UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controles Farmacêuticos

Utilização de método microbiológico rápido para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise: técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência

ELLEN GAMEIRO HILINSKI

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Produção e Controles Farmacêuticos

Utilização de método microbiológico rápido para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise: técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência

ELLEN GAMEIRO HILINSKI

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

São Paulo
2019

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.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Hilinski, Ellen Gameiro
H644u Utilização de método microbiológico rápido para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise: técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência / Ellen Gameiro Hilinski. -- São Paulo, 2019.
108p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador: Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli

1. Fármaco : Controle de qualidade 2. Hemodiálise. 3. Água tratada. 43. Bactérias heterotróficas. 5. Fluorescência. I. T. II. Pinto, Terezinha de Jesus Andreoli, orientador.

615.19015 CDD

Ellen Gameiro Hilinski

Utilização de método microbiológico rápido para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise: técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto
Orientador/Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

_____

4º examinador

São Paulo,_____de_____de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos modelos em que procuro me espelhar sempre, meus pais, que, distintas vezes renunciaram aos seus sonhos para realizar os meus, apoiando-me em todas as ocasiões, orientando-me e reforçando diariamente os valores de educação eética.

Aos meus irmãos, que me incentivam a lutar por meus sonhos sempre e a agir pelo que é certo.

À Professora Dr.ª Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, minha orientadora, pela confiança, pelo incentivo contínuo à busca de novos conhecimentos, pelasdiscussões frente aos desafios analíticos, bem como pela leitura e correção dos textos.

À Dr.ª Adriana Bugno, Diretora Técnica do Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do Instituto Adolfo Lutz, por trabalhar sobre o projeto a fim de obter a aprovação junto à FAPESP para o financiamento do projeto, pelo auxílio técnico durante a condução do projeto e pela paciência durante as discussões para planejamento da etapa analítica.

À Adriana Almodóvar, Diretora Técnica do Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança do Instituto Adolfo Lutz, por me autorizar a frequentar as disciplinas do programa, pelo conhecimento técnico partilhado e por permitir que a equipe técnica do laboratório me auxiliasse na execução deste projeto.

Aos amigos Fernando Pontes de Lima e Silva, Janaína Antonio de Vecchio e Maricélia Navarro Pinheiro Flores, pelos inúmeros auxílios durante as etapas de preparação de materiais e execução dos ensaios. Vocês foram incansáveis, me apoiando durante todo o período. A confiança e o carinho de vocês certamente foi decisivo para conduzir as atividades com mais tranquilidade.

Às pesquisadoras Blanca Elena Ortega Markman, Eliana Della Coletta Yudice, Fernanda Fernandes Farias, Helena Miyoco Yano, Luz Marina Trujillo, Maria Regina Walter Koschtschak e Valéria Adriana Pereira Martins, do Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes do Instituto Adolfo Lutz pelos incentivos e apoio diário.

Aos colaboradores do Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança e do Núcleo de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio no preparo de materiais e insumos utilizados durante o projeto.

Aos professores Dr. André Rolim Baby, Dra. Marina Ishii, Dr. Felipe Rebello Lourenço, Dra. Telma M. Kaneko, Dra. Vladi O. Consiglieri, Dra. Irene Satiko Kikuchi e Ms. Nívia Maria Rodrigues Fernandes Marcello, por todo conhecimento compartilhado, pela solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades durante as disciplinas do programa.

À Profª. Dra. Irene Satiko Kikuchi e à Profª. Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres, que aceitaram compor a minha banca de qualificação, pelas sugestões e apontamentos aos quais tentarei implementar na versão definitiva do texto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro destinado ao projeto.

Com vocês, divido a alegria desta experiência.

RESUMO

HILINSKI, E.G. **Utilização de método microbiológico rápido para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise: técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência**. 2019. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O monitoramento da qualidade da água de diálise caracteriza uma importante ferramenta para a tomada de decisões quando resultados laboratoriais insatisfatórios são disponibilizados em curto período de tempo. Os inconvenientes relacionados ao tempo de espera para a obtenção dos resultados têm conduzido à busca de métodos microbiológicos alternativos que permitam obter dados exatos, precisos e em menor tempo do que os obtidos por métodos clássicos. Este projeto teve por finalidade avaliar o desempenho do método microbiológico alternativo para a contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise através da técnicade detecção microbiana pelo uso de fluorescência. Inicialmente foi realizada a determinação do tempo mínimo de incubação para obtenção de valores de contagem confiáveis pelo método alternativo, seguido pela avaliação de desempenho do método contemplando todos os parâmetros estabelecidos em compêndios nacionais e internacionais e a demonstração da equivalência do métodoalternativo frente ao método tradicional, através da avaliação de 23 amostras de água tratada para diálise. Os resultados demonstraram que o método alternativo permite a quantificação de bactérias heterotróficas após 40 horas de incubação, comexatidão e precisão para o range de 5 a 100 UFC/placa, resultando em uma redução de aproximadamente 67% do tempo atualmente empregado no método tradicional. Portanto, a técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência se mostrou uma opção viável para a implementação de um método microbiológico rápido para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise.

Palavras-chaves: Hemodiálise. Água tratada. Bactérias heterotróficas. Fluorescência.

ABSTRACT

HILINSKI, E.G. **Use of a rapid microbiological method for the enumeration of heterotrophic bacteria in treated water for dialysis: microbial detection technique by fluorescence**. 2019. 108f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Monitoring the quality of dialysis water is an important tool for decision-making when unsatisfactory results are available in a short period of time. The drawbacks related to waiting time for obtaining results have led to the search for alternative microbiological methods that allow accurate data to be obtained in less time than those obtained by classical methods. This project aimed to evaluate the alternative microbiological method performance for the heterotrophic bacteria counts in dialysis treated water through the microbial detection technique using fluorescence. Initially, the determination of the minimum incubation time to obtain reliable count values by the alternative method was performed, followed by the performance evaluation of the method, considering all the parameters established in national and international compendiums and demonstrating the equivalence of the alternative method to the traditional method, through the evaluation of 23 samples of dialysis treated water. The results demonstrated that the alternative method allows quantification of heterotrophic bacteria after 40 hours of incubation, with accuracy and precision for the range of 5 to 100 CFU/plate, resulting in a reduction of approximately 67% of the time currently used in the traditional method. Therefore, the microbial detection technique using fluorescence showed a viable option for the implementation of a rapid microbiological method for the heterotrophic bacteria counts in samples of treated water for hemodialysis.

Keywords: Hemodialysis. Treated water. Heterotrophic bacteria. Fluorescence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Presença de biofilme em tubulação de PVC integrante do sistema de tratamento de água 39

Figura 2 - Unidades de hemodiálise em conformidade com os padrões de qualidade de água para hemodiálise no período de 2010 a 2016.....41

Figura 3 - Perfil de resultados microbiológicos insatisfatórios de amostras de água tratada para diálise coletadas em unidades de diálise localizadas no Estado de São Paulo, Brasil, de 2010 a 2016 42

Figura 4 - Componentes do sistema Milliflex® Quantum.....50

Figura 5 - Etapas realizadas na detecção microbiana pelo uso de fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum 51

Figura 6 – Preparo da suspensão microbiana padronizada de *Pseudomonas aeruginosa* 56

Figura 7 – Resumo da etapa experimental para avaliação de desempenho 61

Figura 8 – Estudo de R&R: Carta R – *Staphylococcus aureus* 79

Figura 9 – Estudo de R&R: Carta R – *Burkholderia cepacia*..... 80

Figura 10 – Estudo de R&R: Carta R – *Escherichia coli* 80

Figura 11 – Estudo de R&R: Carta R – *Pseudomonas aeruginosa* 81

Figura 12 - Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus*: Fluorescência X Método Tradicional.....82

Figura 13 - Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus:* Viabilidade X Método Tradicional 83

Figura 14 - Análise de regressão linear para *Burkholderia cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional 83

Figura 15 - Análise de regressão linear para *Burkholderia cepacia:* Viabilidade X Método Tradicional 84

Figura 16 - Análise de regressão linear para *Escherichia coli*: Fluorescência X Método Tradicional 84

Figura 17 - Análise de regressão linear para *Escherichia coli:* Viabilidade X Método Tradicional 85

Figura 18 - Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa*: Fluorescência X Método Tradicional 85

Figura 19 - Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa:* Viabilidade X Método Tradicional 86

Figura 20 - Análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional 86

Figura 21 - Análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Viabilidade X Método Tradicional 87

Figura 22 - Gráficos de resíduos da análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional 88

Figura 23 - Gráficos de resíduos da análise de regressão linear *contemplando S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Viabilidade X Método Tradicional 89

Figura 24 – Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Staphylococcus aureus*..... 93

Figura 25 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Burkholderia cepacia*.....94

Figura 26 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Escherichia coli* 94

Figura 27 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Pseudomonas aeruginosa*.....95

Figura 28 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para as amostras de água tratada para diálise.....95

Figura 29 – Teste de equivalência entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional na etapa 2 96

Figura 30 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para as amostras de água tratada para diálise.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrão microbiológico da água para consumo humano.....28

Tabela 2 - Padrão de qualidade químico definido pela legislação brasileira vigente para água de hemodiálise 32

Tabela 3 - Padrão de qualidade microbiológico adotado por distintos compêndios e órgãos regulatórios para a água de hemodiálise.....34

Tabela 4 – Meios de cultura preconizados pelos compêndios oficiais para a enumeração de bactérias heterotróficas em água para diálise 45

Tabela 5 - Parâmetros de validação para métodos microbiológicos alternativos 59

Tabela 6 – Resultados da recuperação de fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum 69

Tabela 7 – Resultados da recuperação de viabilidade através do sistema Milliflex® Quantum 69

Tabela 8 - Resultados de exatidão obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=7) 72

Tabela 9 - Resultados de exatidão obtidos para *Escherichia coli* (n=7) 72

Tabela 10 - Resultados de exatidão obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=7).....72

Tabela 11 - Resultados de exatidão obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=7) .73

Tabela 12 – Resultados de precisão obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=7) 76

Tabela 13 - Resultados de precisão obtidos para *Escherichia coli* (n=7) 76

Tabela 14 - Resultados de precisão obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=7).....76

Tabela 15 - Resultados de precisão obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=7) .76

Tabela 16 – Coeficientes de variação obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=6) ...77

Tabela 17 – Coeficientes de variação obtidos para *Escherichia coli* (n=6).....77

Tabela 18 – Coeficientes de variação obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=6) 77

Tabela 19 - Coeficientes de variação obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=6)78

Tabela 20 – Resultados do estudo R&R para precisão intermediária com os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6) 78

Tabela 21 - Resultados da análise de regressão para as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente as contagens obtidas pelo método tradicional para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=7) 88

Tabela 22 - Resultados do estudo de limite de detecção obtidos para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=7) 91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMI	*Association for the Advancement of Medical Instrumentation*
ANSI	*American National Standards Institute*
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	*American Type Culture Collection*
CDC	*Center for Diseases Control and Prevention*
CFDA-SE	Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína
CFSE	Éster de succinimidil de carboxifluoresceína
CV	Coeficiente de variação
CVS	Centro de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EP	Farmacopeia Européia
FB	Farmacopeia Brasileira
GVS	Grupo de Vigilância Sanitária
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ISO	*International Organization for Standardization*
MS	Ministério da Saúde
NA	Não aplicável
NCTC	*National Collection of Type Cultures*
PCA	*Plate Count Agar*
PDA	*Parenteral Drug Association*
PEX	Polietileno reticulado
PVC	Policloreto de vinila
PVDF	Ffluoreto de polivinilideno
R2A	*Reasoner's 2 Agar*
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
SP	São Paulo
TGEA	*Tryptone Glucose Extract Agar*
TSA	*Trypticase Soy Agar* (Ágar Caseína de Soja)
TOST	Two one-sided test (Teste T duplo uni-caudal)
UE	Unidades de Endotoxina
UFC	Unidade Formadora de Colônia

USP	Farmacopeia Americana
VMP	Valor máximo permitido
VNC	Viáveis não cultiváveis

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
ºC	Grau Celsius
%	Porcentagem
mg/L	Miligrama por litro
Log_{10}	Logaritmo na base 10
US$	Dólar americano
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
EU/mL	Unidades de Endotoxina por mililitro
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônia por grama
µm	Micrômetro
mL	Mililitro
R^2	Coeficiente de correlação
% (v/v)	Percentual volume / volume
% (p/v)	Percentual massa / volume
h	Horas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 OBJETIVOS 20
2.1 Objetivos gerais 20
2.2 Objetivos específicos 20
3 REVISÃO DA LITERATURA 21
3.1 Doença renal crônica 21
3.2 Hemodiálise 21
3.3 Água potável 22
3.3.1 Avaliação química 24
3.3.2 Avaliação microbiológica 26
3.4 Água para hemodiálise 30
3.4.1 Avaliação química 31
3.4.2 Avaliação microbiológica 33
3.5 Mecanismos de sobrevivência das bactérias em sistemas de tratamento de água 36
3.5.1 Estado viável mas não cultivável 36
3.5.2 Formação de biofilme 37
3.6 Monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise 39
3.6.1 Limites de alerta e ação 42
3.6.2 Enumeração de bactérias heterotróficas 43
3.7 Métodos microbiológicos alternativos 47
3.7.1 Técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência 49
3.7.2 Validação de métodos microbiológicos alternativos quantitativos 52
4 MATERIAL E MÉTODOS 53
4.1 Material 53
4.2 Métodos 54
4.2.1 Etapa 1: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum 55
4.2.1.1 Preparo das suspensões microbianas 55
4.2.1.1.1 *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743) 55

