherty JP, 1996;
 Steinberg J P, Del Rio C, 2005;
 Maschmeyer G, Göbel UB, 2005;
 Lincopan N, Trabulsi LR, 2005;
 Gompertz et al., 2005

A qualidade da água empregada nos tratamentos hemodiáliticos, assim como no processamento dos hemodialisadores, é crucial para a segurança do paciente, considerando que um paciente portador de DRC em tratamento hemodiálítico utiliza de 400 a 600 litros de água por semana (Phillips, Hudson, Stewart, 1994; Nystrand 2008).

Uma unidade de diálise de tamanho médio produz mais de 1.000.000 litros de líquido de diálise por ano. Em todo o mundo, a produção de líquido de diálise é aproximadamente, 25.000.000.000

litros, o que faz com que o fluido de diálise seja um dos maiores produtos em volume utilizados na medicina (Nystrand, 2008). A esterilização desse volume de água seria impossível para os de diálise? Haveria tecnologias que suportassem esse processo seguramente?

Nesta pesquisa, a presença de microrganismos evidenciada nos compartimentos de dialisato já era esperada, pois a água utilizada, tanto para o processamento como para o dialisato não é esterilizada. Um limite máximo de microrganismos é admitido, pois considera-se que membrana íntegra seja barreira eficaz contra microrganismos (Roth, Jarvis, 2000).

Quando comparados os dois métodos de processamento nas amostras do dialisato quanto ao crescimento microbiano, houve diferença estatisticamente significativa, sendo o método manual 25% de positividade versus 75% de positividade do método automatizado ($p= 0.008791$). Esta diferença pode ser atribuída se deve à qualidade da água local. É importante ressaltar que ambas os serviços atendiam aos critérios de qualidade da água estabelecidos pela legislação vigente.

Em contrapartida, a identificação de microrganismos no compartimento de sangue, conforme evidenciado neste estudo não demonstrou diferença estatística entre os dois métodos, no qual método manual apresentou 25% de positividade versus 27,27% do método automatizado ($p=1$).

O fato de haver crescimento microbiano nos compartimentos de sangue é bastante preocupante, pois esta via é conectada diretamente à corrente sanguínea do paciente, e a presença de microrganismos no local representa um alto risco aos pacientes que já se encontram em estado de imunossupressão, anemia e outras comorbidades. Mesmo considerando que durante o processamento rotineiro, este compartimento entra em contato com água não esterilizada, proveniente do sistema de tratamento para hemodiálise,

a esterilização química deveria eliminar os microrganismos que, eventualmente, restassem no interior do compartimento, fato que não foi evidenciado por este estudo. Pode-se hipotetizar que os microrganismos foram protegidos por biofilmes durante a esterilização química. Em duas amostras, houve coincidência de microrganismos, tanto no compartimento de sangue como no dialisato, o que pode sugerir que provavelmente os microrganismos atravessaram a membrana semipermeável

A água é imprescindível tanto no tratamento hemodialítico como no processamento dos hemodialisadores. No entanto, é um veículo bastante importante para a transferência de microrganismos, pois o ambiente aquático dá suporte ao crescimento de diferentes microrganismos como os Gram-negativos e micobactérias não tuberculosas (Roth, Jarvis, 2000).

Neste estudo, os microrganismos identificados, também são relatados como habituais contaminantes de água e frequentemente, identificados nos serviços de diálise (Arvanitidou et al., 2003; Gomila et al., 2005; Menezes, Santana, Camargo, 2005; Pires-Gonçalves et al., 2008).

Nos dois centros investigados o tratamento de água é feito por osmose reversa. A água de osmose reversa é livre dos derivados de cloro que possuem atividade bactericida. Embora seja uma água de ótima qualidade, a manutenção periódica e cuidadosa do sistema de tratamento deve ser realizada, a fim de que não se torne um meio propício ao desenvolvimento de microrganismos, principalmente os bacilos Gram-negativos que se multiplicam muito facilmente, mesmo em ambientes pobres em nutrientes (Favero et al., 1975).

