

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

**Produção de biofilme por bastonetes Gram
negativos não fermentadores isolados de água
de hemodiálise.**

Beatriz Aquilino Barreto Reis

Botucatu

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

**Produção de biofilme por bastonetes Gram
negativos não fermentadores isolados de água
de hemodiálise.**

Aluna: Beatriz Aquilino Barreto Reis

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Reis, Beatriz Aquilino Barreto.

Produção de biofilme por bastonetes gram negativos isolados de água de hemodiálise / Beatriz Aquilino Barreto Reis. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21201005

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Bactérias gram-negativas. 3. Hemodiálise.

Palavras-chave: Bacilos gram negativos; Gene *rpoS*; Hemodiálise; Produção de biofilme; *Pseudomonas aeruginosa*.

RESUMO

No Brasil, 90% de pacientes com insuficiência renal crônica ou aguda dependem dos procedimentos de hemodiálise para remover produtos de degradação metabólica, excesso de água e de sais minerais do organismo, a fim de restaurar o equilíbrio ácido-base e eletrolítico. Entretanto, o processo de osmose reversa, que visa remover todos os íons da água, também remove o cloro, que exerce efeito bacteriostático sob diversas bactérias autóctones, que passam a se multiplicar na água. Entre os principais grupos dessas bactérias, estão os bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN) e os mais frequentemente associados a bacteremias, em pacientes de hemodiálise são *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*. Essas bactérias podem produzir biofilmes, o que torna sua eliminação do encanamento quase impossível. Assim, o objetivo do trabalho foi a análise de água e do dialisato, da Unidade de Hemodiálise de um Hospital Universitário, na pesquisa dos três BGNs citados. Também foram utilizadas 42 cepas previamente isoladas do mesmo local. Entre as 67 amostras de água, foram isoladas 8 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e as 50 cepas foram submetidas à pesquisa do gene *rpoS*, um dos responsáveis pela produção de biofilme. Esse gene foi observado em 20 (40%) cepas, sendo 16 (80%) *P. aeruginosa*, seguida por 3 (15%) cepas de *S. maltophilia* e 1 (5%) de *B. cepacia*. Essas cepas foram submetidas à produção de biofilme a 35°C (temperatura ótima de crescimento) e a 20°C (temperatura média da água no encanamento da Unidade de Hemodiálise), em aço inoxidável (material de muitos instrumentos cirúrgicos), PVC (matéria prima da tubulação) e plástico de poliestireno (capacidade de produção de biofilmes em diferentes materiais). Em poliestireno, somente 1 (5%) cepa de *P. aeruginosa* produziu biofilme a 35°C e a 20°C, 2 (10%) cepas foram produtoras, sendo uma de *P. aeruginosa* e uma de *S. maltophilia*. Em aço inox a 35°C, somente 2 cepas (10%) não foram produtoras, 4 (20%) foram fracamente produtoras, 5 (25%) foram moderadamente produtoras e 9 (45%) cepas fortemente produtoras de biofilme. Na análise à temperatura de 20°C todas as amostras foram classificadas como

fracamente produtoras de biofilme. Na análise da produção de biofilme em PVC, 14 cepas foram fracamente produtoras (70%) e 6 não produtoras (30%) a 20°C, enquanto que a 35°C, 15 foram fracamente produtoras de biofilme (75%) e 5 não produtoras (25%). Os responsáveis por essa Unidade devem estar sempre atentos às concentrações bacterianas, nas análises periódicas regulares, tomando as medidas cabíveis de desinfecção da tubulação, a fim de se preservar os pacientes já imunodeprimidos.

Palavras-chave: Bacilos gram negativos; Gene *rpoS*; Hemodiálise; Produção de biofilme; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUÇÃO

Desde o início da década de 60, a hemodiálise é o tratamento mais utilizado em pacientes com insuficiência renal crônica ou aguda. No Brasil, 90% desses pacientes dependem dos procedimentos de hemodiálise para remover produtos de degradação metabólica, excesso de água e de sais minerais do organismo, a fim de restaurar o equilíbrio ácido-base e eletrolítico (ALMODÓVAR et al., 2007).

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (2007), em janeiro de 2005, nos 498 centros de diálise, estimava-se em 54.311 o número de pacientes, dos quais, 89% realizavam hemodiálise, 6,7% diálise peritoneal ambulatorial contínua, 3,8% em diálise peritoneal automatizada e 0,4% em diálise peritoneal intermitente.

Nesses procedimentos, ocorre a filtração do sangue, que entra em contato com uma solução de diálise (dialisato). A água é o principal componente dessa solução, portanto a qualidade química e microbiológica são essenciais para evitar riscos adicionais aos pacientes (ALMODÓVAR et al., 2007).

Na época em que ainda se utilizava água potável na terapia de hemodiálise, Laurence e Lapierre (1995) descreveram constante contaminação bacteriana da água que compoem o dialisato. Em 1977, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA) propôs normas para a qualidade da água de hemodiálise e, em 1981, o Padrão Nacional Americano para água utilizada no tratamento foi proposto pela Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) (LAURENCE e LAPIERRE, 1995).

Os rins de um paciente com falência renal não possuem a habilidade de filtrar as impurezas do sangue (TONG et al., 2001). Assim, qualquer contaminação da água utilizada para o tratamento de hemodiálise pode causar reações adversas ao organismo. A partir da preocupação com a qualidade da água e com o surgimento de normas e padrões internacionais, desenvolveu-se tratamentos específicos, como o sistema de osmose reversa, amplamente utilizado nas unidades de hemodiálise.

A osmose reversa tem como objetivo reduzir o número de bactérias e toxinas a concentrações aceitáveis na água utilizada, determinadas pelo

padrão internacional. Montanari et al. (2009) analisou a presença de bactérias na água de um centro de hemodiálise do interior do Estado de São Paulo, isolando bactérias a partir da água do sistema de distribuição (128), das águas das máquinas (43) e do sistema de reuso (3). Entre os isolados, 32 cepas foram de bacilos Gram-positivos, 120 de bacilos Gram-negativos, 20 de cocos Gram-positivos e 11 micobactérias, o que reforça a necessidade de tratar a água utilizada na terapia.