4.2.1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) 55
4.2.1.2 Metodologia tradicional 56
4.2.1.3 Metodologia alternativa 57
4.2.1.4 Critérios de aceitação 58
4.2.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho 59
4.2.2.1 Delineamento experimental 59
4.2.2.2 Metodologia tradicional 62
4.2.2.3 Metodologia alternativa 63
4.2.2.4 Critérios de aceitação 63
4.2.2.4.1 Exatidão 64
4.2.2.4.2 Precisão 64
4.2.2.4.2.1 Precisão intermediária 64
4.2.2.4.3 Linearidade 65
4.2.2.4.4 Especificidade 65
4.2.2.4.5 Limite de Detecção 66
4.2.2.4.6 Limite de Quantificação 66
4.2.2.4.7 Intervalo 66
4.2.2.4.8 Robustez 66
4.2.3 Etapa 3: Equivalência 67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
5.1 Etapa 1: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum 68
5.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho 70
5.2.1 Exatidão 71
5.2.2. Precisão 75
5.2.2.1 Precisão intermediária 76
5.2.3 Linearidade 81
5.2.4 Especificidade 89
5.2.5 Limite de detecção 90
5.2.6 Limite de quantificação 91
5.2.7 Intervalo 91
5.2.8 Robustez 91
5.3 Etapa 3: Equivalência 92
6 CONCLUSÕES 98

7 PERSPECTIVAS **99**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **100**
ANEXOS **107**

1 INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica da água tratada para diálise está diretamente relacionada à ocorrência de infecções e de reações pirogênicas nos pacientes. Modificações na integridade das membranas dos dialisadores bem como a manutenção inadequada do sistema de tratamento e distribuição da água, podem ser destacadas como as mais prevalentes causas de contaminação, principalmente por bactérias Gram negativas, potenciais formadoras de biofilme, este que uma vez estabelecido, facilita a persistência microbiana e atua como fonte permanente de bactérias e endotoxinas, aumentando o risco aos quais os pacientes estão expostos. Devido à criticidade que a qualidade da água para diálise apresenta, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece padrões mínimos de qualidade relacionados à enumeração de bactérias heterotróficas e à presença de coliformes totais e endotoxinas bacterianas através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 11, publicada em 2014. Embora a legislação brasileira não inclua a enumeração de fungos, estudos relatam o isolamento de diversas espécies de bolores e leveduras reconhecidas como patógenos oportunistas para os pacientes portadores de insuficiência renal crônica. O tempo excessivamente longo para obtenção dos resultados analíticos pelos métodos tem conduzido à busca de métodos microbiológicos alternativos que permitam a liberação de resultados em menor tempo e que, desta forma, auxiliem na antecipação de investigações sobre possíveis falhas no tratamento da água. Dentre eles, a técnica de detecção microbiana pelouso de fluorescência para enumeração de bactérias heterotróficas e fungos caracteriza uma opção atrativa devido à possibilidade de redução do tempo analítico, à facilidade de execução do ensaio e à precisão dos resultados. Porém, a aplicação de métodos alternativos depende de demonstração da equivalência frente aos métodos oficiais para justificar a implementação da tecnologia no monitoramento da qualidade microbiológica de água tratada para diálise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método microbiológico alternativo para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise através da técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência, de forma obter resultados em menor tempo, quando comparado aos métodos oficiais, permitindo a antecipação de investigações sobre possíveis falhas no tratamento da água.

2.2 Objetivos específicos

A determinação do tempo mínimo de incubação para obtenção de contagens microbianas por fluorescência, seguida pela realização da avaliação de desempenho do método microbiológico alternativo por meio do sistema Milliflex® Quantum frente aos parâmetros críticos de validação especificados pelos compêndios oficiais consiste em objetivos específicos do presente trabalho.

A demonstração da equivalência entre os resultados obtidos para a enumeração de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise através da técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência quando comparados aos resultados do método tradicional pela técnica de plaqueamento em profundidade encontra-se contemplada nos objetivos específicos deste estudo.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doença renal crônica

A doença renal crônica é caracterizada pela diminuição progressiva e irreversível da capacidade dos rins de eliminar resíduos metabólicos acumulados no sangue, bem como de controlar a quantidade de água e sais minerais no organismo (ROMÃO, 2004; RIELLA, 2010). Constitui atualmente um importante problema de saúde pública mundial, associado à elevada morbidade, mortalidade e custos (LOUVISON *et al*., 2011; SESSO *et al*., 2016; SESSO *et al*., 2017), que leva os pacientes à dependência de terapias de substituição (RIELLA, 2010; FASSBINDER *et al.*, 2015; MENEZES *et al*., 2015).

O transplante renal oferece melhor qualidade de vida aos pacientes, porém por questões clínicas ou pela escassez da oferta de órgãos, já que o tempo médio de espera na fila do transplante de rim ajustado pela mortalidade é de 5,5 anos, a minoria dos pacientes chega a transplantar (LOUVISON *et al*., 2011; SILVA *et al*., 2016). Considerando que o número estimado de pacientes renais crônicos no país, em 2016, era de 122.825 e o aumento anual médio destes pacientes é da ordem de 6,3%, fica evidente que a maioria depende de terapia renal de substituição, seja por hemodiálise (em 92,1% dos pacientes) ou por diálise peritoneal (SESSO *et al*., 2017).

3.2 Hemodiálise

A hemodiálise corresponde a procedimento terapêutico empregado no tratamento de insuficiência renal crônica e aguda (MENEZES *et al.*, 2015). Essencialmente, a máquina de diálise capta o sangue do paciente através de um acesso vascular, o qual é impulsionado por uma bomba até o dialisador, onde o sangue é exposto ao dialisato que, por meio de uma membrana semipermeável, proporciona as trocas de líquidos e substratos por processos de ultrafiltração e difusão para que o sangue retorne para o paciente através do acesso vascular após a remoção dos produtos de degradação metabólica e do excesso de água do organismo (RIELLA, 2010).

O dialisato consiste na mistura de água tratada e concentrado polieletrolítico para hemodiálise (BRASIL, 2001). Enquanto este último apresenta composição fixa e

rígido controle de qualidade, a água utilizada para o preparo do dialisato, dependendo da fonte de obtenção e do tratamento utilizado pelo serviço de diálise pode apresentar variações relacionadas à composição e qualidade (BRASIL, 2001; DAMASIEWCIZ; POLKINGHORNE; KERR, 2012).

A frequência e o tempo de cada sessão de hemodiálise variam em função do estado clínico do paciente, porém, em geral são realizadas entre três a quatrosessões semanais de aproximadamente quatro horas cada (RIELLA, 2010).

No dialisador, a barreira entre o sangue e o dialisato é constituída pela presença de uma membrana semipermeável que pode permitir o acesso direto de possíveis contaminantes presentes na água para o sangue (SILVA *et al.*, 1996; UPADHYAY; JABER, 2016). Se considerado que a cada sessão, o paciente é exposto a aproximadamente 120 litros de água (RIELLA, 2010; COULLIETTE; ARDUINO, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; UPADHYAY; JABER, 2016) a qualidade da água torna-se essencial para minimizar os riscos para os pacientes.

Dados epidemiológicos apontam aumento gradativo do número de pacientes com insuficiência renal crônica sob programa de diálise ambulatorial nas 747 unidades de diálise do Brasil, sendo o Sistema Único de Saúde responsável pelo financiamento de 83% deste tratamento (SESSO *et al*., 2017). A região sudeste apresenta os maiores índices de incidência de pacientes do país: em 2016, do total de novos pacientes, 48% iniciaram o tratamento na região Sudeste (MENEZES *et al*., 2015; SESSO *et al*., 2017).

3.3 Água potável

A água potável é a precursora para os processos de purificação de água para fins farmacêuticos e para hemodiálise, sendo também empregada nas etapas iniciais de limpeza de equipamentos médicos (FARMACOPEIA, 2010). A garantia da segurança dos suprimentos de água potável baseia-se no uso de barreiras, desde o manancial até o consumidor, para evitar ou reduzir a contaminação química e microbiológica da água potável a níveis não prejudiciais à saúde. A segurança é aumentada se existem diversas barreiras, incluindo a proteção dos recursos hídricos, a seleção e operação de uma série de etapas de tratamento, além da gestão do sistema de distribuição para manutenção da qualidade da água tratada.

A obtenção da água potável é realizada através da captação e tratamento da água de mananciais de superfície, por meio das etapas de coagulação, floculação, decantação e filtração, além da desinfecção, fluoretação e estabilização (MOSSINI *et.al.*, 2014). A captação da água de mananciais subterrâneos, como por exemplo um poço artesiano, consiste em uma fonte de obtenção alternativa.

As fontes de água superficiais estão sujeitas a contaminação, intermitente ou temporária, pelo lançamento de efluentes e de resíduos, com consequente comprometimento da qualidade da água dos mananciais.

As autoridades responsáveis pelo fornecimento público da água potável tem a responsabilidade de coordenar as etapas do processo de tratamento da água bem como de assegurar o padrão de qualidade da mesma. No entanto, tem sido observado que a qualidade da água é deteriorada no sistema de distribuição pela não totalidade na cobertura da população ao sistema público de saneamento básico, pela intermitência do abastecimento bem como pela obsolescência da rede de distribuição e pela manutenção insuficiente (BRASIL, 2006). A responsabilidade pelotratamento e atendimento aos padrões de qualidade estabelecidos para a água potável obtida através da captação da água de mananciais subterrâneo é do usuário (BRASIL, 2017).

A normatização da qualidade da água para consumo humano no Brasil teve início na década de 1970 através da publicação do decreto federal nº 79.367 de 9 de março de 1977. Entretanto, a implementação de um programa de vigilância daqualidade da água para consumo humano foi implementada somente a partir da criação do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde em 2002 (FREITAS; FREITAS, 2005).

Atualmente, a água potável deve atender ao padrão de potabilidade estabelecido pela legislação vigente: a Portaria de Consolidação nº 05, de 28 de setembro de 2017, que define os níveis máximos permitidos para os parâmetros organolépticos, físico-químicos, microbiológicos e radioativos (BRASIL, 2017).

A vigilância, realizada pelos órgãos de saúde pública, aliada ao controle de qualidade efetuado pelo fornecedor da água potável, são instrumentos essenciais para a garantia da proteção à saúde da população. Através destas ações, sãorealizadas as inspeções periódicas para avaliação da qualidade da água em pontos do sistema considerados vulneráveis e, portanto, a estimativa da probabilidade de

ocorrência de episódios de qualidade indesejáveis da água e as respectivas correções.

Essa inspeção ocorre por meio da realização de ensaios físico-químicos e microbiológicos frente aos parâmetros de qualidade definidos na legislação vigente. Assim, procura-se determinar por uma amostragem no sistema, o risco à saúde relacionado à qualidade da água.

Os serviços de diálise têm a responsabilidade de monitorar e garantir que a qualidade da água potável utilizada para o abastecimento dos sistemas de tratamento de água esteja em conformidade com a legislação. A monitorizaçãoperiódica de outros parâmetros que possam vir a afetar as operações específicas de pré-tratamento ou de purificação também pode ser estabelecida, com a finalidade de auxiliar em investigações e ajustes operacionais de parâmetros críticos de operação e manutenção do sistema (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

3.3.1 Avaliação química

Os problemas de saúde associados com constituintes químicos em água potável diferem daqueles associados com a contaminação microbiana e surgem principalmente da capacidade dos constituintes químicos em causar efeitos adversos para a saúde após períodos prolongados de exposição. Há poucos componentes químicos presentes na água que podem levar a problemas de saúde decorrentes de uma única exposição. Além disso, a literatura demonstra que na maioria dos incidentes, a alteração no sabor, odor e aparência da água a tornam inaceitável perante o usuário, impedindo o consumo (WHO, 2011).

Dois importantes grupos de substâncias químicas necessitam ser monitorados na água potável quanto à presença e concentração: as substâncias químicas inorgânicas, como os metais, e as orgânicas, como a microcistina (BRASIL, 2006).

A presença de metais na água pode resultar em efeitos benéficos bem como em efeitos perigosos e tóxicos tanto para o meio ambiente quanto para os consumidores. Alguns metais são essenciais para o crescimento de plantas e animais, enquanto outros podem provocar agravos à saúde da população e afetar adversamente os sistemas de tratamento de água de acordo com as propriedades químicas e com a concentração que apresentem nas águas potáveis (APHA, 2017).

Os metais possuem características atômicas exclusivas que conferem elevada resistência à degradação físico-quimica e biológica no sistema aquático, o que facilita sua manutenção neste ambiente por períodos prolongados (LARSON; WEINCK, 1994).

A introdução dos metais nos ecossistemas aquáticos pode ser realizada por via natural através do aporte atmosférico e das chuvas, pela liberação e transporte a partir da rocha matriz ou outros compartimentos do solo onde se encontram naturalmente presentes. De modo artificial, a introdução é efetuada por fontes antropogênicas de diversos ramos, como por exemplo os efluentes de indústrias, as atividades agrícolas, o esgoto de zonas urbanas e os rejeitos de áreas de mineração e garimpo (WHO, 2011).

Os danos ocasionados pelos metais pesados à saúde humana estão diretamente relacionados a taxa de ingestão, acumulação e concentração do metal no organismo, podendo em algumas situações ocasionar intoxicações agudas ou crônicas. Atividade carcinogênica tem sido demonstrada mediante a ingestão de quantidades excedentes ao permitido para o Cromo, Chumbo e Mercúrio (LARSON; WEINCK, 1994; MOSSINI *et al.*, 2014).

Distúrbios clínicos dos sistemas musculoesquelético, nervoso central e hematológico podem ser desencadeados pela deposição do alumínio nos tecidos, enquanto alterações cognitivas, doença óssea (osteomalácia), dano renal, hipertensão arterial e carcinogenicidade estão relacionados à intoxicação por Cádmio, substância tóxica comumente empregada em revestimentos metálicos, materiais plásticos, pinturas e ligas metálicas. A presença de altas concentrações de chumbo em água pode afetar os processos bioquímicos fundamentais do organismo, resultando em alterações nos sistemas hematológico, gastrointestinal, reprodutivo, renal, nervoso e musculoesquelético (MOSSINI *et al.*, 2014).