Nas amostras analisadas, provenientes do processamento manual e automatizadas, observou-se a predominância de microrganismos Gram-negativos. Este microrganismo vem sendo implicados em surtos de infecção e reações pirogênicas envolvendo

serviços de diálise e são reportados como uma importante causa de morbidade nos pacientes portadores de DRC (Jackson et al.,1994;Roth, Jarvis,2000; Menezes, Santana, Camargo, 2005;).

Um estudo desenvolvido por Gomila e seus colaboradores (2005) analisaram a diversidade bacteriana em um sistema de tratamento de água para hemodiálise, tratada por osmose reversa, que demonstrou o crescimento de uma ampla variedade de gêneros, com predominância para microrganismos Gram-negativos, sendo também possível identificar microrganismos Gram-positivos como *Bacillus* spp, microrganismos do mesmo gênero do presente estudo. Os autores compararam o crescimento microbiano antes e após a hipercloração do sistema de tratamento de água em diferentes pontos de coleta. Observaram que em alguns pontos coletados a desinfecção do sistema por este método, não foi suficiente para reduzir a carga microbiana a níveis recomendados, e que o número de microrganismos foi maior próximo ao local de distribuição para o paciente, demonstrando que pode ocorrer a proliferação microbiana ao longo do sistema de distribuição da água.

Em uma investigação de surto de infecção que envolveu 11 pacientes em um serviço de diálise que atendia, aproximadamente, 390 pacientes, foi identificada como problema principal a qualidade da água, que não atendia às recomendações locais no que diz respeito à contagem microbiana e endotoxinas. Os microrganismos identificados foram *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomas maltophilia*. No transcorrer da investigação, várias oportunidades de melhoria relacionadas ao controle de qualidade da água foram evidenciadas sendo elas: o controle e monitoramento microbiológico da água, a acurácia do teste microbiológico empregado, a desinfecção periódica do sistema de tratamento de água conforme regulamentação local (Jackson et al.,1994)

Outro exemplo de surto, em decorrência da qualidade da água, controlado depois de repetidas desinfecções do sistema de tratamento de água, ocorreu no Brasil em 2000. Envolveu 38 pacientes com hemoculturas positivas para *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*; no entanto 32% das hemoculturas coletadas dos pacientes que apresentaram reações pirogênicas foram negativas, sugerindo endotoxinas ou produtos bacterianos como causadores das reações. Os microrganismos identificados nas hemoculturas eram da mesma espécie dos encontrados nos reservatórios de água e tiveram suas identidades confirmadas por meio de biologia molecular (Menezes, Santana, Camargo, 2005)

Embora o processamento seja considerado seguro desde que seguidas as recomendações de órgãos oficiais (Favero, 2000), o processamento de hemodialisadores exige rigorosidade na sua execução e, inevitavelmente, depende de recursos humanos treinados e capacitados.

O processamento de hemodialisadores é permitido pela legislação brasileira, exceto se for rotulado como proibido reprocessar (Brasil, 2014). Os fabricantes dos hemodialisadores estudados recomendam uso único. Sendo assim, conforme recomendações da RE ANVISA nº2606/2006 que dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de processamento de produtos médicos. O material em questão deveria passar por um processo de validação que consiste no estabelecimento de evidências documentadas que comprovem que uma atividade específica, em conformidade com as especificações predeterminadas e atendendo a requisitos de qualidade. Esta prática, não é, nacionalmente, estabelecida para o reuso de hemodialisadores pelos estabelecimentos de saúde.

Dados norte-americanos demonstram a melhora dos índices de mortalidade entre os pacientes portadores de DRC atribuídas à

infecção, passando de primeira causa em 1991, a terceira causa em 2011(URDS,2013). A melhora nos índices de mortalidade tem sido atribuída principalmente à melhoria nas práticas de processamento, como o seguimento rigoroso de práticas recomendadas, padronização de processos e emprego da automação (Robinson,Feldman,2005;AAMI,2008;)

A revisão da legislação recentemente publicada, RDC ANVISA nº 11/2014, que dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de diálise, estabelece um prazo máximo de quatro anos para o abandono do processamento manual. Essa decisão talvez esteja pautada nas vantagens do processamento automatizado que possibilita uma padronização do processamento, diminuindo os riscos ao paciente. No entanto, é necessário avaliar a prática em âmbito nacional, pois há carência de registros a respeito da prática do reuso e seus respectivos desfechos.