Está comprovado que pacientes que recebem longos tratamentos de hemodiálise estão sujeitos a um maior risco de adquirir uma septicemia. Cuidados inadequados com os cateteres, contaminação de fontes de água, de desinfetantes e de medicamentos, danos na integridade da membrana de diálise e reuso da água na hemodiálise foram identificados como fontes de infecção (AMERICAN NATIONAL STANDARD FOR HAEMODIALYSIS SYSTEMS, 2004).

De acordo com a Portaria nº 518, de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, que estabelece controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano, as bactérias comumente encontradas na água própria para o consumo humano pertencem ao grupo dos coliformes, como os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, além de outros patógenos como *Legionella*, *Aeromonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* e *Burkholderia* (LECLERC E MOREAU, 2002).

Pseudomonas aeruginosa, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* são bacilos Gram-negativos, mesófilos mas com características psicrótróficas, aeróbios estritos, não fermentadores de glicose e pertencentes às famílias *Pseudomonidaceae*, *Xantomonadaceae* e *Burkholderiaceae*, respectivamente. Comumente encontradas em meios aquáticos e terrestres, essas bactérias também são conhecidas como importantes patógenos oportunistas em ambientes hospitalares. Estão associadas a muitas infecções humanas (FERRONI et al., 1998; SACCHETTI et al., 2009) principalmente em pacientes imunodeprimidos (KERR e SNELLING, 2009), já que podem colonizar meios como fluidos hospitalares e secreções humanas (Senol, 2004).

Em Setembro de 1996 ocorreu um surto Centro de Hemodiálise do Hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. Pisani et al. (2000) analisaram amostras de água e de dialisato utilizados na hemodiálise e observaram que

80% das amostras estavam contaminadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* na primeira coleta e 100% na segunda.

No Distrito Federal, o Programa de Vigilância Sanitária de Monitoramento Microbiológico da Qualidade da Água de Hemodiálise analisou 135 amostras de diferentes pontos de Unidades de Diálise das redes pública e particular. Os resultados revelaram 54% de amostras impróprias, dentre as quais 29,5% estavam positivas para *Pseudomonas* sp (REIS et al., 1998).

Durante o verão e inverno de 2003 foram analisadas 200 amostras de água de diálise provenientes de duas unidades hospitalares denominadas A e B, com resultados positivos para *Pseudomonas aeruginosa* de 14% em A e 5% em B (SIMÕES et al., 2004).

Em surtos de bacteremia ocorridos em duas unidades de hemodiálise no Brasil, a fonte de contaminação identificada foi a água contaminada, provavelmente pela colonização da membrana da osmose reversa, como resultado da limpeza inapropriada e de um vazamento do sistema de distribuição da água. Três diferentes cepas de *B. cepacia* foram identificadas nesses surtos (MAGALHÃES et al., 2003).

Orenstein et al. (2006) descreveram contaminação e infecção de bebês por *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, em uma Unidade de Tratamento Intensivo neonatal nos Estados Unidos durante o verão de 2005. Tal contaminação teve como origem os aeradores e a água utilizada nos diversos procedimentos do hospital.

Almodóvar et al. (2007) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose em 97 amostras de água tratada para diálise e 27 amostras de dialisatos, avaliadas entre junho de 2005 e dezembro de 2006. Nos resultados, detectou-se 29,6% de bactérias Gram negativas não fermentadoras de glicose nas amostras de dialisatos e 49,5% nas amostras de água tratada, sendo mais freqüente o complexo *Burkholderia cepacia* (59,0%), seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* (13,1%).

Dentre os diversos fatores de virulência das bactérias citadas, a capacidade de formar biofilme pode ser considerada o mais importante na colonização de meios e superfícies.

O biofilme é formado por colônias de células bacterianas aderidas à superfície e protegidas por polímeros extracelulares, sendo significativamente mais resistentes do que quando estão livres na água (SMITH e HUNTER, 2008). Atua na proteção da bactéria contra as defesas imunes naturais, compostos antimicrobianos, radiação e desidratação. A formação do biofilme requer auxílio de apêndices celulares, como flagelos e pili tipo IV (ABSOLOM, 1988; COSTA et al., 2006; Di-BONAVENTURA et al., 2008).

Por apresentar forte adesão e formação de biofilme em superfícies plásticas (Di-BONAVENTURA et al., 2004) e em vidro, a contaminação bacteriana nesses meios foi consideravelmente maior. Superfícies de material cirúrgico, cateteres, implantes médicos (DENTON e KERR, 1998), aparelhos de hemodiálise e próteses (SMITH e HUNTER, 2008) são os principais alvos de colonização bacteriana em ambiente hospitalar. Além disso, o biofilme também favorece a resistência dessas bactérias em encanamento dos sistemas de distribuição de água (SACCHETTI et al., 2009) e até mesmo dentro do paciente (SMITH e HUNTER, 2008). As propriedades físico-químicas de uma superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (PVCs) do que às hidrofílicas (vidro ou metais como aço inox).

Existem poucos estudos sobre a quantificação de biofilme produzido por *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *B. cepacia*. Elvers et al. (2001) descreveram um pequeno aumento no número de células de *S. maltophilia* após cultura de 48 horas e formação de biofilme. Ainda assim, tal incremento foi considerado não significativo na análise estatística.

A escassez de informação sobre o assunto reforça a necessidade de um estudo mais profundo sobre a capacidade de proliferação e resistência desses patógenos oportunistas hospitalares.

A Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP - SP (FMB) possui grande demanda de pacientes renais crônicos, que necessitam dos tratamentos oferecidos, como a terapia renal substitutiva, Hemodiálise ou Diálise Peritoneal Domiciliar. Apesar de seguir as normas de tratamento de água estabelecida pelo Ministério da Saúde, a Unidade de Diálise da FMB solicita mensalmente a análise microbiológica da água utilizada, frente ao Departamento de Microbiologia da UNESP, para

garantir sua qualidade e evitar possíveis bacteremias e septicemias nos pacientes.