A desinfecção química da água potável é geralmente realizada através de tecnologias à base de cloro, como o dióxido de cloro, bem como ozônio, oxidantes e alguns ácidos e bases fortes. Com exceção do ozônio, a dosagem apropriada de desinfetantes químicos destina-se a manter uma concentração residual na água para fornecer alguma proteção contra a contaminação pós-tratamento durante o armazenamento (WHO, 2011).

A água de fornecimento público no Brasil apresenta o cloro como agente responsável pela baixa carga microbiana. Entretanto, falhas no sistema de

distribuição ou a falta de limpeza dos reservatórios podem conduzir a desvios indesejáveis com relação à diminuição na concentração de cloro. A legislação brasileira impõe a obrigatoriedade de manutenção de níveis mínimos de cloro residual livre ou combinado de aproximadamente 0,2 mg/L em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede). O teor máximo de cloro residual livre deve ser 2 mg/L (BRASIL, 2017; PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A desinfecção química de um reservatório de água potável contaminado com coliformes fecais, reduz o risco de patologias gastrointestinais, mas não necessariamente a torna livre de patógenos. A desinfecção da água potável através da utilização do cloro tem limitações contra os protozoários e alguns vírus, porexemplo (WHO, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a desinfecção química realizada com cloro livre promove uma remoção basal de 3 $\log_{10}$ da carga microbiana, podendo alcançar uma remoção máxima de 6 $\log_{10}$. É importante ressaltar que a utilização de desinfetantes químicos no tratamento de água usualmente resulta na formação de subprodutos químicos. Se a cloração é praticada, os trihalometanos e ácidos haloacéticos serão os principais subprodutos da desinfecção. No entanto, os riscos para a saúde destes subprodutos são pequenos quando comparados com os riscos associados à desinfecção inadequada uma vez que o monitoramento e controle dos desinfetantes utilizados para água potável podem ser facilmente realizados por ensaios laboratoriais (WHO, 2011).

3.3.2 Avaliação microbiológica

A exigência de água potável de qualidade é o propósito primário para a proteção da saúde pública. O monitoramento da concentração de micro-organismos é de fundamental importância para o controle de qualidade deste tipo de água, uma vez que a presença de bactérias, algas, fungos, protozoários e vírus podem propiciar o desenvolvimento de patologias e agravar a saúde dos usuários. Esta ideologia conduziu ao desenvolvimento de padrões microbianos para a água potável no início do século XX (FREITAS; FREITAS, 2005).

De acordo com dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (WHO) (2014, p. ix-5), dois terços dos 94 países pesquisados reconheceram a água potável e o saneamento como um direito humano universal na legislação nacional. Mais de

80% disseram ter políticas nacionais para a água potável e o saneamento, e mais de 75% possuem políticas de higiene.

Entretanto, o mesmo relatório aponta que 748 milhões de pessoas não têmacesso à água potável e que 1,8 bilhões de pessoas utilizam alguma fonte de água potável que está contaminada com coliformes fecais (WHO, 2014).

A composição microbiana da água de mananciais de superfície com baixa concentração em nutrientes (oligotróficos) é caracterizada principalmente por bactérias Gram negativas. O aumento nos níveis de nutrientes reflete o aumento do número de espécies presentes na água, como por exemplo os micro-organismos dos gêneros *Achromobacter, Flavobacterium*, *Bacillus, Mycobacterium, Pseudomonas* e *Vibrio*. Fungos, protozoários e algas também podem ser encontrados em ambientes aquáticos com alta quantidade de nutrientes (eutróficos) (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

A água extraída dos lençóis subterrâneos através dos poços artesianos apresenta baixo nível de contaminação, visto que durante o trajeto sofre processo defiltração através das camadas de solo e rocha. Entretanto, a contaminação externa pode ocorrer caso não sejam adotadas medidas de controle após a captação (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Poços inadequadamente construídos ou localizados em áreas intensamente urbanizadas ou exploradas com a criação de animais, por exemplo, apresentam alto risco de contaminação pela água de superfície.

A variação na composição microbiana da água está relacionada à origem do manancial, caracterizado como superficial ou subterrâneo, à época do ano, à disponibilidade de nutrientes nos mananciais, aos tratamentos de desinfecção e cloração efetuados e às condições do sistema de distribuição até o usuário (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

De acordo com a Portaria de Consolidação Nº 05 (ANVISA, 2017), a responsabilidade pelo tratamento da água de fornecimento público é do próprio fornecedor, enquanto para a água de origem privada, a responsabilidade é do usuário. Independente da fonte de obtenção, a qualidade deve ser controlada através da realização das análises laboratoriais periódicas determinadas pela legislação. A tabela 1 apresenta o padrão microbiológico da água para consumo humano.

Tabela 1 - Padrão microbiológico da água para consumo humano

Tipo de água		Parâmetro		VMP [1]
Água para consumo humano		*Escherichia coli* [2]		Ausência em 100 mL
Água tratada	Na saída do tratamento	Coliformes totais [3]		Ausência em 100 mL
	No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	*Escherichia coli* [2]		Ausência em 100 mL
		Coliformes Totais [4]	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem menos de 20.000 habitantes	Apenas uma amostra ao mês poderá apresentar resultado positivo
		Coliformes Totais [4]	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes	Ausência em 100 mL em 95% das amostras avaliadas

Notas:
[1] Valor máximo permitido
[2] Indicador de contaminação fecal
[3] Indicador de eficiência de tratamento
[4] Indicador do sistema de distribuição (reservatório e rede)
Fonte: BRASIL (2017).

O processo de desinfecção mais utilizado para a água potável é a cloração. Entretanto, a ozonização, irradiação ultravioleta, cloraminação e aplicação de dióxido de cloro também são usualmente utilizados para redução da carga microbiana, inativação de vírus e protozoários (WHO, 2011).

A análise bacteriológica da água é uma importante ferramenta para a determinação de sua qualidade. O monitoramento deve ser realizado por meio dos indicadores de contaminação por coliformes, sendo o indicador de coliformes fecais o mais importante.

O grupo coliforme é caracterizado por bactérias Gram-negativas não esporogênicas, originárias do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, na forma de bastonetes, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás no período de 48 horas quando emtemperatura de 35ºC (APHA, 2017).

Os coliformes fecais, também denominados termotolerantes, são bactérias Gram-negativas presentes em grandes quantidades no trato intestinalde animais de sangue quente e que são capazes de fermentar a lactose com produção de gás após 24 horas quando em temperatura de 44,5ºC. Esse grupoinclui três gêneros, *Enterobacter, Klebsiella e Escherichia,* sendo os dois primeiros de origem não fecal. Entretanto, a presença de *Escherichia coli* na água potável paraconsumo humano fornece evidências conclusivas de contaminação fecal e caracteriza não conformidade frente aos parâmetros regulatórios estabelecidos (WHO, 2011; APHA, 2017).

Estudos comparativos entre os ensaios de presença / ausência frente aos métodos quantitativos demonstram que os métodos de presença / ausência podem maximizar a detecção de bactérias indicadoras fecais, além de apresentarem execução mais simples, mais rápida e menos dispendiosa do que os métodos quantitativos. No entanto, os testes de presença / ausência são apropriados apenas em um sistema onde a maioria dos testes para estes organismos apresente resultados negativos (WHO, 2011).

A detecção de amostras com resultado positivo para coliformes totais, mesmo durante os ensaios presuntivos de controle da qualidade da água, implica na necessidade de adoção de ações corretivas imediatas e na coleta de novas amostras em dias imediatamente sucessivos até que estas apresentem resultados satisfatórios (UNITED, 2019).

A contagem de bactérias heterotróficas deve ser realizada como um dos parâmetros para avaliação da integridade do sistema de distribuição e deve abranger 20% das amostras mensais para análise de coliformes totais destes sistemas. Alterações significativas nos padrões de resultados para contagem de bactérias heterotróficas devem ser investigadas para a identificação do desvio e aplicação das providências para o restabelecimento da integridade do sistema de distribuição, de forma a evitar que os valores ultrapassem o limite de 500 UFC/mL (UNITED, 2019).

Durante as últimas décadas, os fungos têm recebido maior atenção como contaminantes de água potável. Estudos reportam o isolamento deste grupo de organismos em amostras de água potável e para consumo humano, em distintos países (ARVANITIDOU *et al*., 1999; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006; HAGESKAL *et al*., 2007; AL-GABR; ZHENG; YU, 2014). Dentre as espécies

identificadas, algumas são potencialmente patogênicas, alergênicas e toxigênicas, como por exemplo, o *Aspergillus fumigatus*, recuperado em 49% das amostras de água potável coletadas em torneiras do Hospital Universitário Rikshospitalet de Oslo, em um estudo realizado por Warris e colaboradores (2001, p.143-148).

Outro contaminante microbiano da água são as cianobactérias, que podem produzir sabor e odor desagradáveis nas águas e liberar cianotoxina, substância tóxica ao organismo humano que não é removida pelos sistemas de tratamento de água convencionais ou pela fervura (WHO, 2011).

Dentre as cianotoxinas, a microcistina é conhecida pela capacidade de causar prejuízos à saúde da população, como foi evidenciado no caso ocorrido em 1996 na cidade de Caruaru, Pernambuco. No incidente, após a captação da água de um lago com florações de cianobactérias e ausência de tratamento adequado, pacientes sob tratamento dialítico foram expostos às altas concentrações de microcistina presentes na água para diálise, resultando no óbito de 47,6% dos pacientes (POURIA *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2002).

3.4 Água para hemodiálise

A água para hemodiálise é utilizada para aplicações de hemodiálise, principalmente na diluição de soluções concentradas polieletrolíticas de hemodiálise e no reprocessamento de dialisadores.

Até a década de 70, a água potável sem nenhum tratamento adicional era utilizada nos procedimentos dialíticos. Entretanto, a ocorrência de efeitos adversos devido à presença de contaminantes químicos e microbiológicos em níveis não adequados conduziu à necessidade de tratamentos complementares para adequar suas características à aplicação em hemodiálise (SILVA *et al.*, 1996; COULLIETTE; ARDUINO, 2013).

Após o evento ocorrido em Caruaru, a ANVISA publicou a Portaria Nº 2042 em 1996 (BRASIL, 1996), que estabeleceu o primeiro regulamento técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise e definiu os parâmetros mínimos de qualidade da água para uso nestes estabelecimentos.

Atualmente, a água para hemodiálise é obtida após tratamento da água potável através de um sistema sequencial composto pelo módulo de pré-tratamento (combinação de filtros de sedimento, filtros de carvão e abrandadores) e pelo módulo de purificação, caracterizado por uma unidade de osmose reversa acoplada a deionizadores ou a uma segunda unidade de osmose reversa, de forma a obter a máxima redução de contaminantes químicos e microbiológicos (SILVA *et al.*, 1996; COULLIETTE; ARDUINO, 2013; KASPAREK; RODRIGUEZ*, 2015*).

Cada módulo do sistema de tratamento da água para hemodiálise contribui isoladamente com atributos de purificação específicos associados aos parâmetros químicos e microbiológicos. Portanto, devem ser projetados e validados de forma a considerar a qualidade da água de origem, os procedimentos para sanitização, o padrão de qualidade da água a ser obtida e os programas de manutenção.

Em 2014, a ANVISA publicou a RDC nº 11 de 13 de março de 2014 (BRASIL, 2014) que estabeleceu um padrão microbiológico mais restritivo para a água utilizada no tratamento de hemodiálise. A nova regulamentação, atualmente vigente, diminuiu em dez vezes o nível máximo permitido de endotoxina e reduziu pelametade o número total de bactérias heterotróficas aceitável por mililitro de amostra, os mesmos padrões propostos, no período, pela norma ANSI/AAMI 13959:2014*Water for hemodialysis and related therapies* (AAMI, 2014), publicada pela Associação para o Avanço da Instrumentação Médica (AAMI).

3.4.1 Avaliação química

A regulamentação brasileira contempla não somente o monitoramento dos parâmetros microbianos como também dos parâmetros químicos na água para diálise. A tabela 2 apresenta os valores máximos permitidos para cada um dos componentes químicos que necessitam de avaliação semestral, como preconizado pela RDC nº 11/2014 (BRASIL, 2014).

Tabela 2 - Padrão de qualidade químico definido pela legislação brasileira vigente para água de hemodiálise

Componente	Valor máximo permitido
Alumínio	0,01 mg/L
Antimônio	0,006 mg/L
Arsênico	0,005 mg/L
Bário	0,1 mg/L
Berílio	0,0004 mg/L
Cádmio	0,001 mg/L
Cálcio	2 mg/L
Chumbo	0,005 mg/L
Cloro total	0,1 mg/L
Cobre	0,1 mg/L
Cromo	0,014 mg/L
Fluoreto	0,2 mg/L
Magnésio	4 mg/L
Mercúrio	0,0002 mg/L
Nitrato (N)	2 mg/L
Potássio	8 mg/L
Prata	0,005 mg/L
Selênio	0,09 mg/L
Sódio	70 mg/L
Sulfato	100 mg/L
Tálio	0,002 mg/L
Zinco	0,1 mg/L

Fonte: BRASIL (2014).

Os valores de referência representam a concentração de um constituinte que não exceda risco tolerável para a saúde da população ao longo de um tempo de vida de consumo. Estes valores são cientificamente justificados e fixados de forma a não apresentarem valores inferiores ao limite de detecção realizável sob as condições operacionais do laboratório de rotina (WHO, 2011).

3.4.2 Avaliação microbiológica

Um paciente sob tratamento de hemodiálise por um período de dois anos recebe, aproximadamente, o mesmo volume de água que fará ingestão oral por todo o seu período de vida. O volume de água produzido diariamente por um único sistema de tratamento de água em uma clínica de diálise é tão grande que se torna importante monitorá-lo devido ao elevado número de micro-organismos que serão filtrados (PASMORE; MARION, 2009).

A maioria dos casos de contaminação da água para hemodiálise resulta de deficiências na produção e distribuição desta água, bem como do reuso de dialisadores (COULLIETTE; ARDUINO, 2013; SUMAN *et al*., 2013).