Embora a automação resolva alguns pontos críticos do processamento de hemodialisadores, como a padronização da limpeza, a avaliação da integridade da membrana, a medição do volume interno das fibras, há a dependência direta do profissional de saúde capacitado para execução das etapas dos processos exigidos antes de acoplar o hemodialisador a máquina processadora .

A ineficácia do processo em função da inobservância de pontos cruciais do processamento pode colocar em risco a vida dos pacientes, conforme exemplifica o surto descrito a seguir.

Um surto envolveu 11 pacientes com infecção no total de 69 pacientes expostos. Estes 11 pacientes utilizaram hemodialisadores reprocessados manualmente e o ácido peracético era o agente químico esterilizante empregado. Houve nove eventos de reações pirogênicas e quatro eventos de bacteriemia por bacilo Gram-negativo, sendo os agentes identificados como *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Alcaligenes* spp. Os

hemodialisadores foram investigados quando a concentração de ácido peracético, crescimento microbiano e presença de endotoxinas. A concentração de ácido peracético preconizada para o serviço de diálise era 2,5%. As concentrações de ácido peracético no interior dos hemodialisadores apresentaram grande variação (0,9% a 4,5%). A identificação de endotoxinas variou entre 0 e 246ng/dl sendo maior nos hemodialisadores que apresentaram concentração menor que 1% e na análise microbiológica dos hemodialisadores investigados não houve crescimento (Beck-Sague et al.,1990).

Em duas amostras, sendo uma em compartimento de dialisato a outra em compartimento de sangue, foi identificado crescimento fúngico. Embora a identificação de fungos no sistema de tratamento de água nos serviços de diálise não faça parte da avaliação microbiológica rotineira, estes microrganismos são descritos como presentes em água tratada para hemodiálise, incluindo sua habilidade de formar biofilmes (Pires-Gonçalves et al.,2008;). Para Drozdowska (2007), um paciente portador de DRC tem maior susceptibilidade para desenvolver infecções fúngicas comparado a uma população saudável, sendo assim a investigação rotineira da presença desses microrganismos deveria ser recomendada para a água que abastece os serviços de diálise.

Um estudo demonstrou uma abundante identificação fúngica em sistema de água para hemodiálise tratada por osmose reversa. O autor, a partir de 45 amostras coletadas identificou 75 culturas positivas para fungos. O crescimento fúngico foi positivo em 89% das amostras, e as amostras negativas foram mais frequentes de água coletada de osmose reversa. As amostras foram coletadas da água tratada do sistema de abastecimento municipal, tanque de armazenamento de água de osmose reversa e de três salas de hemodiálise. Além disso, foram coletadas 29 amostras de dialisato e 10 da solução de ácido peracético, utilizado para esterilização dos

hemodialisadores reutilizados. Estratificando os dados deste estudo em comparação com os resultados da presente pesquisa, nas amostras analisadas pelos autores, além de outras espécies de fungos, identificou-se *Penicillium* sp, como sendo o fungo mais prevalente das amostras coletadas do sistema de abastecimento, mas também foi identificado nas salas de diálise e *Candida* spp identificada em 8% das amostras (Pires-Gonçalves et al.,2008)

Uma possível causa para identificação desses agentes encontrados no compartimento de sangue e dialisato seria a sobrevivência de microrganismos protegidos em biofilmes.

A questão do biofilme em sistemas de tratamento de água para hemodiálise, assim como a possibilidade de transferência de produtos biológicos para a corrente sanguínea dos pacientes vem sendo bastante investigada, demonstrando que alguns métodos rotineiros de desinfecção do sistema de água tratada para hemodiálise não são eficazes, colocando em risco a segurança do paciente.

O controle microbiológico, obedecendo aos padrões recomendados, tem o objetivo de evitar eventos adversos provenientes de uma água de má qualidade, visto que a água entra em contato direto com a corrente sanguínea do paciente através da membrana semipermeável.

A qualidade da água avaliada, conforme os padrões nacionais e internacionais estabelecidos, pode subestimar as reais condições do sistema de tratamento, pois quantifica os microrganismos em forma livre, sem, portanto, executar uma busca aprofundada das condições do sistema de tratamento como um todo, que podem abrigar a presença de biofilmes.