O objetivo do estudo foi identificar a presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia* em amostras de água da Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da FMB, além de verificar se as cepas encontradas possuem a capacidade de produzir de biofilme em diferentes materiais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção das amostras para análises

1.1. Cepas estocadas

Foram utilizadas 42 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*, isoladas no período de Fevereiro de 2008 a Janeiro de 2009, a partir de amostras de dialisato, de água do reuso, de máquinas e do reservatório pós osmose reversa. Essas amostras foram coletadas na Unidade de Hemodiálise do Hospital das Clínicas (HC) da UNESP de Botucatu e foram mantidas congeladas a -70°C.

1.2. Coleta de amostras de água

Apesar da existência de cepas já isoladas, seria de fundamental importância o treinamento da aluna de Iniciação Científica, em relação às análises microbiológicas da água. Assim, foram realizadas mais 50 coletas de dialisato e água da Unidade de Hemodiálise do HC, até o mês de junho, para o isolamento e identificação desses três bastonetes Gram negativos não fermentadores (número de coletas suficiente para o aprendizado da aluna, em relação a análise microbiológica da água). A partir desse período, as cepas isoladas foram testadas quanto a produção de biofilme.

As amostras foram coletadas em sacos de coleta esterilizados, na Unidade de Diálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. A água será armazenada sob refrigeração até o momento do processamento em laboratório.

2. Análises microbiológicas

2.1. Preparo das amostras

Para a análise, 100 ml de cada amostra foram filtrados num sistema de filtração a vácuo, utilizando membranas esterilizadas, com poros de 0,45 µm (Millipore) (BARBENA et al., 2005; ROGUES et al., 2007).

2.2. Isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*

Todos os meios de cultura utilizados para isolamento e identificação das cepas foram da marca Difco, exceto quando especificado.

As membranas utilizadas na filtração da água foram colocadas em placas de ágar Cetrimide para o isolamento dos bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN), incubadas a 35°C, por até 48h (ROGUES et al., 2007).

2.3. Identificação dos isolados

As cepas suspeitas foram transferidas para ágar tripticase soja (TSA), a partir do qual foram realizados testes iniciais, de acordo com o Murray et al. (2007). A confirmação dessas espécies foi realizada com o auxílio do API 20 NE (Biomeriéux).

2.4. Reação em cadeia da polimerase para a pesquisa do gene *rpoS*

2.4.1. Extração e Purificação de DNA

A partir do estoque em TSA, as cepas foram cultivadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), a 35°C/24h. A seguir, 1 ml foi centrifugado a 10.000g/10 minutos. O sobrenadante era desprezado e o sedimento, ressuspenso em 1 ml de PBS (Solução Tampão de Fosfato – 0,01 M, pH 7,2). Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspenso em 200 µl de tampão de lise (50 mM Tris-H-Cl, 1 mM EDTA 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K) incubado em banho-maria a 56°C/1 hora e depois, a 95°C/10 minutos. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g/5 minutos e o sobrenadante foi usado para a reação da PCR (ARNOLD et al., 2004)

2.4.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,5 mL (Axygen) num volume total de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR

Buffer 10x (Invitrogen), 0,75 μ M de Cloreto de Magnésio (Invitrogen), 200 μ M de cada dNTP (Invitrogen), 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 10 picomoles de cada *primer* (Tabela 1), água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 μ L da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (INCQS 00230)

O par de primers utilizado codifica para o gene *rpoS*, com a seguinte seqüência: ***rpoS1***: GAAGTTCGATCCGGAGCGCGG e ***rpoS 2*** GGCAAGCGAATGGTCCGGGTT, gerando um produto de 108 pb. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>):

2.4.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Sybr Safe (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 Base Pair Ladder – Promega), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

2.5. Verificação e quantificação da produção de biofilme

Foi testada a produção de biofilme em três materiais diferentes, o aço inoxidável, cloreto de polivinila (PVC) e plástico de poliestireno. O primeiro compõe a maioria dos materiais hospitalares, o segundo é componente principal de canos de água. As cepas também foram testadas em poliestireno para a verificação da capacidade de produção de biofilme nos mais diversos materiais.

As temperaturas utilizadas foram 35°C, temperatura ótima de crescimento de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *B. cepacia* e 20°C, média da temperatura ambiente da água utilizada.

2.5.1. Adesão em aço inox e PVC

Preparo das placas para adesão em aço inox

Foram utilizados círculos (fichas) de aço inox e de PVC, com diâmetro de 1 cm, e de PVC com diâmetro de 1,3 cm. Esses materiais foram devidamente lavados, secos e acondicionados em placas de Petri, que foram autoclavadas e tinalizadas, respectivamente. A seguir, com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa.

Preparo da cultura e inoculação na placa

As cepas de bastonetes Gram negativos não fermentadores foram incubadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 35°C e 20°C por 24h. A seguir, a cultura foi diluída até 10^8 UFC de bactérias, com o auxílio do Densicheck (Biomeriëux). Alíquotas de 300 µL dessa diluição foram distribuídas, em triplicata, nas cavidades da placa e incubadas nas duas temperaturas estabelecidas, por 48 horas.

Quantificação da produção de biofilme

A seguir, as fichas foram transferidas para uma nova placa. Esse passo teve como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no plástico, ao redor das fichas de diferentes materiais. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. A seguir, o biofilme foi ressuspendido em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegura a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µl foi transferido para um microplaca de 96 poços, lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), em 540 nm.

BHI não inoculado foi semeado desde o início do teste, como controle negativo, para corrigir o valor da absorbância sendo realizada a média dos três poços.

Em aço inox e PVC, as cepas testadas foram classificadas em níveis de produção de biofilme segundo Stepanovic et al. (2000). A partir da média das três repetições (D.O.) e de acordo com a relação entre D.O. e D.O.c (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme (Quadro 1).