A contaminação da água para hemodiálise pode ser causada por fungos, vírus, protozoários, cianobactérias, embora a contaminação bacteriana seja a forma mais comum, principalmente por bactérias Gram-negativas (SILVA *et al.*, 1996; ROTH; JARVIS, 2000; COULLIETTE; ARDUINO, 2013).

As bactérias Gram-negativas são de grande interesse quando o assunto abordado é a produção de água tratada para fins farmacêuticos ou para uso em hemodiálise devido, principalmente, à produção de endotoxinas e à tendência de colonizar sistemas hídricos e formar biofilmes (UNITED, 2019).

A remoção de cloro e cloramina da água de alimentação, assim como vazão, pressão, temperatura e as características do sistema de distribuição da água para diálise aumentam a susceptibilidade de contaminação e a formação de biofilme, tanto no sistema de tratamento e distribuição como no sistema hidráulico das máquinas de diálise (DAMASIEWCIZ; POLKINGHORNE, 2012; COULLIETTE; ARDUINO, 2013; SUMAN *et al*., 2013; KASPAREK; RODRIGUEZ, 2015).

Quando estabelecidos, os biofilmes caracterizam um importante desafio para a eliminação devido as propriedades de adesão que possuem e a facilidade de persistência microbiana mesmo após a aplicação de procedimentos de sanitização e desinfecção do sistema (SILVA *et al.*, 1996; ROTH; JARVIS, 2000; DAMASIEWCIZ; POLKINGHORNE, 2012; SUMAN *et al*., 2013). Deste modo, atuam como fonte permanente de bactérias e endotoxinas, estas últimas reconhecidas pela literatura como importante fator de contaminação e de inflamação crônica em pacientes sob diálise (ROTH; JARVIS, 2000; DAMASIEWCIZ; POLKINGHORNE, 2012; COULLIETTE; ARDUINO, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; SUMAN *et al*., 2013).

Bactérias Gram-positivas são comuns em um ambiente de fabricação farmacêutica, mas não em sistemas de água. Isto ocorre porque elas geralmente não se adaptam em um ambiente com a pureza química que apresenta um sistema de tratamento de água. Embora as bactérias Gram-positivas possam ser detectadas em amostras de água tratada para hemodiálise, a sua recuperação é frequentemente associada a uma técnica asséptica não adequada durante a amostragem ou a fontes de contaminação exógena (UNITED, 2019).

Os organismos do gênero *Mycoplasma* não possuem parede celular e sobrevivem, em sua maioria, como parasitas em animais pois requerem nutrientes específicos para a sobrevivência, não podendo sobreviver em um ambiente hipotônico como a água para hemodiálise. Com base nestes fatos, este grupo de bactérias não é considerado uma preocupação para os sistemas de tratamento de água (UNITED, 2019).

A Farmacopeia Americana (USP) (UNITED, 2019) e a Farmacopeia Européia (EUROPEAN, 2019), contêm monografias específicas para a água tratada para diálise. A Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010) não contempla monografia específica para esta variedade de água, uma vez que a mesma encontra-se regulamentada pela RDC nº 11/2014 (BRASIL, 2014). A comparação entre os padrões de qualidade microbiológicos definidos pelos compêndios internacionais e pela legislação brasileira vigente é mostrada na tabela 3.

Tabela 3 - Padrão de qualidade microbiológico adotado por distintos compêndios e órgãos regulatórios para a água de hemodiálise

Parâmetro	USP [1]	EP [2]	BRASIL [3]	AAMI [4]	JSDT [5]
Bactérias heterotróficas	≤ 100 UFC/mL	≤ 100 UFC/g	≤ 100 UFC/mL	≤ 100 UFC/mL	< 100 UFC/mL
Coliformes totais	-	-	Ausência	-	-
P. aeruginosa	Ausência	-	-	-	-
Endotoxina	≤ 1 UE/mL	≤ 0,25 UI/mL	≤ 0,25 UE/mL	≤ 0,25 UE/mL	< 0,050 UE/mL

Notas:
[1] Farmacopeia Americana
[2] Farmacopeia Européia
[3] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 11 /2014
[4] *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (Estados Unidos)
[5] *Japanese Society for Dialysis Therapy*
Fonte: MINESHIMA *et al.* (2018); AAMI (2014); BRASIL (2014); EUROPEAN (2019); UNITED (2019).

O conceito de utilização de organismos como indicadores de qualidade é uma prática bem estabelecida na avaliação da qualidade da água potável e atualmente tem sido empregada na avaliação da água tratada para hemodiálise. Os coliformes totais são utilizados como indicadores de limpeza e integridade dos sistemas de distribuição, enquanto a contagem de bactérias heterotróficas, como indicador, está relacionada com a eficácia dos processos de desinfecção, limpeza e integridade dos sistemas de distribuição de água tratada (WHO, 2011).

Embora a legislação brasileira e os compêndios internacionais não incluam a enumeração de fungos como um dos componentes do padrão de qualidade da água tratada para diálise, estudos relatam o isolamento de diversas espécies de fungos reconhecidos como patógenos oportunistas para os pacientes portadores de insuficiência renal crônica (VARO *et al*., 2007; SCHIAVANO *et al*., 2014).

Os fungos são principalmente organismos mesofílicos aeróbios, classificados em dois grupos: as leveduras (unicelulares) e os bolores (multicelulares filamentosos). Os bolores são encontrados frequentemente em ambientes úmidos, mas geralmente não-aquáticos, tais como o solo e a vegetação em decomposição. Entretanto, os esporos destes organismos são facilmente espalhados pelo ar e podem contaminar amostras de água. As leveduras são frequentemente associadas aos seres humanos e à vegetação, sendo comumente encontradas em ambientes farmacêuticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; UNITED, 2019).

As leveduras patogênicas exploram sua capacidade de aderir à superfície de próteses plásticas para obter acesso à circulação sanguínea e aos órgãos internos dos pacientes (VERSTREPEN; KLIS, 2006). Células dispersas de espécies do gênero *Candida* são responsáveis pela candidemia e pela candidíase disseminada invasiva, que estão entre as formas mais graves de infecção e conduzem às maiorestaxas de mortalidade (PIRES *et al.*, 2011).

Desta forma, as próteses e cateteres podem servir de transportadores para os biofilmes fúngicos e, portanto, fornecem um reservatório interno de células infecciosas altamente resistentes aos fármacos. Em contraste com a maioria das infecções superficiais inofensivas, as infecções fúngicas sistêmicas apresentam taxa de mortalidade superior a 40% (VERSTREPEN; KLIS, 2006).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus,* como por exemplo o *Aspergillus fumigatus,* são potencialmente patogênicas, alergênicas e toxigênicas podendo agravar o estado de saúde dos pacientes portadores de insuficiência renal, que

estão expostos à maior risco de infecções fúngicas do que os indivíduos saudáveis (WARRIS *et al.*, 2001; VARO *et al.*, 2007).

De acordo com a Farmacopeia Americana (2019, p.1880), os sistemas de água tratada não apresentam condições favoráveis para a colonização ou sobrevivência de bolores e leveduras. A sua recuperação é frequentemente associada a uma técnica asséptica defeituosa durante a amostragem ou teste, ou associada a fontes de contaminação exógena.

Entretanto, trabalhos disponíveis na literatura descrevem a recuperação e isolamento de distintas espécies de fungos em amostras de água tratada para diálise (VARO *et al.*, 2007; SCHIAVANO *et al.*, 2014).

3.5 Mecanismos de sobrevivência das bactérias em sistemas de tratamento de água

Quando um ou mais fatores de crescimento essenciais são limitados, como é frequentemente o caso dos ambientes em sistemas de tratamento de água para hemodiálise, as bactérias utilizam distintas estratégias com o objetivo de garantir sua sobrevivência por longos períodos. Estes mecanismos de sobrevivência incluem versatilidade nutricional, alterações celulares e morfológicas, indução do estado viável não cultivável (VNC), formação de cistos e esporos, bem como de biofilmes (MITTELMAN; JONES, 2016).

Extremos de temperatura e de luz, salinidade, baixos níveis de oxigênio bem como baixa disponibilidade de nutrientes são fontes de estresse ambientais responsáveis pelo desencadeamento dos mecanismos de sobrevivência (MITTELMAN; JONES, 2016).

3.5.1 Estado viável mas não cultivável

Algumas espécies de bactérias apresentam a capacidade de alterar as taxas metabólicas de suas células e, consequentemente, adotar o estado denominado viável não cultivável quando expostas a baixas temperaturas e a condições restritas de nutrientes (OLIVER, 2010; LI *et al.*, 2014).

Este estado corresponde à perda da culturabilidade bacteriana com manutenção da viabilidade. Portanto, as bactérias viáveis permanecem metabolicamente ativas

mas deixam de ser cultiváveis nos meios de cultura em que eram tradicionalmente recuperadas quando expostas a fontes de estresse ambiental (MITTELMAN; JONES, 2016).

Li e colaboradores (2014, p.1-20) listaram as 51 espécies de bactérias patogênicas para o ser humano cujas existências no estado viável não cultivável foram relatadas pela literatura. Dentre elas encontram-se a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Burkholderia cepacia,* bactérias que apresentam indução ao estado VNC relacionado à baixa disponibilidade de nutrientes e são frequentemente isoladas de amostras de água para diálise (MAGALHÃES *et al*., 2003; ALLEN;EDBERG; REASONER, 2004; BUGNO *et al.*, 2007).

A literatura relata que métodos que utilizam o cultivo tradicional em meios de cultura podem subestimar a contagem total de bactérias aeróbias presentes nas amostras avaliadas pois não são capazes de recuperar as células VNC. Durante as últimas décadas, novos métodos sem a necessidade de cultivo foram desenvolvidos com o objetivo de determinar o número de células viáveis totais e, portanto, demonstrar que células com perda de culturabilidade são de fato viáveis e metabolicamente ativas (OLIVER, 2010).

Os métodos baseados na viabilidade direta, como a citometria de fase sólida bem como os métodos baseados no crescimento, como a bioluminescência de ATP, são exemplos de novas metodologias (MILLER, 2005b). Entretanto, o alto investimento necessário para a aquisição e manutenção dos equipamentos constitui importante desvantagem para implementação destas tecnologias em institutos de pesquisas financiados com dinheiro público.

3.5.2 Formação de biofilme

A capacidade de aderência a outras células e superfícies, considerada como uma das funções mais críticas da superfície celular, permite a formação de biofilmes como barreira de proteção contra condições insatisfatórias (VERSTREPEN; KLIS, 2006).

Biofilmes são comunidades estruturadas de células microbianas envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que são responsáveis por importantes funções do biofilme, incluindo a captura de nutrientes, coesão celular, adesão superficiais e estabilidade (DONLAN, 2002).

O crescimento em um biofilme apresenta diversas vantagens de sobrevivência aos micro-organismos nele presentes como, por exemplo, a proteção dos efeitos de substâncias químicas devido ao espesso exopolímero secretado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Além disso, uma estrutura de biofilme estabelecida fornece um excelente ambiente para a troca de material genético entre as células (DONLAN, 2002).

Estima-se que bactérias sob a forma de biofilmes são 10-1000 vezes mais resistentes a antibióticos e outros agentes antimicrobianos quando comparadas às formas planctônicas. Entretanto os mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência ainda não estão completamente definidos (MONROE, 2007).

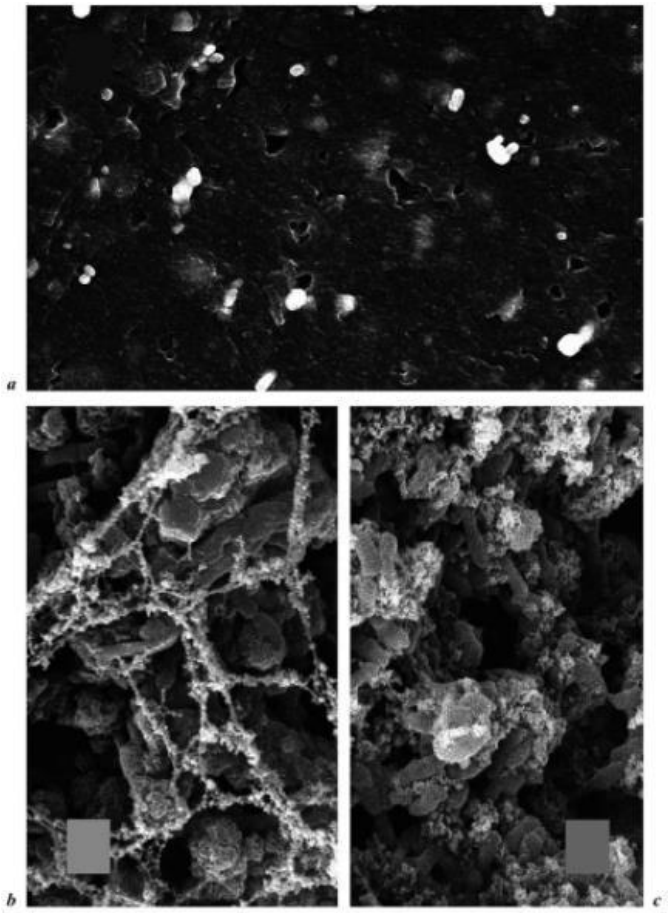
Como a maioria dos tratamentos químicos utilizados em água potável são tóxicos para os seres humanos quando introduzidos na corrente sanguínea, estescompostos, como por exemplo o cloro, necessitam ser completamente removidos da água para diálise para prevenir reações adversas aos pacientes. Desta forma, a água tratada encontra-se livre de antimicrobianos (PASMORE; MARION, 2009).

A alta pureza da água favorece o desenvolvimento de micro-organismos acostumados a crescer sob condições oligotróficas (baixo nível de nutrientes). Nas superfícies do sistema de hemodiálise, as bactérias encontram pouca competição e uma fonte de alimento aumentada devido à adsorção de vestígios de nutrientes. Essa adsorção concentra os nutrientes, promovendo o suprimento necessário para os micro-organismos. Uma vez adsorvidos à superfície, esses organismos formam biofilmes como mecanismo de sobrevivência e se multiplicam em grande número em locais anteriormente desprovidos de vida (PASMORE; MARION, 2009). Um exemplo de colonização por biofilme é demonstrado na Figura 1.