Em situações onde os microrganismos encontram-se aderidos, formando biofilmes, pode haver subestimação do crescimento microbiano em 100.000 vezes (Nystrand,2008)

Em um sistema de tratamento de água, quando o número de bactérias torna-se alto, os microrganismos podem passar da forma planctônica para a forma séssil. Uma vez formados, a remoção é dificultosa, pois os microrganismos organizados em matriz de exopolissacarídeo desenvolvem mecanismos de defesa frente aos agentes químicos utilizados para desinfecção (Glorieux, 2012; Capelli et al., 2003)

Em ambientes aquáticos, a presença de biofilme é bastante estudada, e a formação de biofilme em sistemas de tratamento de água para hemodiálise também vem sendo uma preocupação relacionada ao tratamento hemodilítico, pois a qualidade da água mesmo obedecendo à periodicidade de tratamento pode estar comprometida.

Phillips, Hudson e Stewart (1994), perceberam que em seus serviços de diálise, as conexões e tubulações do sistema de diálise apresentavam-se com um depósito de coloração amarelada, que recobria as conexões e tubulações plásticas transparentes, mesmo após o processo de desinfecção realizado mensalmente. O material recuperado e encaminhado para análise apresentou crescimento predominante de *Bacillus* spp, *Micrococcus* e coliformes. Neste caso, não foi notado um aumento no número de reações pirogênicas que pudesse estar diretamente associado a estes episódios.

Em outro estudo, os autores provocaram a formação de biofilme em hemodialisadores com o objetivo de avaliar os fatores que influenciam a adesão bacteriana, o efeito de diferentes produtos químicos como agentes desinfetantes sobre os biofilmes e a passagem de endotoxinas através da membrana semipermeável. Observaram que a formação de biofilme ocorreu baseada em uma solução contaminada com >200 UFC/ml. Este valor poderia justificar as recomendações nacionais e internacionais para o controle da qualidade da água utilizada em centro de HD (RDCnº11/2014; EBPg, 2002 e AAMI, 2008). Quanto à ação dos desinfetantes,

consideraram que ação foi ineficaz quando testado hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio. No entanto, neste estudo, o tempo de contato do desinfetante foi de 15 minutos o que não representa a prática atualmente adotada, em que se considera o tempo de contato em torno de 48hs, conforme os ciclos de tratamento hemodialítico. Em relação à permeabilidade a endotoxinas, demonstraram que em situações com altas concentrações (2.000 EU/ml), ocorre a transferência desta substância através da membrana semipermeável (Vincent, Tibi, Darbord, 1989)

Com o objetivo de demonstrar a eficácia de diferentes agentes químicos e físicos na eliminação de biofilmes e, conseqüentemente, endotoxinas, Capelli e seus colaboradores (2003) provocaram a formação de biofilmes em circuitos de máquinas de hemodiálise com 10^9 UFC de *P.aeruginosa*, após a comprovação por meio de microscopia eletrônica de varredura. Procedimentos de desinfecção dos circuitos de hemodiálise foram empregados utilizando: hipoclorito de sódio, ácido peracético, termodesinfecção a 85°C termodesinfecção associada a ácido cítrico e alta temperatura associada ao ácido cítrico seguida de contato por 60 horas com ácido peracético a 0,37%. Comprovou-se que, na presença de biofilmes, o hipoclorito de sódio, ácido peracético e alta temperatura, foram incapazes de eliminar microrganismos e endotoxinas, e o reaparecimento ocorreu, imediatamente, após a desinfecção. O método que apresentou melhor desempenho foi alta temperatura associada a ácido cítrico, no entanto, a completa redução microbiana foi observada com o emprego de termodesinfecção associada a ácido cítrico seguido por 60 horas com ácido peracético a 0,37% .

Embora esta situação descrita neste estudo com a provocação da formação de biofilme, utilizando uma população elevada de microrganismos, não seja a realidade da maioria dos serviços de diálise, os resultados têm mostrado que uma vez o

biofilme formado em um ambiente propício, como os sistemas de tratamento de água dos serviços de diálise, a sua remoção e a completa eliminação do problema podem ser muito desafiadores.