Relação	Interpretação
$D.O. \leq D.O.c$	não produtor
$D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$	fraco Produtor
$2 \times (D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$	moderado Produtor
$4 \times (D.O.c) < D.O$	forte Produtor

Quadro 1. Classificação das cepas em relação à produção de biofilme.

2.5.2. Adesão em plástico de poliestireno

A partir da diluição 10^8 UFC, uma alíquota de 200 μ l foi plaqueada, em quadruplicata, em microplaca de 96 poços, com fundo chato, incubadas por 48. Após período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa, após secagem em temperatura ambiente, foi colocada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), com leitura a 570 nm. TSB não inoculado foi usado como, utilizado para corrigir o valor da absorbância e foi realizada uma média dos quatro poços. As cepas que apresentaram valores resultantes dessa correção maiores que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilme (VASUDEVAN et al., 2003).

2.6. Verificação da produção biofilme pelo Calcofluor

O calcofluor é uma substância que torna fluorescente matriz extracelular com composição polissacarídica ou de celulose. Assim, após a formação de biofilme, como acima descrito, a peça de aço inox ou PVC foi transferida para

uma lâmina e uma gota de calcoflour (Sigma) (0,05%) foi adicionada. Após incubação por 10 minutos, no escuro, a peça foi observada sob luz UV (comprimento de onda de 430nm).

RESULTADOS

Entre as 52 cepas previamente identificadas e mantidas a -70°C , no período de fevereiro de 2008 a janeiro de 2009, 42 foram recuperadas, sendo 18 cepas (42,9%) de *P. aeruginosa*, seguida de *S. maltophilia* com 13 cepas (31%) e *B. cepacia* com 11 cepas (26,2%).

No período de abril a junho de 2010, foram realizadas 67 coletas de água e dialisato da Unidade de Hemodiálise do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Todos os resultados foram repassados para os responsáveis dessa Unidade. Essas amostras geraram 112 cepas suspeitas, das quais, após identificação, 8 foram confirmadas como *P. aeruginosa*.

Assim, 50 cepas foram submetidas ao teste de PCR para identificação da presença do gene *rpoS*, um dos responsáveis pela produção de biofilme e 20 cepas (40%) foram positivas para a presença desse gene (Figura 1).

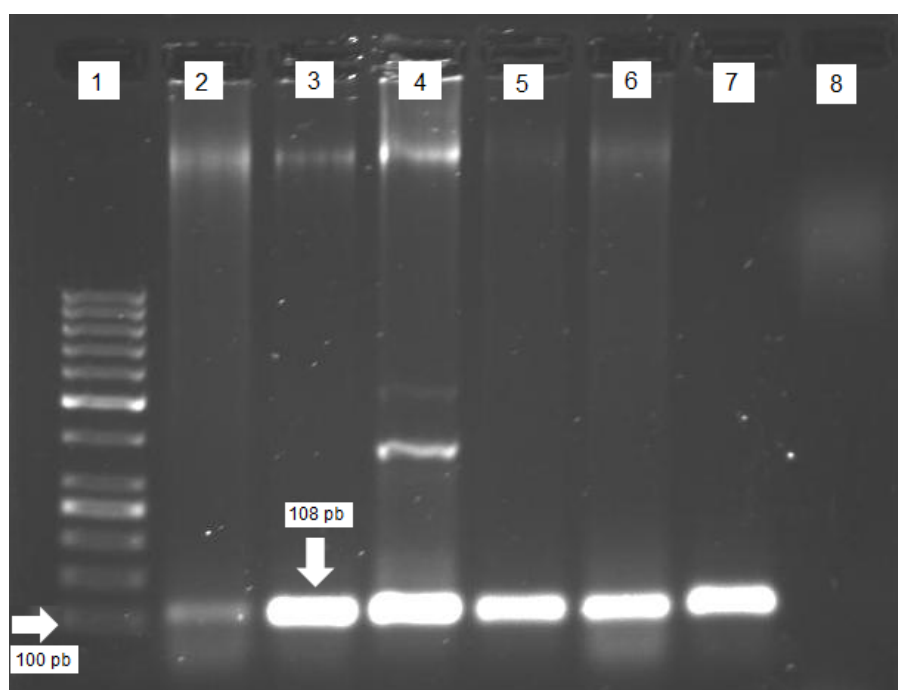


Figura 1. Poço 1: Marcador molecular de 100pb; 2: *P. aeruginosa* ATCC 9027; 3. a 7. cepas positivas para o gene *rpoS* pb; 8: controle negativo.

Considerando-se as 20 cepas positivas para o gene *rpoS*, 16 (80%) eram *P. aeruginosa*, seguida por 3 (15%) cepas de *S. maltophilia* e 1 (5%) de *B. cepacia* (Figura 2).

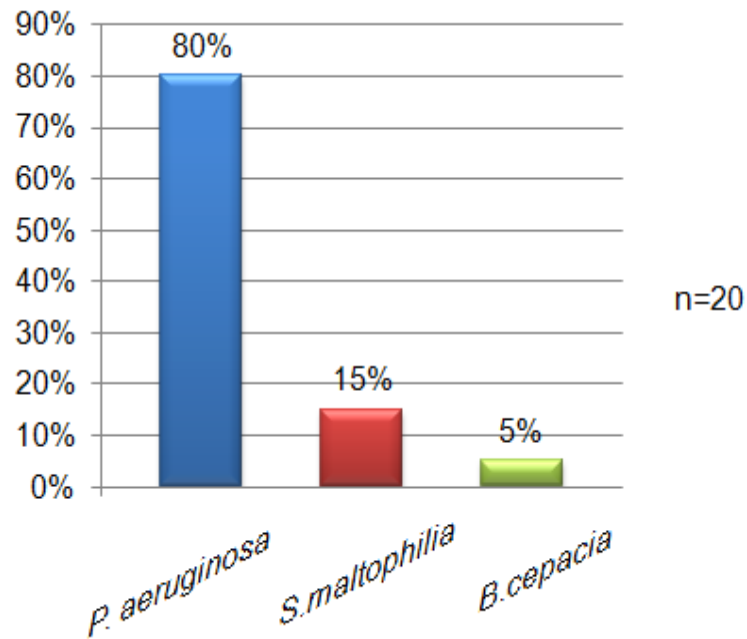


Figura 2. Cepas de bastonetes Gram negativos positivas para o gene de produção de biofilme.