Nas operações unitárias de purificação, nos quais os níveis de nutrientes podem ser consideravelmente mais altos e as condições de sanitização menos frequentes a formação de biofilme também pode ser observada (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

As incrustações das resinas de troca iônica e de leitos de carvão ativo constituem um importante problema na produção de água potável e de alta pureza devido à existência de uma área de superfície significativa disponível para a fixação microbiana e à presença de material orgânico retido (MITTELMAN; JONES, 2016; UNITED, 2019).

Figura 1 - Presença de biofilme em tubulação de PVC integrante do sistema de tratamento de água



Notas: Presença de biofilme em tubulação de PVC de um sistema de tratamento de água com superfície irregular e deposição bacteriana (**a**). Biofilme maduro com deposição de sais inorgânicos encontrado em zona de baixo fluxo em um equipamento de diálise (**b,c**).
Fonte: RONCO; MISHKIN (2007).

Outro fator que auxilia a formação de biofilmes é a variação das taxas de fluxo de água em algumas zonas mortas e a ausência de fluxo no sistema. As zonas mortas criam reservatórios bacterianos e propiciam a fixação de biofilmes altamente aderentes (PASMORE; MARION, 2009).

3.6 Monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para hemodiálise

O não atendimento aos critérios de qualidade microbiológicos para a água de diálise definidos pela legislação (BRASIL, 2014), podem resultar na ocorrência de reações pirogênicas devido à presença de endotoxinas bem na aquisição de

infecções, esta última a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes sob hemodiálise (FERREIRA *et al.*, 2013).

O *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) investigou 20 surtos associados à contaminação microbiana em pacientes submetidos à diálise, entre 1969 e 2008 e verificou que 10 surtos estavam relacionados à presença de bactérias (145 casos), 06 à presença de endotoxinas (177 casos) e 04 à presença de bactérias e endotoxinas (53 casos) (ROTH; JARVIS, 2000; COULLIETTE; ARDUINO, 2013).

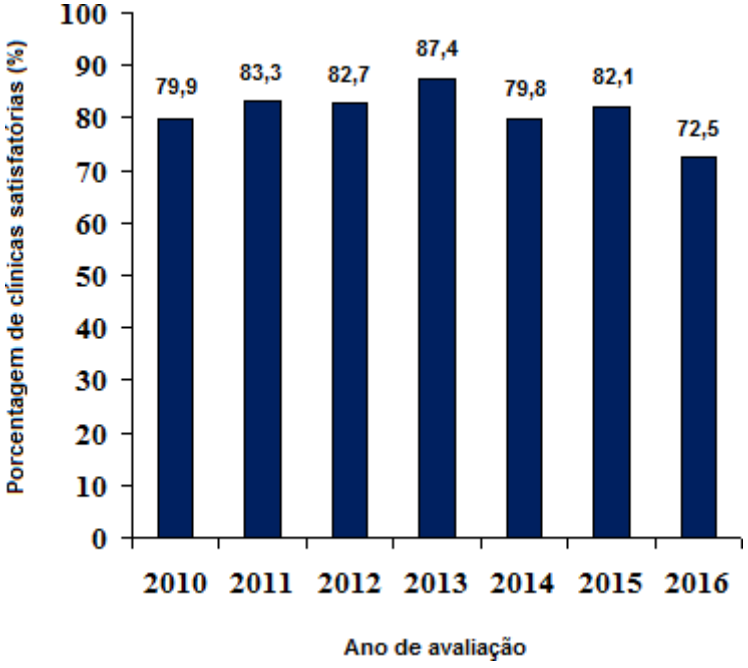
O monitoramento da qualidade microbiológica da água de alimentação do serviço bem como da água tratada devem ser considerados, de forma a assegurar a segurança do paciente. No geral, as contaminações microbianas estão relacionadas a deficiências na produção e/ou insuficiente manutenção do sistema de tratamento e distribuição da água. O reprocessamento dos dialisadores também pode ser associado à ocorrência de surtos e reações pirogênicas, uma vez que esta prática torna os dialisadores susceptíveis à contaminação pela água utilizada no enxágue e altera a permeabilidade da membrana (ROTH; JARVIS, 2000; COULLIETTE; ARDUINO, 2013; SUMAN *et al*., 2013).

Considerando que o estado de São Paulo concentra o maior número de Serviços de Diálise no país (27,3%) (SESSO *et al*., 2016), com 726 Unidades ativas em 2015 (SESSO *et al*., 2017), e que inspeções realizadas pelo Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo (CVS/SP) em 1995 indicaram procedimentos inadequados no tratamento da água em 74% dos Serviços de Diálise (BUZZO *et al*., 2010), noano 2000 foi instituído o Programa Estadual de Monitoramento da Água para Diálise, uma parceria entre o CVS/SP e o Instituto Adolfo Lutz (IAL), com o intuito de inspecionar as Unidades de Diálise do estado e avaliar o tratamento e distribuiçãoda água para diálise a partir de coletas de amostras em pontos definidos pelalegislação (BUZZO *et al*., 2010; MARCATTO; GRAU; MULLER, 2010). No início do Programa de Monitoramento, 36,9% das clínicas avaliadas apresentaram água com qualidade em desacordo com os parâmetros regulamentados (BUZZO *et al*., 2010).

De acordo com informações obtidas junto ao Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança do Instituto Adolfo Lutz, desde o ano de 2007 todos os Serviços de Diálise ativos tem sido avaliados anualmente no âmbito do Programa Estadual de Monitoramento da água tratada para diálise (ALMODOVAR *et al*., 2018). Os dados demonstram a eficiência das ações sanitárias, indicada por redução na porcentagem

de clínicas que apresentaram amostras de água em desacordo com os parâmetros definidos (Figura 2), apesar do aumento verificado a partir de 2014, em função da publicação da Resolução RDC nº 11 de 2014 (BRASIL, 2014), que tornou mais rígido o padrão de qualidade microbiológico para água tratada para diálise.

Figura 2 - Unidades de hemodiálise em conformidade com os padrões de qualidade de água para hemodiálise no período de 2010 a 2016



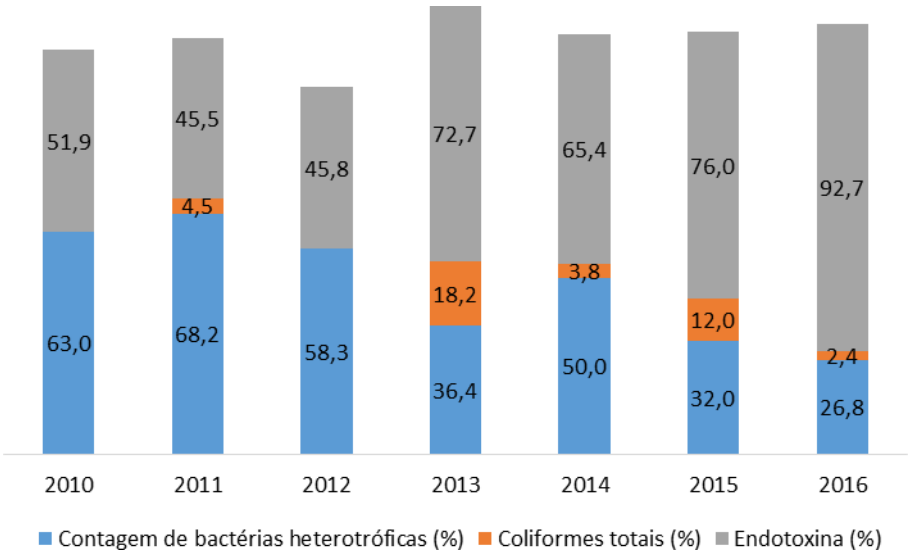
Fonte: Adaptado de ALMODOVAR *et al.* (2018).

Os parâmetros microbianos de qualidade da água para hemodiálise foram as mais prevalentes causas de insatisfatoriedade em relação aos padrões mínimos de qualidade (Figura 3).

A legislação estabelece que o serviço de diálise monitore diariamente a qualidade da água potável em amostras coletadas no ponto de entrada do reservatório e no ponto de entrada do subsistema de tratamento de água parahemodiálise, de forma a atender os parâmetros físicos e organolépticos preconizados (BRASIL, 2014). O controle bacteriológico do reservatório de água potável deve ser efetuado mensalmente. O monitoramento microbiológico da água resultante do sistema de tratamento e distribuição de água para hemodiálise deve ser realizado mensalmente em amostras coletadas no ponto de retorno da alça de distribuição (loop) e em um dos pontos na sala de processamento (reuso). A

avaliação físico-química deve ser efetuada semestralmente em amostra coletada em ponto após o subsistema de tratamento de água para hemodiálise (BRASIL, 2014).

Figura 3 - Perfil de resultados microbiológicos insatisfatórios de amostras de água tratada para diálise coletadas em unidades de diálise localizadas no Estado de São Paulo, Brasil, de 2010 a 2016



Fonte: HILINSKI *et al.* (2017).

3.6.1 Limites de alerta e ação

A necessidade de monitorização e controle do sistema de tratamento de água implica o estabelecimento de limites de alerta e de ação para os parâmetros microbiológicos avaliados a fim de que a qualidade da água para hemodiálise não seja comprometida.

O limite de alerta é caracterizado por um nível que, quando excedido, pode indicar desvio da condição normal do processo. Esta situação não requer a tomada de ações imediatas, mas demonstra a necessidade de acompanhamento.

O limite de ação é definido pela legislação brasileira vigente como o ¯valor estipulado que indica a necessidade da adoção de providências para identificação e intervenção preventiva sobre quaisquer parâmetros que estejam se aproximando dos limites estabelecidos‖ (BRASIL, 2014). Nesta circunstância, ações corretivas necessitam ser adotadas para evitar a obtenção de água para hemodiálise em desacordo com os padrões aceitáveis. Além disso, uma investigação necessita ser iniciada e documentada para determinar a causa-raiz do evento e o impacto sobre

os pacientes em tratamento dialítico bem como para estabelecer as medidas necessárias para a eliminação da causa (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

Atualmente, a regulamentação brasileira estabelece que o limite de ação relativo à contagem de bactérias heterotróficas é de no máximo 50 UFC/mL (BRASIL, 2014). Entretanto, caso seja verificada a ocorrência de reações pirogênicas, bacteremia ou suspeita de septicemia nos pacientes, uma verificação adicional da qualidade bacteriológica da água para hemodiálise deve ser realizada. A legislação não estabelece limite de ação para endotoxinas bacterianas.

A Farmacopeia Americana (UNITED, 2019) recomenda que o limite de ação máximo seja de 25 UFC/mL para a contagem de bactérias heterotróficas e 0,25 UE/mL para endotoxinas bacterianas.

Não há um valor padronizado pelos órgãos regulatórios brasileiros e pelos compêndios oficiais para o limite de alerta. Entretanto, a USP justifica que os usuários devem estabelecer este limite de acordo com a revisão histórica dos dados de monitoramento de água das unidades e as particularidades de cada sistema de tratamento de água (UNITED, 2019). O estabelecimento de um limite de alerta de 50% do valor estabelecido para o limite de ação é considerado adequado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015).

3.6.2 Enumeração de bactérias heterotróficas

A maioria dos contaminantes microbianos em sistemas de água encontra-se, principalmente sob a forma de biofilmes em superfícies, com apenas uma porcentagem reduzida do microbioma suspensa na água sob a forma planctônica.Os organismos planctônicos estão associados à presença de biofilmes, bem como a bactérias flutuantes introduzidas no sistema (células pioneiras), que eventualmente podem formar novos biofilmes (UNITED, 2019).

Embora a melhor opção esteja relacionada ao monitoramento direto do desenvolvimento de biofilmes em superfícies, as tecnologias atuais para avaliações de superfície em um sistema de água tornam esta tarefa impraticável em uma clínica de diálise. Portanto, uma abordagem indireta deve ser utilizada: a avaliação para a detecção e enumeração de micro-organismos planctônicos liberados dos biofilmes através da coleta de amostras de saídas do sistema de água. Ao realizar a enumeração dos micro-organismos presentes nestas amostras, pode-se determinar

o estado geral de controle sobre o desenvolvimento do biofilme no sistema de tratamento da água (UNITED, 2019).

Nas últimas décadas, a enumeração de células viáveis presentes em uma amostra ou cultura de interesse tem sido baseada no crescimento de unidadesformadoras de colônias em placas ou membranas filtrantes.

A contagem em placas, embora geralmente considerada como uma medida de viabilidade, indica somente quantas células podem se replicar nas condições previstas para o crescimento, que podem ser diferentes daquelas presentes naamostra original. Como consequência, o método de contagem em placas muitas vezes pode subestimar a viabilidade real de uma amostra. A literatura descreve que, para células estressadas, a contagem de placas pode indicar viabilidade verdadeira em menos de 50% da população de amostras avaliadas (MILLER, 2005b; OLIVER, 2010).

É, portanto, essencial o entendimento de que, quando utilizada a técnica de cultivo, somente uma parcela da população microbiana poderá ser detectada. Essaé a razão pela qual as especificações para água são estabelecidas como limites de ação, e não limites de passa / falha (PINTO; KANEKO; PINTO, 2016).

Distintos grupos e organizações, como a AAMI, ANVISA, *International Organization for Standardization* (ISO) e a Sociedade Japonesa para terapia de diálise, têm proposto a criação de padrões e diretrizes para garantir a qualidade da água de diálise (AAMI, 2014; BRASIL, 2014; MINESHIMA *et al*., 2018; ISO, 2019). Esses padrões definem os níveis máximos permitidos, embora com alguma variância, de contaminantes microbiológicos em água utilizada para o preparo de fluidos de diálise.

O número de recomendações oficiais distintas para a enumeração de bactérias heterotróficas em água para hemodiálise vem aumentando nos últimos anos. Recomendações por autoridades nacionais e organizações internacionais têm sido publicadas periodicamente (Tabela 4).