Embora os microrganismos não consigam atravessar a barreira da membrana semipermeável em função de seu tamanho, pode-se citar um prejuízo aos pacientes por consequência da transferência direta de contaminantes biológicos, como endotoxinas e fragmentos de DNA, que são citados como responsáveis por uma condição inflamatória crônica nos pacientes portadores de DRC em tratamento hemodialítico (Glorieux et al., 2012). Esta condição microinflamatória crônica é desencadeada em função da exposição prolongada ao tratamento hemodialítico com eventuais contaminantes da água, causando respostas inflamatórias por elevação da síntese de citocinas: interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral (Glorieux et al., 2012).

Quando se considera a água como um fator imprescindível ao tratamento de pacientes portadores de DRC, a descontinuação do reuso não resolveria integralmente os riscos ao paciente portador de DRC. A garantia da qualidade da água a que os pacientes são expostos durante o tratamento, certamente, diminuiria esses riscos, pois eliminaria os eventuais relacionados à exposição a germicidas e erros de processamento.

O processamento de hemodialisadores é considerado seguro, desde que sejam seguidas rigorosamente todas as etapas do processamento (Favero, 2000). No entanto, fatores como erro humano, qualidade da água e exposição à germicidas devem ser considerados, como primordiais na decisão pelo uso único ou processamento de hemodialisadores.

O reuso dos hemodialisadores é motivado sobretudo pelo custo do tratamento hemodialítico. No Brasil, atualmente, 85% dos tratamentos são custeados pelo Sistema Único de Saúde em

serviços de diálise de natureza privada (Sesso et al.,2011; DESD/MS,2010)

Para o cálculo do custeio do tratamento, o Departamento de Economia da Saúde e Desenvolvimento /MS inclui o reuso, partindo do princípio que o serviço de diálise reutilizará o hemodialisador, não sendo considerada a possibilidade de uso único.

Sendo assim, os serviços de diálise no Brasil não estão autorizadas a escolher o uso único motivados pela inviabilidade financeira.

A priorização da segurança do paciente e a responsabilidade ética dos profissionais de saúde (PS) devem se sobrepor-se à preocupação financeira em garantir tratamento seguro aos portadores de DRC em fase terminal. Cabe ressaltar que a revisão das práticas de processamento de hemodialisadores depende de políticas públicas sustentáveis financeiramente, que possam garantir a segurança ao paciente portador de DRC.

7.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Atualmente, as práticas de reuso de hemodialisadores adotadas no Brasil não deixam dúvidas a respeito do risco de infecção, substanciada pela recuperação de microrganismos nos compartimentos de sangue e dialisato, após o seu processamento.

No cenário deste estudo, a condição analisada foi o último reuso permitida pela legislação vigente, não sendo possível afirmar em que momento os microrganismos identificados contaminaram o sistema hemodialisador.

Ambos os métodos analisados de processamento, manual e automatizado, apresentaram crescimento microbiano no compartimento de sangue e dialisato, sendo que houve diferença estatisticamente significativa no compartimento de dialisato apresentando maior contaminação microbiana no processo automatizado.

Adicionalmente, considerando os resultados do controle positivo que apresentou apenas duas amostras positivas, mesmo com a contaminação intencional de 10^2 *S.aureus*, pode-se deduzir que houve subestimação da recuperação microbiana nos grupos experimentais analisados, agravando ainda mais o risco de infecção na prática do reuso.

Considerando a criticidade do material do estudo, o crescimento microbiano, sobretudo nas amostras do compartimento de sangue representa um risco aumentado ao paciente, caso este hemodialisador fosse novamente utilizado.

Considerando a criticidade do material do estudo e os achados de recuperação microbiana na presente investigação,

essa pesquisa subsidia fortemente a adoção do uso único dos hemodialisadores.

Referências

REFERÊNCIAS

AAMI. Association for advancement of medical instrumentation. American National Standards - Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities, 2006.

AAMI. Association for the Advancement of medical Instrumentation. Reprocessing of Hemodialyzers. ANSI/AAMI RD47:2008.