O ensaio de produção de biofilme foi realizado em poliestireno, aço inox e PVC com as 20 amostras positivas para o gene *rpoS*, no teste da PCR. A Figura 3 mostra a microplaca com as cepas semeadas, inclusive com a presença de pigmentos

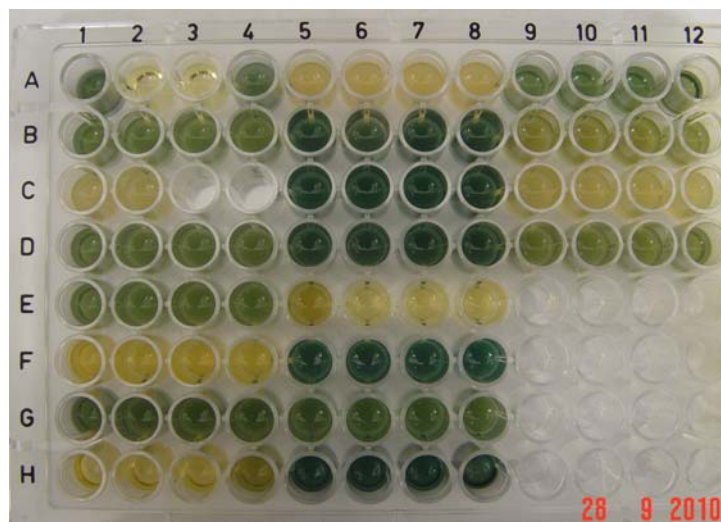


Figura 3. Microplaca de poliestireno, semeada para a produção de biofilme

Em poliestireno, somente 1 (5%) cepa de *P. aeruginosa* produziu biofilme a 35°C. Já a 20°C, 2 (10%) cepas foram produtoras, sendo uma de *P. aeruginosa* e uma de *S. maltophilia*.

Pela Tabela 1, pode-se observar que, em aço inox a 35°C, 2 cepas (10%) não foram produtoras, 4 (20%) foram fracamente produtoras, 5 (25%) foram moderadamente produtoras e 9 (45%) cepas fortemente produtoras de biofilme. Na análise à temperatura de 20°C todas as amostras foram classificadas como fracamente produtoras de biofilme. Na análise da produção de biofilme em PVC, 14 cepas foram fracamente produtoras (70%) e 6 não produtoras (30%) a 20°C, enquanto que a 35°C, 15 foram fracamente produtoras de biofilme (75%) e 5 não produtoras (25%). Apesar da produção de biofilme a 20°C, no aço inox, ter sido classificada como fraca, todas as cepas testadas foram positivas, o que não ocorreu em mais nenhum binômio material/temperatura.

As Figuras 4a e 4b ilustram a produção de matriz extracelular, provavelmente alginato, pelas cepas de BGNs.

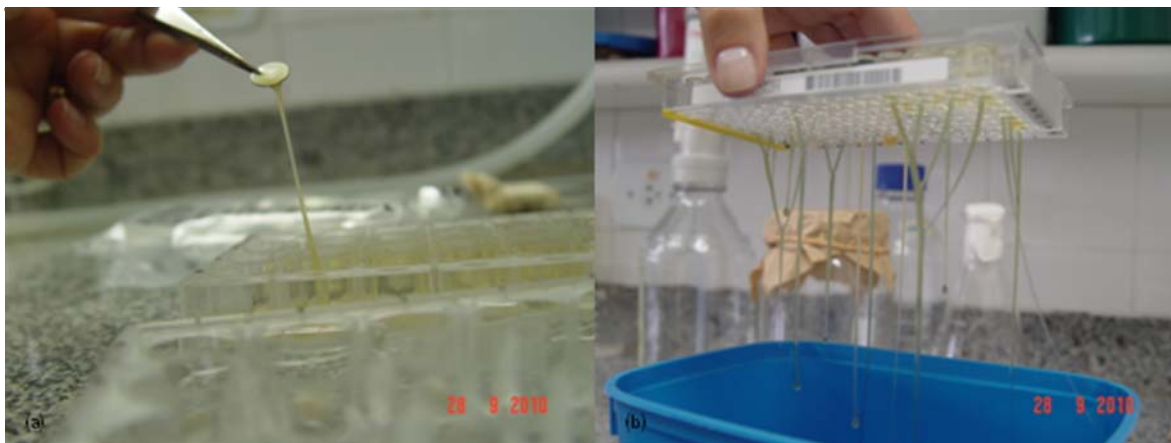


Figura 4a. Produção de matriz extracelular nas fichas de aço inox; 4b. produção de matriz extracelular, em microplaca de poliestireno;

Tabela 1. Classificação dos bacilos gram negativos não fermentadores, possuidores do gene *rpoS*, quanto à capacidade de produção de biofilme em aço inox e PVC, a 20°C e 35°C.

	Aço inox N(%)		PVC N(%)	
	20°C	35°C	20°C	35°C
Forte produtor	-	9 (45)	-	-
Moderado produtor	-	5 (25)	-	-
Fraco produtor	20 (100)	4 (20)	14 (70)	15 (75)
Não produtor	-	2 (10)	6 (30)	5 (25)

PVC: cloreto de polivinila

A Tabela 2 apresenta os resultados da produção de biofilme, entre as três espécies de BGN envolvidas, independente do grau de produção.

Tabela 2. Diferentes espécies de bacilos gram negativos não fermentadores, possuidores do gene *rpoS*, submetidos à produção de biofilme a 20°C e 35°C em poliestireno, aço inox e PVC.