Entretanto, diferentes recomendações se referem a diferentes técnicas de cultivo, o que significa que mesmo que o limite estabelecido seja o mesmo para um parâmetro avaliado, a interpretação não é a mesma devido à utilização de diferentes técnicas de cultivo utilizadas.

Compêndios oficiais, como o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2017), recomendam o uso dos métodos de semeadura em

profundidade, semeadura em superfície e de filtração por membrana para enumeração de bactérias heterotróficas e fungos em água tratada para diálise. Entretanto, como em qualquer método microbiológico, a variabilidade no crescimentocelular é afetada pelo tipo de meio de cultura utilizado, pelos métodos empregados para a recuperação, pela condição do micro-organismo durante o período de teste (estressado versus saudável) e pela temperatura de incubação (LONNEMANN, 1998; REASONER, 2004; UNITED, 2019).

Tabela 4 – Meios de cultura preconizados pelos compêndios oficiais para a enumeração de bactérias heterotróficas em água para diálise

Compêndio	Meio de cultura	Método	Temperatura de incubação (ºC)	Tempo de incubação
USP (1)	TSA	PP (6) / FM (7)	30-35	3-5 dias
EP (2)	TSA	PP (6) / FM (7)	30-35	3-5 dias
AAMI (3)	R2A / TGEA	PP (6) / FM (7) / SP (8)	17-23	7 dias
APHA (4)	R2A	PP (6) / FM (7) / SP (8)	20-28	5 - 7 dias
	PCA	PP (6) / FM (7) / SP (8)	35	48 ± 3 horas
JSDT (5)	R2A / TGEA	Não especificado	17-23	7 dias

Notas:
(1) Farmacopeia Americana
(2) Farmacopeia Européia
(3) *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (Estados Unidos)
(4) *American Public Health Association* (Estados Unidos)
(5) *Japanese Society for Dialysis Therapy*
(6) *Pour plate*
(7) Filtração por membrana
(8) *Spread plate*
Fonte: MINESHIMA *et al.* (2018); APHA (2017); AAMI (2014); EUROPEAN (2019); UNITED (2019).

O tempo necessário para a obtenção dos resultados constitui a principal desvantagem para os métodos baseados em cultivo (PINTO; KANEKO; PINTO,2016).

Ao longo dos anos o método *pour plate* tem sido o mais comumente utilizado para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água devido ao baixo custo e à facilidade de execução. Entretanto, a adição do ágar fundido a

aproximadamente 45-48ºC pode aumentar o *stress* sobre os micro-organismos, que já se encontram fisiologicamente estressados, resultando na diminuição significativa da recuperação de bactérias em comparação com as recuperações obtidas pelos métodos *spread plate* e filtração por membrana (REASONER; GELDREICH, 1985; REASONER, 2004; APHA, 2017).

O método *spread plate* apresenta condições mais adequadas para a recuperação bacteriana devido à ausência de estresse térmico e à exposição da amostra a condições aeróbicas. Entretanto, devido ao reduzido volume de amostra utilizado (aproximadamente 100µL), esta técnica fornece menor sensibilidade quando comparada as demais (*pour plate* e filtração por membrana), devendo ser utilizada somente quando altos valores de UFC são esperados (REASONER, 2004; PEREIRA *et al*., 2010).

Dentre os métodos apresentados, o método de filtração por membrana é o método mais flexível para a enumeração de bactérias heterotróficas pois permite a análise de volumes de amostra superiores a 1,0 mL e, portanto, a detecção de baixas concentrações de micro-organismos em uma amostra de água. As limitações do método estão relacionadas ao volume de água que pode ser filtrado sem que ocorra a obstrução dos poros da membrana devido à deposição de material particulado na superfície da membrana bem como ao possível dano às células caso uma pressão excessiva seja exercida durante a filtração da amostra (REASONER, 2004; AAMI, 2014; APHA, 2017).

A dificuldade de adaptação dos micro-organismos a ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes e a incapacidade de algumas espécies em se dividir e formar colônias constituem desafios para o cultivo dos micro-organismos.

Nos sistemas de água, bactérias presentes na fase planctônica, geralmente provenientes de biofilmes, são recuperadas e contadas por meios de métodos convencionais (UNITED, 2019). No entanto, organismos em fase bêntica (VNC) são frequentemente difíceis de cultivar, principalmente em meios ricos e complexos.

Até o final da década de 80, os meios de cultura com alto teor nutricional, como o ágar caseína de soja (TSA) e o ágar padrão para contagem (PCA) eram recomendados para a enumeração de bactérias heterotróficas em amostras de água potável e tratada (SANDLE, 2014).

Entretanto, após a publicação do estudo realizado por Reasoner e Geldreich (1985), o meio de cultura Reasoner'2 Ágar (R2A) foi apresentado como substituto ao

TSA e ao PCA pois permite maior recuperação bacteriana, principalmente se incubado à temperatura de 20-25ºC por 5 a 7 dias (REASONER; GELDREICH, 1985; LONNEMANN, 1998; REASONER, 2004; BUGNO; ALMODOVAR; PEREIRA, 2010; APHA, 2017; SANDLE, 2014; UNITED, 2019).

Os meios pouco nutritivos, como o Ágar R2A, quando incubados preferencialmente a baixas temperaturas de incubação, permitem a obtenção de contagens de aeróbicos cinco a dez vezes maiores. Este fato está relacionado à sobrevivência de bactérias sob alterações físicas e queda metabólica em ambientes oligotróficos (REASONER, 2004; PINTO; KANEKO; PINTO, 2016).

Embora os micro-organismos VNC possam ser cultivados em meio com baixo nível de nutrientes, sob temperaturas mais baixas e tempos mais longos de incubação (10 a 14 dias), o valor de um resultado de contagem obtido em 14 dias é questionável (PINTO; KANEKO; PINTO, 2016).

Atualmente, o TSA e o PCA são indicados para o isolamento e enumeração de bactérias heterotróficas isoladas de animais e seres humanos, enquanto os meios com baixo teor nutricional, como o R2A, são indicados para a detecção de bactérias oligotróficas de crescimento lento e para a enumeração de bactérias heterotróficas adaptadas a ambientes aquáticos e que requerem baixa concentração de nutrientes (REASONER; GELDREICH, 1985; ALLEN; EDBERG; REASONER, 2004; APHA, 2017; UNITED 2019).

3.7 Métodos microbiológicos alternativos

Os métodos analíticos de referência atualmente disponíveis para a enumeração de micro-organismos são métodos amplamente acessíveis, reprodutíveis e reconhecidos por agências regulatórias como *Padrão Ouro* (JASSON *et al*., 2010). Por estarem fundamentados em métodos clássicos de cultivo, dependem de condições que permitam o crescimento e a replicação microbiana até a detecção por exame visual, que pode demandar entre 18 horas a 14 dias (JASSON *et al*., 2010; UNITED, 2019).

Considerando que a qualidade microbiológica da água é um parâmetro crítico do sistema que deve ser monitorado, é difícil reagir aos resultados quando a qualidade não pode ser avaliada em tempo real.

Os inconvenientes relacionados ao tempo de espera para a obtenção dos resultados e a dependência de técnicas de cultivo tem conduzido à busca estratégica de métodos microbiológicos alternativos que permitam obter dados significativamente mais rápidos, exatos e precisos do que os obtidos por métodos clássicos, além de, em algumas situações, propiciar o monitoramento do processo em tempo real (SUTTON, 2005; CANAUD, 2010; JASSON *et al.*, 2010; PDA, 2013).

As novas tecnologias, também denominadas de métodos microbiológicosrápidos, permitem a detecção, identificação e quantificação microbiana em menor tempo quando comparadas aos métodos tradicionais. Além de diminuir o tempo de liberação de resultados e de antecipar a tomada de decisões relacionadas às investigações, estas tecnologias podem oferecer automatização dos ensaios, maior precisão, reprodutibilidade e sensibilidade (MILLER, 2005a).

Os métodos microbiológicos alternativos, segundo a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2016), são categorizados em três grupos, de acordo com suas tecnologias e aplicações:

a) Métodos baseados no crescimento: estão relacionados à medição de parâmetros fisiológicos ou bioquímicos que refletem a replicação e a proliferação de micro-organismos. São exemplos deste grupo os métodos eletroquímicos, bioluminescência, detecção da produção ou consumo de gás e emprego de substratos cromogênicos.

b) Métodos baseados na medida direta da viabilidade: estão fundamentados no emprego de corantes para componentes bioquímicos das células microbianas ou na fluorescência obtida pela clivagem enzimática de substratos fluorogênicos em micro-organismos viáveis. Citometria de fluxo, citometria de fase sólida e epifluorescência direta são alguns dos representantes desta categoria de método independente de cultivo microbiano.

c) Métodos baseados na análise de componentes celulares: são métodos que apresentam alto grau de especificidade e utilizam a expressão de componentes celulares como medida indireta para a presença microbiana. Dois exemplos deste grupo são a espectrometria de massa e a amplificação de ácidos nucleicos.

Entretanto, as dificuldades em avaliar, validar e obter a aprovação dos órgãos regulatórios para utilização destas tecnologias nos ensaios microbiológicos tem retardado a implementação de novas formas de trabalho pois a demonstração da equivalência frente a métodos oficiais necessita ser comprovada (PDA 2013; UNITED, 2019).

Compêndios oficiais, como a Farmacopeia Brasileira (2016), *United States Pharmacopeia* (2019) e a *European Pharmacopoeia* (2017), influenciados pela publicação do PDA *Technical Report* n.33, *Evaluation, Validation and Implementation of new microbiological testing methods* (PDA, 2013), recentemente publicaram capítulos específicos para auxiliar a comunidade científica e a indústria farmacêutica na validação de métodos microbiológicos alternativos. Os capítulos 5.5.3.6 Métodos microbiológicos alternativos (FARMACOPEIA, 2016), <1223> *Validation of alternative microbiological methods* (UNITED, 2019) e 5.1.6 *Alternative methods for control of microbiological quality* (EUROPEAN, 2017) são alguns exemplos e encontram-se atualmente vigentes.

3.7.1 Técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência

Metodologias que utilizam o princípio de coloração por fluorescência têm sido amplamente empregadas para monitorar a contaminação microbiana nas últimas décadas, principalmente na indústria de alimentos, devido à possibilidade de redução do tempo analítico e à precisão dos resultados (BAUMSTUMMLER *et al.*, 2010).

O potencial para detecção microbiana pelo uso de fluorescência permitiu o desenvolvimento de tecnologias analíticas, entre as quais o sistema Milliflex® Quantum.

O sistema Milliflex® Quantum é uma tecnologia baseada em crescimento que combina a filtração de amostras por membrana com a coloração fluorescente de micro-organismos viáveis, sendo composto por uma bomba de filtração, leitor de fluorescência, câmara e fluorocromos, como demonstrado na Figura 4 (MILLIPORE, 2010).

Figura 4 - Componentes do sistema Milliflex® Quantum

Fonte: MILLIPORE (2010).

Após a etapa de filtração da amostra com o auxílio de uma bomba, os micro-organismos são retidos na membrana e corados por um marcador de viabilidade de fluorescência. O princípio da técnica é baseado em uma reação enzimática na qual o éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE), substrato fluorogênico utilizado, é um marcador de viabilidade não fluorescente que é clivado por enzimas intracelulares não específicas resultando na liberação do composto éster de succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE), um produto fluorescente quando excitado ao comprimento de onda de 488nm (BAUMSTUMMLER *et al.*, 2010). Por apresentar baixa permeabilidade à membrana celular, o CFSE é acumulado no interior das células e, portanto, atua como indicativo de atividade do metabolismo microbiano e da integridade da membrana, permitindo detectar microcolônias após exposição ao comprimento de onda de excitação do corante de fluorescência através do leitor Milliflex® Quantum (MILLER, 2005b; BAUMSTUMMLER *et al.*, 2010; MEDER *et al.*, 2012).

Como apenas células viáveis (incluindo endósporos, formas vegetativas, bactérias anaeróbias e fungos) são capazes de reter e acumular o CFSE, serãoestas as células que serão identificadas pela emissão de fluorescência.

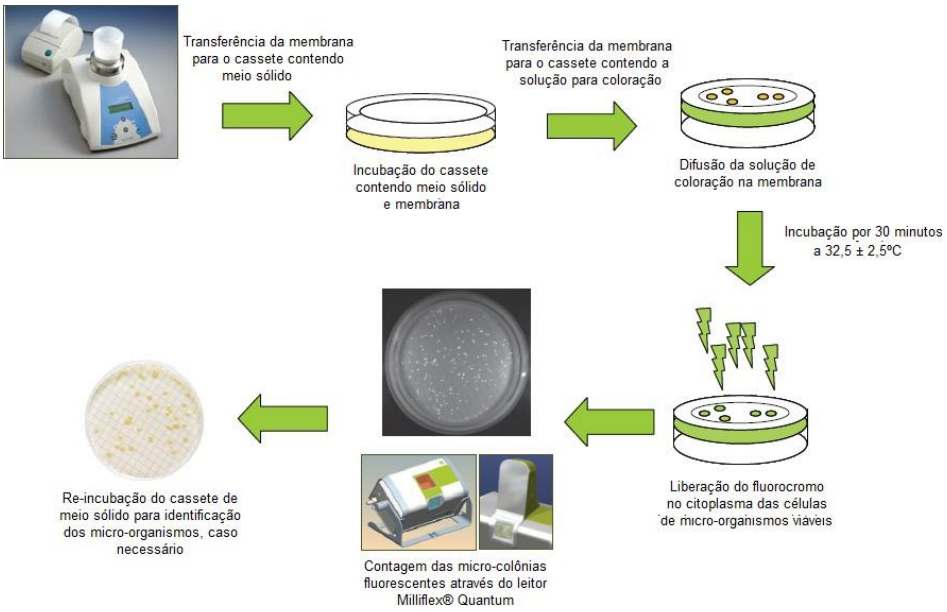
Através desta técnica, as microcolônias fluorescentes podem ser contadas pelo analista diretamente através do leitor do equipamento Milliflex® Quantum ou através de uma imagem exibida em uma tela de computador por meio de uma câmera acoplada ao leitor do equipamento e a utilização de um software. Através do software é possível clicar nas colônias e marcá-las como contadas, o que diminui as chances de erros humanos.