Anderson RL, Holland BW, Carr JK, Bond WW, Favero MS: Effect of disinfectants on pseudomonads colonized on the interior surface of PVC pipes. Am J Public Health 1990;80:17-21.

Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB. Quorum sensin in bacterial virulence. Rev Microbiology,2010;156:2.271-82.

AORN. Association of perioperative registered nurses. Perioperative Standards and Recommended Practices, 2011.

APIC.Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology (APIC). Guide to the Elimination of Infections in Hemodialysis, 2010.

Arduino MJ. CDC investigations of noninfectious outbreaks of adverse events in hemodialysis facilities, 1979-1999. Seminars in Dialysis,2000 13(2):86-91

Arnou PM, Flaherty JP. Nonfermentative Gram-Negative Bacilli In: Mayhall CG. Hospital Epidemiology and Infection Control. Baltimore: p 366-387,1996

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 ,2003; 95: 180-85

Auler ME, Morreira D, Rodrigues FFO, Abrão MS, Margarido PFR, Matsumoto FE, Silva EG, Silva BCM, Schneider RP. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology* 2010; 48: 211–216.

Beck-Sague CM, Jarvis WR, Bland LA, Arduino MA, Agüero SM, Verosic G. Outbreak of gram-negative bacteremia and pyrogenic reactions in a hemodialysis center. *Am.J Nephrol.*1990;10:397-403

Bos R., Van der Mei H C, Busscher H J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Rev.*1999; 23:179-230

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Tecnovigilância: abordagens de vigilância sanitária de produtos para a saúde comercializados no Brasil, Brasília 2010, p399-426.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Brasil, 2013 Cap.2, p 17-38

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 154, 15 de junho de 2004. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise. Brasília: ANVISA, 2004.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 2.606, de 11 de Agosto de 2006. Dispõe sobre as diretrizes para elaboração, validação e implantação de protocolos de reprocessamento de produtos médicos e dá outras providências, Brasília: ANVISA 2006

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 33, 3 de junho de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração, avaliação e aprovação dos

Sistemas de Tratamento e Distribuição de Água para Hemodiálise no Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2008.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 31, de 4 de julho de 2011 - Dispõe sobre a indicação de uso dos produtos saneantes na categoria "esterilizante" para máquinas e equipamentos para hemodiálise. Brasília: ANVISA, 2011.

Brasil. Agência nacional de vigilância sanitária. RDC nº 15, 15 de março de 2012. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para a saúde e dá outras providências. Brasília:ANVISA, 2012.

Brasil. Agência nacional de vigilância sanitária. Gerencia geral de tecnologias de produtos para Saúde/ Gerencia de Tecnologias de Materiais de Uso Único Nota técnica nº001/2013 Informações de rotulagem de produtos para saúde. Brasília:ANVISA,2013

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 11, 13 de março de 2014. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2014

Brasil. Departamento de Economia da Saúde, Investimento e desenvolvimento. Estimativa do Custo do Procedimento de Hemodiálise. Apresentada pela Secretaria de Atenção à Saúde, por meio da Coordenação-Geral da Média e Alta Complexidade, DESD/SE/MS, de 02 de julho de 2010. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/23_apresentacao.pdf, acessado em 23/09/2014

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de

potabilidade. Brasília: Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília (DF) 14 de dezembro de 2011

Capelli G, Sereni L, Scialoja MG, Morselli M, Perrone S, Ciuffreda A et al. Effects on biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial. Transplant.* 2003;18:2105-2111

CDC. Centers for Disease Control and prevention. Recommendations for preventing transmission of infections among chronic hemodialysis patients. *MMWR* 2001;50(RR05):1–43.

Chelamcharla M, Leypoldt J K, Cheung A K. Dialyzer Membranes as Determinants of the Adequacy of Dialysis. *Seminars in Nephrology.* 2005; 25:81-89

Cheung AK, Leypoldt JK. Evaluation of Hemodialyzer Performance. *Seminars in Dialysis.* 1998; 11(2): 131-137

Costerton jw, Stewart ps, Greenberg ep. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections *science.* Rev 1999;284:1.318-22.

Cusumano A, Garcia GG, Di Gioia C, Hermida O, Lavorato C. Latin American Registry of Dialysis and Transplantation: The Latin American Dialysis and Transplantation Registry (RLDT) annual report 2004. *Ethn Dis* 2006; 16:S2–10–13.