	N	Poliestireno N(%)		Aço inox N(%)		PVC N(%)	
		20°C	35°C	20°C	35°C	20°C	35°C
<i>P. aeruginosa</i>	16	1(6,3)	1(6,3)	100	15(93,8)	11(68,8)	12(75)
<i>S. maltophilia</i>	3	1(33,3)	0	100	2(66,6)	2(66,6)	2(66,6)
<i>B. cepacia</i>	1	0	0	100	100	100	100

PVC: cloreto de polivinila

Para ilustrar a produção de biofilme, foram coradas com Calcofluor, 4 cepas, sendo 3 em aço inox (fraco, forte e moderado produtor) e 1 em PVC. As amostras foram analisadas em microscópio com luz ultravioleta com crescimento de 24h, 48h e 72h (Figuras 5, 6, 7 e 8). O Calcofluor é uma substância que cora os polímeros extracelulares que compõem o biofilme, e ao

observar sob luz ultravioleta, essa coloração apresenta-se brilhante. As análises em aço inox apresentaram coloração em todos os crescimentos (24h, 48h e 72h), enquanto que em PVC só foi identificada a presença do biofilme por coloração em crescimento de 72h.

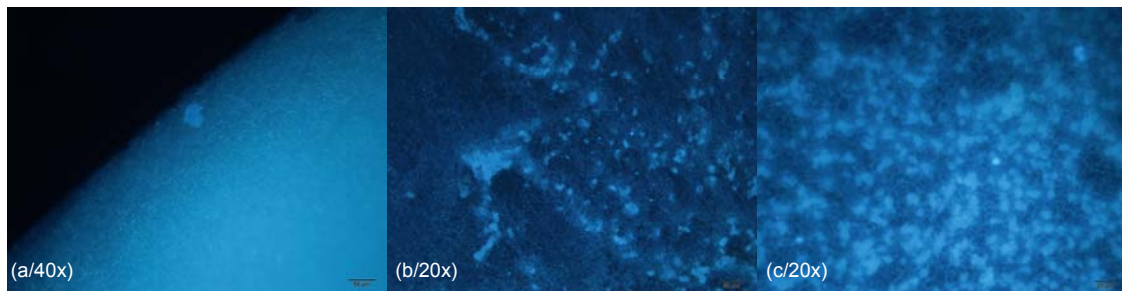


Figura 5. Cepa fortemente produtora de biofilme em aço inox corada com Calcofluor e observada em microscópio sob luz ultravioleta, com crescimento de 24h (a), 48h (b) e 72h (c).

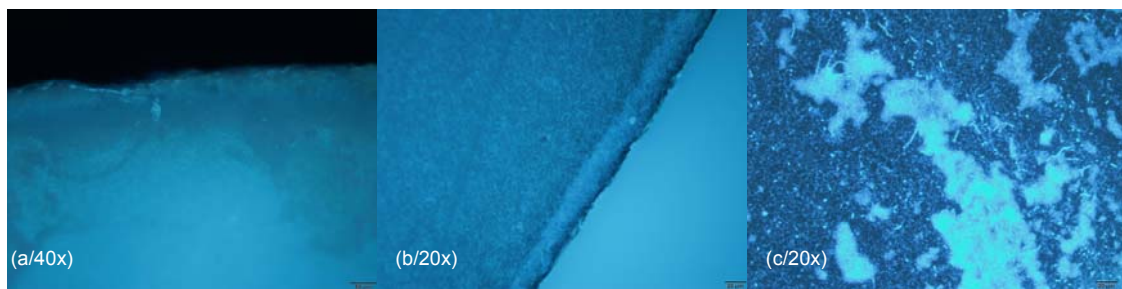


Figura 6. Cepa fracamente produtora de biofilme em aço inox corada com Calcofluor e observada em microscópio sob luz ultravioleta, com crescimento de 24h (a), 48h (b) e 72h (c).

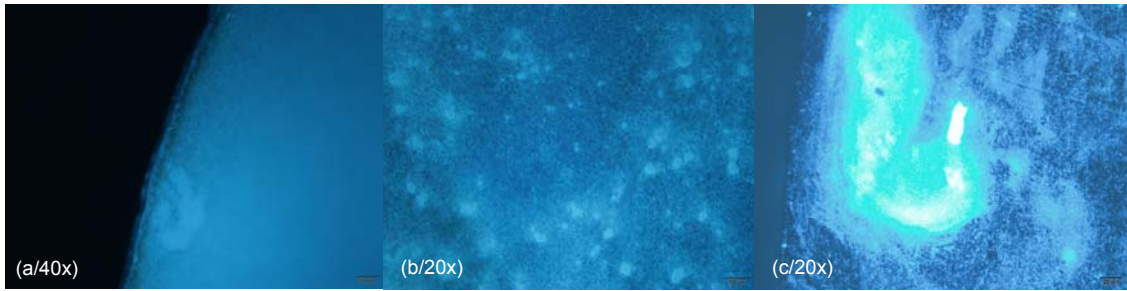


Figura 7. Cepa moderadamente produtora de biofilme em aço inox corada com Calcofluor e observada em microscópio sob luz ultravioleta, com crescimento de 24h (a), 48h (b) e 72h (c).

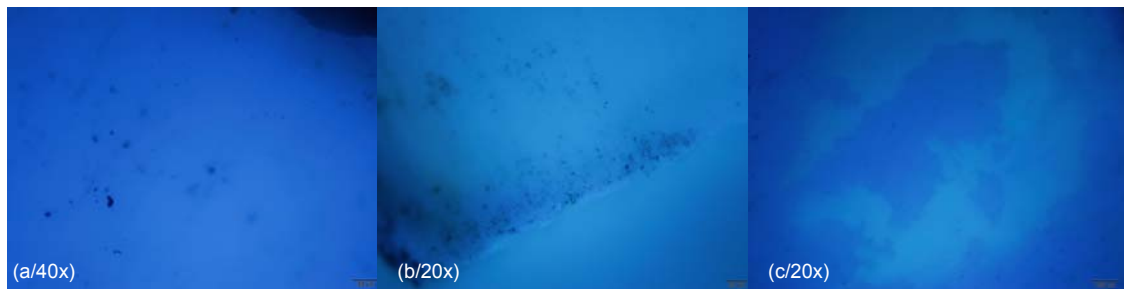


Figura 8. Cepa produtora de biofilme em PVC corada com Calcofluor e observada em microscópio sob luz ultravioleta, com crescimento de 24h (a), 48h (b) e 72h (c).