Portanto, após curto período de incubação, é possível observar a detecção de microcolônias fluorescentes e realizar a liberação de resultados de enumeração de micro-organismos sem a necessidade de aguardar a contagem visual das unidades formadoras de colônias (BAUMSTUMMLER *et al.*, 2010; MEDER *et al.*, 2012). A

figura 5 apresenta o esquema das etapas envolvidas na detecção microbiana pelo uso de fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum.

As vantagens da utilização deste sistema para a avaliação da qualidade microbiológica da água tratada para diálise estão relacionadas à facilidade de execução da técnica e à obtenção de resultados de detecção de micro-organismos viáveis e cultiváveis em menor tempo, quando comparado aos métodos oficiais, permitindo a antecipação de investigações sobre possíveis falhas no tratamento da água. É caracterizado por ser um método não destrutivo, permitindo posterior identificação por meio de tecnologias de caracterização microbiana (MILLER, 2005b; BAUMSTUMMLER *et al.*, 2010; MEDER *et al.*, 2012).

Figura 5 - Etapas realizadas na detecção microbiana pelo uso de fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum



Fonte: Adaptado de MILLIPORE (2010).

Embora inevitavelmente a obtenção de resultados seja mais lenta do que, por exemplo, com a utilização de métodos baseados em RNA / DNA que proporcionariam resultados em tempo real, os métodos baseados no crescimento oferecem a vantagem de se aproximar dos métodos tradicionalmente utilizados, o que facilita a condução dos ensaios de validação frente aos requisitos das farmacopeias, além de investimento inferior para a aquisição de insumos e equipamento.

3.7.2 Validação de métodos microbiológicos alternativos quantitativos

A implementação de métodos alternativos microbiológicos para a enumeração de bactérias heterotróficas e fungos possui grande relevância para garantir a segurança e qualidade dos procedimentos dialíticos aos quais os pacientes com insuficiência renal crônica estão expostos.

Entretanto, para que o método alternativo possa ser utilizado em substituição ao método oficial é necessário que o laboratório conduza a validação da metodologia e apresente informações detalhadas que comprovem com alto nível de segurança que o procedimento específico tem desempenho consistente para atender as especificações pré-determinadas e atributos de qualidade para a aplicação analítica intencionada (PDA, 2013; UNITED, 2019).

A validação do método microbiológico alternativo para detecção por fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum, pode ser realizada segundo parâmetros e procedimentos descritos nas Farmacopeias Americana (UNITED, 2019), Européia (EUROPEAN, 2017) e Brasileira (FARMACOPEIA, 2016), bem como no documento *Pharmaceutical Drugs Association Technical Report* 33, publicado por *Pharmaceutical Drugs Association* (PDA, 2013), que indicam quais critérios devem ser avaliados em termos microbiológicos, além da inclusão da equivalência como critério de aceitação para uma categoria adicional (DE BOER; BEUMER, 1999;SUTTON, 2005; JASSON *et al.*, 2010; CANAUD, 2011; PDA, 2013; UNITED, 2019).

A comprovação da equivalência, através do teste de não inferioridade, em relação ao método oficial também deve ser realizada para demonstrar que o método alternativo não apresenta sensibilidade inferior e é tão eficaz quanto o método tradicional (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; UNITED, 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Para a realização deste trabalho foram utilizadas cepas, classificadas como Material de Referência Certificado dos seguintes micro-organismos: *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).

A apresentação Bioball *Multishot* 550 UFC (Biomerieux, Austrália) foi utilizada para a condução do estudo com os micro-organismos *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743). A hidratação destes micro-organismos liofilizados foi realizada com o fluido de reidratação de 14 dias (Biomerieux, Austrália).

Para a condução dos estudos com o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foi utilizada a apresentação Lab Elite™ (Microbiologics, Estados Unidos da América).

Foi utilizado o meio de cultura Ágar R2A (Merck, Alemanha) para a execução dos ensaios pelo método convencional. O insumo foi adquirido desidratado e meio de cultura preparado no Instituto Adolfo Lutz de acordo com as instruções do fabricante, bem como a água purificada estéril e as soluções de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e cloreto de sódio peptona pH 7,0 utilizadas para o preparo e diluições das suspensões microbianas. Os lotes de meios de cultura preparados foram avaliados quanto à capacidade promotora de crescimento e esterilidade antes da utilização, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010).

O equipamento utilizado para a detecção microbiana pelo uso de fluorescência foi o sistema Milliflex® Quantum (Millipore, Alemanha). Os insumos utilizados para a realização dos ensaios pelo método alternativo foram adquiridos diretamente com o fabricante do equipamento. As descrições e os respectivos números de catálogo dos insumos utilizados são: unidade de filtração Milliflex® HAWG 100 mL(MXHAWG124), cassete para meio líquido (MXLMC0120), reagente de fluorescência(MXQTV0KT1) e cassete de incubação Milliflex® pré envasado com ágar R2A (MXSMCRA48).

Para a execução dos ensaios da etapa de Equivalência foram utilizadas amostras de água tratada para diálise coletadas em frascos estéreis pelos grupos de

Vigilância Sanitária Municipais e Estaduais do Estado de São Paulo em serviços de diálise localizados em municípios do Estado de São Paulo, durante os meses deAbril e Maio de 2019, totalizando 24 amostras (aproximadamente 12% dos serviços de diálise em funcionamento no Estado de São Paulo). O ponto de água tratada localizado na sala de processamento (reuso) foi o ponto de coleta definido para o estudo. Na ausência de sala de processamento na unidade, foi utilizado o ponto de retorno da alça de distribuição (*Loop*).

4.2 Métodos

A coleta e o transporte das amostras de água tratada para hemodiálise foram realizados de acordo com as recomendações da *American Public Health Association* (APHA, 2017). Inicialmente os pontos de coleta foram desinfetados com solução de álcool 70% (v/v) seguidos pela manutenção do escoamento da água por 3 a 5 minutos, culminando na coleta da amostra após este período. O material para análise foi transportado em caixas térmicas com capacidade máxima de 26 litros (Easypatch®, São Paulo) ao Instituto Adolfo Lutz imediatamente após a coleta, sob temperatura inferior a 10ºC, e processado no mesmo dia do recebimento (BUGNO *etal.*, 2018).

Os ensaios foram realizados no Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança do Instituto Adolfo Lutz Central, em São Paulo.

Para a realização do estudo de validação foi necessária a condução de diversas etapas analíticas para a obtenção de informações detalhadas que comprovassem que o procedimento tem desempenho consistente para atender as especificações pré-determinadas e atributos de qualidade para a aplicação analítica intencionada. O estudo foi dividido em três etapas: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias (etapa1), Avaliação de Desempenho (etapa 2) e Equivalência (etapa 3).

A metodologia tradicional utilizada para a realização dos ensaios foi a descrita no capítulo 9215 do compêndio *Standard methods for examination of water and wastewater* (APHA, 2017).

4.2.1 Etapa 1: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum

A etapa 1 buscou avaliar como a variação no tempo de incubação pode afetar o resultado final para enumeração de bactérias, bem como determinar o tempo mínimo de incubação necessário para obtenção de valores de contagem confiáveis para cada um dos micro-organismos analisados.

Distintos tempos de incubação foram testados para cada um dos micro-organismos avaliados. Os testes foram executados simultaneamente através do método tradicional e alternativo, como descrito nos subitens 4.2.1.2 e 4.2.1.3

O preparo das suspensões microbianas utilizadas para a condução dos ensaios é descrito no subitem 4.2.1.1.

4.2.1.1 Preparo das suspensões microbianas

4.2.1.1.1 *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743)

Para a condução dos ensaios, foi utilizada a apresentação Bioball Multishot 550 UFC (Biomerieux, Austrália) para os micro-organismos *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743), os quais foram hidratados com 1,1 mL do fluido de reidratação de 14 dias (Biomerieux, Austrália), seguido pela homogeneização em agitador de tubos tipo vórtex (Marconi MA162), resultando em um inóculo com concentração de 50 UFC/100µL.

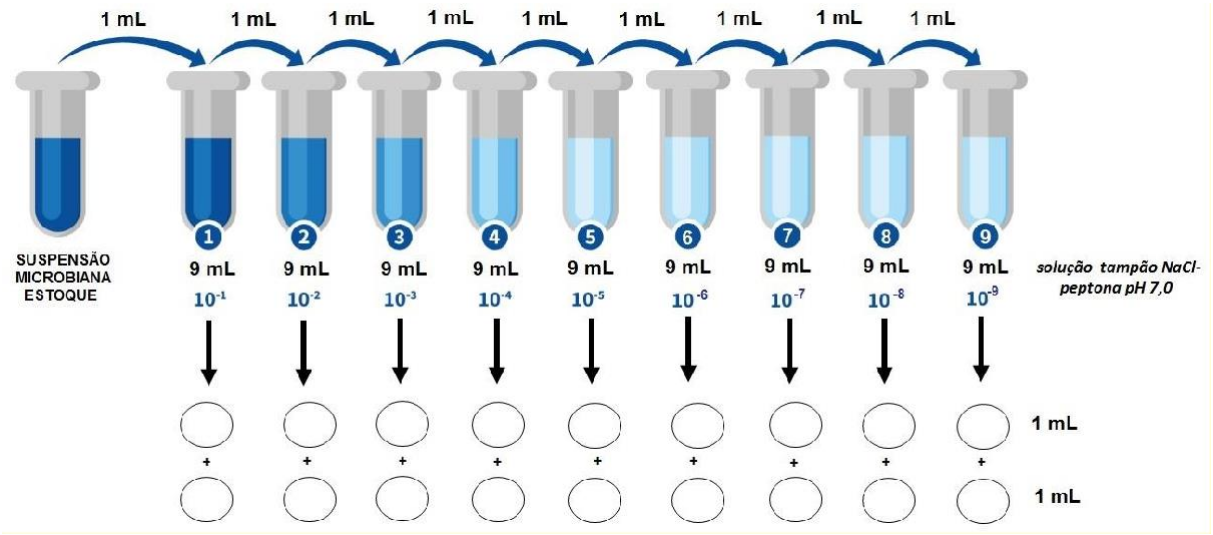
4.2.1.1.2 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

Para a condução dos estudos com o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foi utilizada a cepa de referência Lab Elite™ (Microbiologics, Estados Unidos da América), a qual foi hidratada e preparada de acordo com as instruções de uso do fabricante (MICROBIOLOGICS, 2013).

Para o preparo da suspensão microbiana padronizada de *Pseudomonas aeruginosa*, uma colônia isolada da cultura primária foi semeada em tubo de ágar

caseína de soja inclinado, com auxílio de alça bacteriológica, e o tubo incubado por 24 horas à temperatura de 32,5 ± 2,5ºC. Após o período de incubação, foram adicionadas 10 mL de solução tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0 ao tubo inclinado para obtenção da suspensão microbiana estoque. Com o auxílio de pipetador automático, 1 mL da suspensão microbiana foi transferida para um tubo contendo 9 mL de solução tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0 (10^{-1}). Procedeu- se à diluição seriada (1:10) de modo a obter diluições até 10^{-9}, conforme figura 6.

Figura 6 – Preparo da suspensão microbiana padronizada de *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Elaborada pelo autor

Em duplicata, 1 mL de cada uma das diluições foi transferida para o centro de uma placa de Petri e 20 mL de ágar R2A previamente fundido foi adicionado, as placas homogeneizadas e incubadas em posição invertida após completa solidificação do ágar em estufa bacteriológica à temperatura de 32,5 ± 2,5ºC por 24 horas. Após contagem visual das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nas placas a concentração do inóculo foi ajustada para 50 UFC/mL.

4.2.1.2 Metodologia tradicional

A análise das suspensões microbianas foi realizada através da técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando o ágar R2A como meio de cultura para o cultivo de bactérias (APHA, 2017).

Para a condução dos ensaios, 100µL de cada um dos inóculos individuais de *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743) com concentração de 50 UFC/100µL foram transferidos para o centro de uma placa de petri descartável, de modo a obter 50UFC por placa. Para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), 1 mL da suspensão microbiana padronizada com concentração de 50 UFC/mL foi transferida para o centro de uma placa de petri descartável, de modo a obter 50 UFC por placa.

Em seguida, 20 mL do ágar previamente fundido foram adicionados, as placas homogeneizadas e incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica, após completa solidificação do ágar. A contagem visual das unidades formadoras decolônia (UFC) presentes nas placas foi efetuada após 120 horas de incubação a24,0 ± 4,0 ºC, conforme recomendado pela *APHA* (APHA, 2017). Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

Como controle negativo, 100uL do fluido de reidratação de 14 dias foi transferido para o centro de uma placa de petri. Em seguida, 20 mL do ágar previamente fundido foram adicionados, a placa homogeneizada e incubada em estufa bacteriológica para avaliação visual após 120 horas de incubação a 24,0 ± 4,0ºC.

4.2.1.3 Metodologia alternativa

Foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril contaminada artificialmente e individualmente com 100 µL dos inóculos microbianos com concentração de 50 UFC/100µL (*Escherichia coli* NCTC 12923, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788 e *Burkholderia cepacia* NCTC 10743) e com 1 mL do inóculo com concentração de 50 UFC/mL (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027), em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45µme diâmetro de 47mm, com o auxílio de bomba de vácuo, de modo a obter 50 UFCpor membrana para cada um dos inóculos individuais dos micro-organismos avaliados.

Após a filtração, a membrana foi assepticamente transferida para uma placa pré envasada com ágar R2A e o conjunto placa e membrana, então, incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ± 4,0ºC pelos períodos de 24, 36, 40, 48 e 120 horas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada tempo de incubação proposto.

Após cada período de incubação avaliado, a membrana foi assepticamente transferida para uma base de celulose umedecida com 2 mL do reagente de fluorescência e o conjunto incubado por 30 minutos na temperatura de 32,5 ± 2,5 °C para difusão do reagente. A contagem das microcolônias fluorescentes utilizando o leitor Milliflex® Quantum foi realizada após os 30 minutos de incubação. Os resultados foram registrados sob a denominação de contagem fluorescente.