Donlan R M. Biofilm formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *CID* 2001;33:1.387-92.

Donlan R M ,Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15(2):167-93

Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90

Drozdowska A. Morphological and biochemical features of fungi isolated from patients with renal failure. *Wiad Parazytol.* 2007;53: 145- 48

European Best Practice Guidelines- Hemodialysis . Section IV. Dialysis fluid purity. *Nephrol Dial transplant* 2002;17:45-62

Favero MS, Petersen, NJ, Carson, LA, Bond, W.W, Hindman, SH. Gram-negative bacteria in hemodialysis systems. *Hlth Lab. Sci.*, 1975;12: 321-34

Favero MS.Role of CDC in Hemodialysis: An Historical Perspective *Seminars in Dialysis.* 2000; 13(2): 64-67

Federle MJ, Bassler LB. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 2003;112:1291-99

Finelli L, Miller JT, Tokars JI, Alter MJ, Arduino MJ: National surveillance of dialysis associated diseases in the United States, 2002. *Semin Dial* 2005; 18: 52–61

Galvao TF, Silva MT, Araújo MEA, Bulbol, WS, Cardoso ALMP: Dialyzer Reuse and Mortality Risk in Patients with End-Stage Renal Disease: A Systematic Review. *Am J Nephrol* 2012;35:249-258.

Gilbert P,Mc Bain AJ. Biofilms: Their impact on health and their recalcitrance toward biocides. *Am.J.Infect Control* 2001;29:252-5

Glorieux G, Neiryneck N, Veys N, Vanholder R. Dialysis water and fluid purity: more than endotoxin. *Nephrol Dial transplant* 2012;27:4010-21

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* 2005; 52:101–114

Gompertz OF, Gambale W, Paula CR, Corrêa B. Micose Oportunisticas e Outras Micose. In: Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4^a ed São Paulo, 2005 P 495-499

Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. Trends in Microbiology. 2005;13(1):7-10

Højby N, Ciofu Oana, Johansen HK, Song Z, Moser C, Jensen PØ, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T, Bjarnsholt T. The clinical impact of bacterial biofilms. Intern.J.Oral Sci 2011;3:55-65

Jackson, BM, Beck-Sague, C M, Bland, L A, Arduino, MJ, Meyer, L, Jarvisis, W.R. Outbreak of pyrogenic reactions and gram-negative bacteremia in a hemodialysis center. American Journal of Nephrology 1994; 14: 85–89

Kaufman AM ,Levin NW. Dialyzer reuse In: Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. Handbook of Dialysis. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000; p.169-181

Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid : a review. Environment International. 2004;30:47-55

KDIGO. Kidney Disease Improving Global Outcomes. Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. International Supplements. 2013; 3:19–62

Króslasik J, Zakowska Z, Krepska M, Klimek L. Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. Polish Journal of Microbiology. 2010;59(4):281-87

Lacson E, Lazarus JM: Dialyzer best practice: single use or reuse? Seminars in Dialysis 2006; 19: 120–128.

Lewis K. Minireview- Riddle of Biofilme Resistance. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2001;45(4):999-1007

Lincopan N, Trabulsi LR. *Pseudomonas aeruginosa* In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4Ed São Paulo, 2005 p. 359-368

Manfredi SR, Canziani MEF. Reprocessamento dos dialisadores In: Mangini C, Camargo LFA. São Paulo: Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à saúde – APECIH 2005 p. 61-65.

Maschmeyer G, Göbel UB. Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli In: Mandell, Douglas, and Benett's. *Principles and Practices of Infectious Diseases Control*. 6ª ed Philadelphia: 2005; 2.615-2.622

Miles AMV, Friedman EA. A Review of hemodializer reuse. *Seminars in Dialysis* .1997;10(1): 32-37

Menezes FG, Santana LS, Camargo LFA. Controle da qualidade da água em hemodiálise e suas implicações In: Mangini C, Camargo LFA. São Paulo: Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à saúde – APECIH 2005 p. 10-20

Montanari LB, Sartori FG, Cardoso JMO, Varo SD, Pires R, Leite CQF, Prince K, Martins CGHG: Microbiological Contamination of a hemodialysis Center water Distribution system. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2009; 51(1):37-43.