DISCUSSÃO

Os micro-organismos autóctones existem naturalmente na água, antes que essa tenha sido submetida a tratamentos antimicrobianos. Os gêneros mais comumente observados são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* e *Bacillus* (SANT'ANA et al., 2003). Na hemodiálise, o processo de osmose reversa remove todos os íons presentes na água, inclusive o cloro, usado no tratamento e que exerce efeito bactericida e/ou bacteriostático sob vários micro-organismos e assim, esses micro-organismos autóctones voltam a ser detectados.

Bastonetes Gram negativos não fermentadores estão distribuídos de maneira ubiqüitária, sendo encontrados em amostras de água clorada, não cloradas e minerais. No presente estudo, foram isoladas 8 (11,9%) cepas de *P. aeruginosa* em 67 amostras de água de hemodiálise.

Menezes et al. (2002) observaram frequência semelhante, de 10,2% em amostras de água de um complexo hospitalar na Universidade Federal do Ceará. Em amostras de piscinas públicas, Barbena et al. (2005) observaram 7% e em 2006, Guerra et al. (2006) encontraram BGN em 10,41% das amostras de água potável analisadas.

Dentre as cepas previamente estocadas, isoladas de amostras de água e dialisato da mesma Unidade de Hemodiálise onde ocorreram as novas coletas, foram identificadas cepas de *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *B. cepacia*. Trautmann et al. (2001) relataram altas porcentagens de *P. aeruginosa*, analisando amostras de água de leitos de UTI e identificando 68,1% de *P. aeruginosa*. Magalhães et al. (2003) demonstraram a presença do complexo *B. cepacia* em de 5,83% das amostras.

Bugno et al. (2009) encontraram 74,7% de positividade para bacilos gram negativos não fermentadores, ao analisarem amostras de água de hemodiálise. Dentre as 17 espécies identificadas, o complexo *Burkholderia cepacia* foi a mais prevalente (59%), seguido de *S. maltophilia* (13,1%) e *P. aeruginosa* (10,6%). Segundo os autores, esse grupo, quando presentes em água tratada para diálise, pode aumentar o risco de ocorrência de endotoxinas bacterianas em nível acima do estabelecido pela legislação vigente, o que

sinaliza a necessidade de revisão e adoção de parâmetros adequados quanto a presença de microrganismos indicadores, com a finalidade de garantir a segurança do tratamento dialítico.

O biofilme promove proteção que permite a sobrevivência das bactérias em ambientes com condições desfavoráveis. As células protegidas pelo biofilme podem rapidamente se multiplicar e dispersar. Após adesão e crescimento dos micro-organismos infecciosos em tecidos ou órgãos, a camada de biofilme protege a colônia contra o sistema de defesa do hospedeiro e contra antibióticos. (ANWAR et al., 1992). As culturas de biofilme, inclusive de *P. aeruginosa*, são mais resistentes do que o crescimento de células livres, sendo que as razões para essa resistência extrema ainda não são claras (POIRELA et al., 1999).

Whiteley et al. (2000) relataram que o gene *rpoS* regula vários outros genes, como os produtores de biofilme, produtores de alginato extracelular e de exotoxina A. As bactérias que possuem esse gene podem expressar fenotipicamente a produção de biofilme (SUH et al., 1999; WHITELEY et al., 2001)

A partir dos resultados de Suh et al. (1999), pode-se concluir que o gene *rpoS* pode exercer diferentes papéis na formação de biofilme por *E. coli* e por *P. aeruginosa*, sendo um regulador geral das respostas a condições adversas. Uma mutação induzida no gene *rpoS* afeta diretamente as funções de *P. aeruginosa*, inclusive o acúmulo de fatores de virulência, respostas a condições adversas e as propriedades de formação de biofilme (SUH et al., 1999; XU et al., 2001), além da susceptibilidade a antibióticos (WHITELEY et al., 2001).

A demonstração feita por Xu et al. (2001) sobre a expressão do gene *rpoS* e acúmulo de biofilmes de *P. aeruginosa* explica porque esses biofilmes são tão resistentes a agentes antimicrobianos e podem estabelecer infecções persistentes.

Muitos efeitos da deleção do gene *rpoS* foram observados por Adams et al. (1999). Isso inclui diferença na densidade das células e na estrutura do biofilme. Uma possível explicação para esse fenômeno é que o gene *rpoS* só é expressado durante o crescimento do biofilme. A deleção de *rpoS* altera a

organização e a densidade das células, o que confirma a importância da expressão do gene *rpoS* em populações produtoras de biofilme.

As análises realizadas para produção de biofilme em aço inox, microplaca e PVC demonstraram cepas produtoras de biofilme. A intensidade da produção, analisada em aço inox, reflete a capacidade de contaminação de utensílos médicos e da água de hemodiálise, assim como dos tecidos dos pacientes sujeitos a tratamentos de diálise. Assim, quanto maior a intensidade de produção de biofilme, maior será a virulência da cepa, causando infecções por permanência da bactéria no organismo, já que está protegida pelo biofilme.

As 3 cepas que também produziram biofilme em microplaca de poliestireno, além do aço inox e PVC demonstram a capacidade de produção de biofilme nas mais variadas superfícies, o que aumenta ainda mais o risco de infecções hospitalares pela presença ambiental do patógeno.

Foram identificadas 15 cepas (75%) fracamente produtoras de biofilme a 35°C e 14 cepas (70%) a 20°C, em PVC. Essas análises são de extrema importância, já que os canos do sistema de distribuição da água no centro de hemodiálise são fabricados desse material e estão sujeitos à contaminação e permanência dos patógenos produtores de biofilme.

Várias tentativas de limpeza foram realizadas no centro de hemodiálise do Hospital da Faculdade de Medicina de Botucatu, inclusive entre os períodos de coleta. Porém, a presença de patógenos oportunistas ainda não foi erradicada. Os canos que levam a água de diálise são expostos para facilitar a troca quando são identificadas contaminações irreversíveis. A capacidade de produção de biofilme por *P. aeruginosa* em PVC foi constatada como fraca pelo presente estudo. Entretanto, deve ser ressaltado que a mínima formação de biofilme é suficiente para perpetuar esse microrganismo naquele habitat, além de poder elevar consideravelmente a concentração desses patógenos oportunistas na água, causando aumento no número de bacteremias entre os pacientes que se submetem ao tratamento de hemodiálise.

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que os bastonetes Gram negativos não fermentadores são frequentemente isolados, ou

reisolados, nessa Unidade de Hemodiálise, provavelmente devido à formação de biofilme, o que dificulta a remoção definitiva desses micro-organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSOLOM, D. The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 287–298, 1988.

ADAMS, J.L. et al. Impact of *rpoS* Deletion on *Escherichia coli* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 09, p. 4285-4287, 1999.

ALMODÓVAR, A. A. B. et al. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 172-175, 2007.

AMERICAN NATIONAL STANDARD FOR HAEMODIALYSIS SYSTEMS. Arlington, VA: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2004 [ANSI/AAMI no. RD52].

ANWAR H. et al. Effective use of antibiotics in the treatment of biofilm-associated infections. **ASM News**, v. 58, p. 665–668, 1992.

Arnold, T et al. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine series B**, v. 51, n. 10, p. 459-463, 2004.

BARBENA, J. et.al. *Pseudomonas aeruginosa* in public swimming pools and bathroom water of patients with cystic fibrosis. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 4, n. 4, p. 227-231, 2005.

BRYERS, J. D. Bacterial biofilms. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 4, p.197–204, 1993.

HOYLE, B. D *et.al.* Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. **Prog. Drug Res**, v. 37, p. 91–105, 1991.

BUGNO, A. et.al. Detecção de bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNF) em água tratada para diálise e o impacto sobre o conteúdo de endotoxinas bacterianas. **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. ResumID:583-1, 2009.

COSTA, G. F. et al. Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 346-351, 2006.

DENTON, M.; KERR, K. G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 57-80, 1998.

DI-BONAVENTURA, G. et al. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 151-160, 2004.

DI-BONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.

ELVERS, K. T. et al. Binary culture biofilmformation of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 178-183, 2001.

FERRONI, A. et al. Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 39, p. 301-307, 1998.

FRANK, K. L.; PATEL, R. Intravenously administered pharmaceuticals impact biofilm formation and detachment of *Staphylococcus lugdunensis* and other staphylococci. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 9-16, 2008.

GUERRA, N. M. M. et.al. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 1, 2006.

KERR, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 338-344, 2009.

LAURENCE, R.; LAPIERRE, S. Quality of Hemodialysis Water: A 7-Year Multicenter Study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 25, n. 5, p. 738-750, 1995.

LECLERC, H.; MOREAU, A. Microbiological safety of natural mineral water. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 207-222, 2002.

MAGALHÃES, M. et.al. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**, v.54, p.120–123, 2003.

MENEZES, E. A. et.al. Cepas de pseudomonas resistentes a antimicrobianos testados no Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Bras. Anal. Clin**; v.34, n.1, p. 27-30, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. PORTARIA N.º 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004

MONTANARI, L. B. et al. Contaminação microbiológica no sistema de distribuição de água de um centro de hemodiálise. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo [online]**, v. 51, n. 1, p. 37-43, 2009.

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. *ASM Press, Washington*, p. 1267, 2007.

ORENSTEIN, P. et al. Infection Control and the Plumber: Neonatal ICU Outbreak of *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* Traced to Contaminated Water Tap “Aerators”. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 5, p. E73-E74, 2006.

PISANI, B. et al. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na unidade de hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1/2, p. 51-56, 2000.

POIRELA, L. et al. Extended-spectrum -lactamase-producing strain of *Cinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. **J Antimicrob Chemother**, v.43, p. 157-158, 1999.

REIS, J. D. A. P. et al. Qualidade bacteriológica da água para hemodiálise do Distrito Federal. **Revista saúde Distrito Federal**, v. 9, n. 2, p. 39-43, 1998.

ROQUES, A. et al. Contribution of tap water to patient colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, v. 67, p. 72-78, 2007.

SACCHETTI, R. et al. Control of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of microfiltered water dispensers with peracetic acid and hydrogen peroxide. **International Journal of Food Microbiology** , v. 132, n. 2-3, p. 162-166, 2009.

SANT’Ana, A. et.al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.190-194, 2003.

SBN - SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Perfil da Doença Renal Crônica: O Desafio Brasileiro. 2007. 3 p. Disponível em: < Renal_Cronica.pdf > Acesso em: 10/03/2010 abril.

SENOL, E. *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 1-7, 2004.

SHANKS, M. Q. R. et al. Heparin Stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 8, p. 4596–4606, 2005.

SIMÕES, M. et al. Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63 n. 2, p. 224-231, 2004.

SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 966-973, 2008.

STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, p. 339–343, 2003.

SUH, S-J. et.al. Effect of *rpoS* Mutation on the Stress Response and Expression of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, n. 13, p.3890-3897,1999.

TONG, M. et al. Water treatment for hemodialysis. **Hong Kong Journal of Nephrology**, v. 3, n. 1, p. 7-14, 2001.

TRAUTMANN, M. et.al. Tap Water Colonization with *Pseudomonas aeruginosa* in a Surgical Intensive Care Unit (ICU) and Relation to *Pseudomonas* Infections of ICU Patients. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 22, n. 1, p. 49-52, 2001.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003.

WHITELEY, M. et.al. Regulation of Quorum Sensing by *rpoS* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 15, p. 4356-4360, 2000.

WHITELEY, M. et.al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v.413, letters to nature, 2001.

XU, K.D. et.al. Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, *rpoS*, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Federation of European Microbiological Societies**, v.199, p. 67-71, 2001.