Nystrand R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. *J Chin Med Assoc* .2008; 71: 223–229.

Padoveze MC, Graziano KU. Aspectos conceituais e microbiológicos relacionados ao processamento de materiais utilizados na

assistência à saúde. In: Enfermagem em Centro de Material e esterilização. Barueri, SP: Manole, 2011; p. 22-61

Patel PR, Thompson ND, Arduino MJ. Control of infection associated with hemodialysis. In: Mayhall CC. Hospital Epidemiology and Infection Control. Philadelphia: 2012; 936-66

Phillips G, Hudson S, Stewart WK. Persistence of microflora in biofilm within fluid pathways of contemporary haemodialysis monitors (Gambro AK-10). Journal of Hospital Infection. 1994;27:117-125

Pires-Gonçalves RH, Sartori, FG, Montanari L B, Zaia JE, Melhem MSC, Mendes-Giannini M.J.S, Martins CHG. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. Letters in Applied Microbiology 2008; 46:542–47

Psaltikidis EL .Esterilização pelos métodos químico-líquidos: Graziano KU, Silva A, Psaltikidis : Enfermagem em Centro de Material e Esterilização. Barueri, SP: Manole, 2011. p.147-166

Ribeiro, SMCP. Limpeza In:Padoveze MC,Graziano,KU. Limpeza, desinfecção e esterilização de artigos em serviços de saúde. São Paulo: Associação Paulista de Epidemiologia e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – APECIH;2010. p.57-82.

Roberts CG. The role of Biofilm in Reprocessing Medical Devices. In: Rutala W A.(Ed). Disinfection, Sterilization and Antisepsis: Principles, Practices, Current Issues, New Research, and New Technologies. APIC 2010 p. 223-29.

Robinson BM, Feldman HI. Dialyzer Reuse and Patients Outcomes : What do We Know Now? Seminars in Dialysis 2005;18(3): 175-79

Romão Júnior JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. J Bras Nefrol 2004; 26(3):1-3 Supl.1.

Roth VR, Jarvis WR: Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial* 2000;13:92–96.

Rutala WA, Weber JD. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, Atlanta: CDC; 2008.

Santos AP, Watanabe E, Andrade D. Biofilme em marca-passo artificial: ficção ou realidade? *Arq Bras Cardiol* 2011;97(5):e113-e120 Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2011.

Sesso RCC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR. Diálise Crônica no Brasil – Relatório do Censo Brasileiro de Diálise. *J Bras Nefrol* 2011; 34(3):272-77.

Steinberg J P, Del Rio C. Other Gram-Negative and Gram-Variable Bacilli In: Mandell, Douglas, and Benett's. Principles and Practices of Infectious Diseases Control. 6ª ed Philadelphia: 2005;p. 2.751-2.768

Taaffe VS. Quality Assurance for Hemodialyzer Reprocessing: minimizing risks. *Nephrol News Issues*. 2001 Jun;15(7):36-9, 41-2 Reprocessing Products Corporation, Minneapolis, Mn

Twardiwsju ZJ. Dializer reuse part I; historical perspective. *Semin. Dial.* 2006;19(1):41-53

USRDS .United States Renal Data System. USRDS 2012 annual data report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD 2011.

USRDS .United States Renal Data System. USRDS 2013 annual data report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National

Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases,
Bethesda,MD 2012

Van Stone JC. Aparelho de Hemodiálise In: Daugirdas JT,Blake
PG,Ing TS. Handbook of Dialysis. Philadelphia: Lippincott Williams &
Williams,2000.p.

Vincent FC,Tibi AR, Darbord JC. Bacterial Biofilm in a Hemodialysis
System Assesment of didinfection and Crossing of Endotoxin.Trans
Am Soc Artif Intern Organs 1989;35:310-313

Vinhas J, Pinto dos Santos J: Haemodialyser reuse: facts and fiction.
Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 5–8.

Upadhyay A, Sosa MA, Jaber BL: Single-use versus reusable
dialyzers: the known unknowns. Clin J Am Soc Nephrol 2007; 2:
1079–1086.