Após a contagem, as membranas foram assepticamente transferidas para placas pré-envasadas com Ágar R2A e os conjuntos placa e membrana foram reincubados em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ± 4,0ºC até o tempo total de incubação de 120 horas.

Após o período de incubação foi realizada a contagem visual das UFC, sendo os resultados registrados sob a denominação contagem de viabilidade.

Como controle negativo, foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril adicionado de 100 uL do fluido de reidratação de 14 dias, em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45µm e diâmetro de 47mm, com o auxílio de bomba de vácuo.

4.2.1.4 Critérios de aceitação

As contagens obtidas por fluorescência pelo método alternativo bem como as contagens obtidas após a reincubação das placas, também pelo método alternativo, foram comparadas às obtidas pelo método tradicional. Para a avaliação dos dados, foi utilizado o valor do log das UFC obtidas nas contagens.

As taxas de recuperação de contagem fluorescente e recuperação de viabilidade foram calculadas de acordo com as fórmulas 1 e 2, respectivamente, descritasabaixo.

$$\text{recuperação de contagem fluorescente (\%)} = \frac{\text{contagem fluorescente Milliflex (log)}}{\text{contagem método tradicional (log)}} \times 100 \qquad (1)$$

$$\text{recuperação de viabilidade (\%)} = \frac{\text{contagem de viabilidade (log)}}{\text{contagem método tradicional (log)}} \times 100 \qquad (2)$$

4.2.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho

De acordo com os principais compêndios, para que um método microbiológico alternativo seja utilizado em substituição ao método de referência, ele deve ser validado (FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019). Portanto, o método de enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise pela técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência foi desafiado frente aos parâmetros estabelecidos para testes quantitativos descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros de validação para métodos microbiológicos alternativos

Parâmetros	Testes quantitativos
Especificidade	Sim
Limite de detecção	Sim [(1)]
Exatidão	Sim
Precisão	Sim
Limite de quantificação	Sim
Linearidade	Sim
Intervalo	Sim
Robustez	Sim
Equivalência	Sim

[(1)] Teste não obrigatório pela Farmacopeia Européia para alguns ensaios.

Fonte: PDA (2013); FARMACOPEIA (2016); EUROPEAN (2017); UNITED (2019).

4.2.2.1 Delineamento experimental

Foram contempladas todas as exigências relativas ao número mínimo de réplicas, concentrações e suspensões microbianas exigidas pelos compêndios oficiais para a avaliação de desempenho do método do método alternativo (FARMACOPEIA, 2010; PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017;
UNITED, 2019).

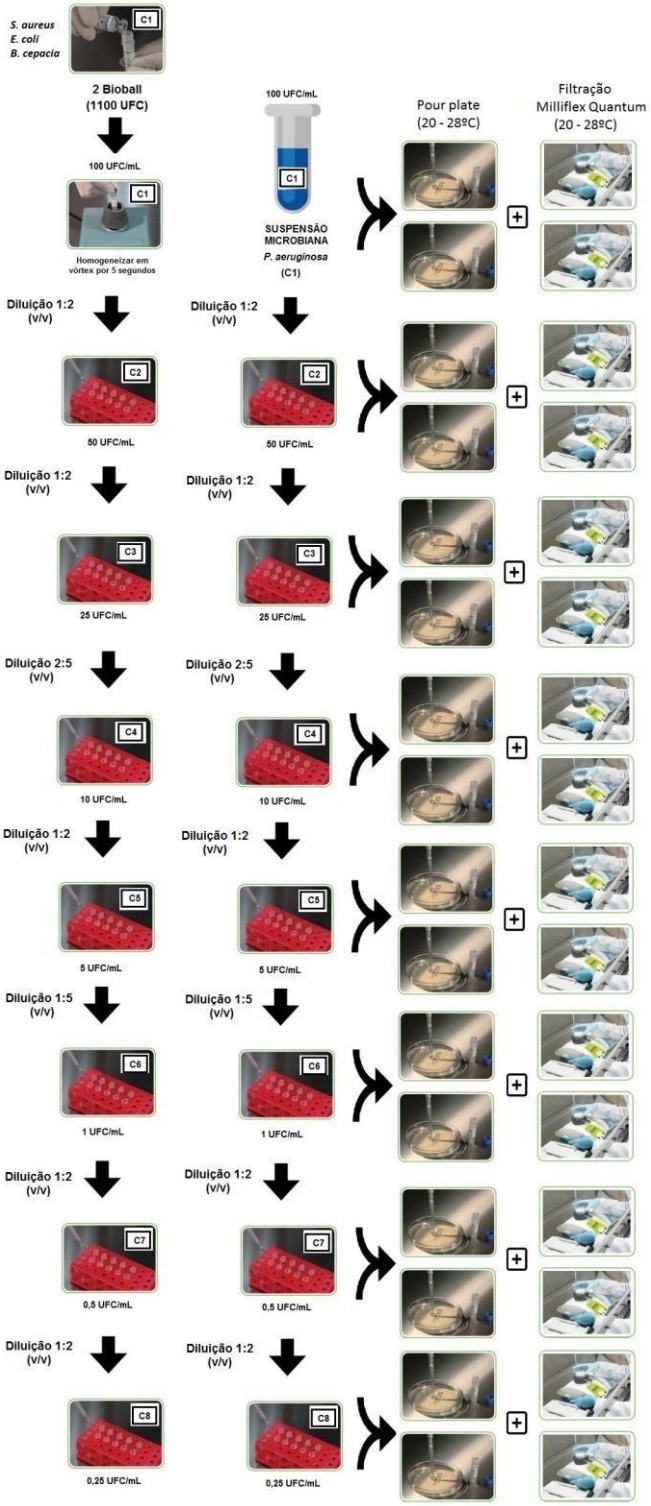
Foram preparadas suspensões microbianas individuais para cada um dos micro-organismos avaliados: *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788), *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743) e *Pseudomonas aeruginosa* (NCTC 12924).

A escolha dos micro-organismos desafiados foi baseada naqueles indicados para a avaliação da capacidade promotora de crescimento dos métodos de enumeração microbiana das Farmacopeias Brasileira, Européia e Americana (FARMACOPEIA, 2010; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019), com exceção da *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743). Estudos relatam o isolamento deste último micro-organismo em amostras de água tratada para diálise, motivo que justificou sua inclusão no presente trabalho (MAGALHÃES *et al*., 2003; BUGNO *et al.*, 2007).

Duas unidades da apresentação *Multishot* 550 UFC de cada um dos micro-organismos *Escherichia coli* (NCTC 12923), *Staphylococcus aureus* (NCTC 10788) e *Burkholderia cepacia* (NCTC 10743), foram hidratadas individualmente com 1,1 mL do fluido de reidratação de 14 dias (Biomerieux, Austrália), seguido pela homogeneização em agitador de tubos tipo vórtex (Marconi MA162), resultando em um inóculo individual com concentração de 50 UFC/100µL. O conteúdo reconstituído destas duas unidades foi transferido para um tubo contendo 8,8 mL de solução salina 0,9%, resultando em um inóculo microbiano com concentração de 100 UFC/mL, identificado como C1 para cada micro-organismo, conforme demonstrado na figura 7.

Para a condução dos estudos com o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) foi utilizada a suspensão microbiana padronizada de *Pseudomonas aeruginosa*, preparada conforme descrito no subitem 4.2.1.1.2 (Figura 6), mas para esta etapa, após contagem visual das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nas placas referentes às diluições seriadas, a concentração do inóculo foi ajustada para 100 UFC/mL e identificada como C1 para o respectivo micro- organismo, conforme demonstrado na figura 7.

Figura 7 – Resumo da etapa experimental para avaliação de desempenho



Fonte: Elaborada pelo autor
Nota: A elaboração da figura foi realizada com o uso de imagens extraídas das referências MILLIPORE (2010) e BIOMERIEUX (2010).

A partir das soluções C1 de cada micro-organismo, foram realizadas diluições geométricas de modo a obter suspensões microbianas em oito faixas de

concentração: de 2,5 x 10^{-1} a 1,0 x 10^{2} UFC/mL (C1 a C8), conforme demonstrado na figura 7. As diluições foram preparadas em tubos de ensaio estéreis, utilizando solução cloreto de sódio 0,9% (p/v) como diluente. Todas as diluições foram homogeneizadas durante 1 minuto em agitador de tubos do tipo vórtex (Marconi MA162) antes do uso.

Para cada micro-organismo este procedimento foi repetido 7 vezes, resultando no preparo de 7 inóculos independentes de cada nível de concentração, utilizados para as avaliações concomitantes através do método tradicional e do método alternativo proposto, juntamente com uma réplica utilizando água purificada estéril como controle negativo do ensaio. Os ensaios foram conduzidos de acordo com os subitens 4.2.2.2 Metodologia tradicional e 4.2.2.3 Metodologia Alternativa, simultaneamente.

Para o estudo de precisão intermediária, foram preparados 3 inóculos independentes para os níveis de concentração de 10, 25, 50 e 100 UFC/mL por um segundo analista, no mesmo laboratório, em dia distinto ao primeiro analista.

4.2.2.2 Metodologia tradicional

Os ensaios foram conduzidos através da técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando o ágar R2A como meio de cultura e inóculos individuais dos micro-organismos (APHA, 2017).

Para a condução dos ensaios, 1 mL de cada diluição das suspensões microbianas (C1 a C8) preparadas conforme a figura 7, foi transferida para o centro de placas de petri descartáveis. Em seguida, 20 mL do ágar previamente fundido foram adicionados, as placas homogeneizadas e incubadas em posição invertida em estufa bacteriológica, após completa solidificação do ágar. A contagem visual das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nas placas foi efetuada após 120 horas de incubação a 24,0 $\pm$ 4,0 ºC, conforme recomendado pela *APHA* (APHA, 2017). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Como controle negativo, 1 mL de água purificada estéril foi transferida para o centro de uma placa de petri. Em seguida, 20 mL do ágar previamente fundido foi adicionado, as placas homogeneizadas e incubadas em estufa bacteriológica para avaliação visual após 120 horas de incubação a 24,0 $\pm$ 4,0 ºC.

4.2.2.3 Metodologia alternativa

Foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril contaminada artificialmente com 1 mL de cada diluição das suspensões microbianas (C1 a C8) preparadas conforme a figura 7, em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45µm e diâmetro de 47mm, com o auxílio de bomba de vácuo, para cada um dos micro-organismos avaliados.

Após a filtração, a membrana foi assepticamente transferida para uma placa pré envasada com ágar R2A e o conjunto placa e membrana, então, incubado em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ± 4,0 ºC pelo período de 40 horas, conforme determinado após a realização dos ensaios descritos no subitem 4.2.1.3 deste projeto. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação avaliado, a membrana foi assepticamente transferida para uma base de celulose umedecida com 2 mL do reagente de fluorescência e o conjunto incubado por 30 minutos na temperatura de 32,5 ± 2,5 °C para difusão do reagente. A contagem das microcolônias fluorescentes utilizando o leitor Milliflex® Quantum foi realizada após os 30 minutos de incubação. Os resultados foram registrados sob a denominação de contagem fluorescente.

Após a contagem, as membranas foram assepticamente transferidas para placas pré envasadas com Ágar R2A e os conjuntos placa e membrana foram reincubados em estufa bacteriológica à temperatura de 24,0 ± 4,0 ºC até o tempo total de incubação de 120 horas.

Após o período de incubação foi realizada a contagem visual das UFC, sendo os resultados registrados sob a denominação contagem de viabilidade.

Como controle negativo, foi realizada a filtração de 100 mL de água purificada estéril, em membrana de ésteres mistos de celulose (HAWG) com tamanho de poro de 0,45µm e diâmetro de 47mm, com o auxílio de bomba de vácuo.

4.2.2.4 Critérios de aceitação

Após a realização dos ensaios, as contagens obtidas por fluorescência pelométodo alternativo bem como as contagens obtidas após a reincubação das placas, também pelo método alternativo, foram comparadas às obtidas pelo método

tradicional. Para a avaliação dos dados, foi utilizado o valor do log das UFC obtidas nas contagens.

As taxas de recuperação de contagem fluorescente e recuperação de viabilidade foram calculadas de acordo com as fórmulas 1 e 2, respectivamente, descritas no subitem 4.2.1.4 Critérios de aceitação.

4.2.2.4.1 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os valores medidos em cada método e o valor verdadeiro (PDA, 2013).

Para avaliação deste parâmetro, o método alternativo deve fornecer resultados equivalentes ou superiores aos obtidos pelo método oficial. Desta forma, as recuperações de fluorescência e viabilidade foram calculadas, sendo aceita recuperação mínima de 70% por nível de concentração (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

4.2.2.4.2 Precisão

A precisão é caracterizada pelo grau de dispersão dos resultados individuais de distintas medições de uma mesma suspensão microbiana, sendo usualmente expressa como o coeficiente de variação (PDA, 2013).

Para avaliação deste parâmetro, o método alternativo não deve apresentar variabilidade significativamente maior que o método oficial. Desta forma, foi calculado o coeficiente de variação para cada nível de concentração, sendo aceitos valores inferiores a 30% (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; UNITED, 2019).

4.2.2.4.2.1 Precisão intermediária

O estudo de precisão intermediária possui o objetivo de avaliar os resultados obtidos após a análise de uma mesma amostra por analistas distintos em, no mínimo, dois dias diferentes no mesmo laboratório. Ou seja, avalia a concordância entre os resultados, sendo usualmente expresso como o coeficiente de variação (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

Desta forma, foi calculado o coeficiente de variação para cada nível de concentração, frente aos resultados obtidos pelos dois analistas, sendo aceitos valores inferiores a 30% (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; UNITED, 2019).

Em seguida, foi realizado o estudo de medição de repetibilidade e reprodutibilidade (R&R) para avaliar se a variabilidade das medições poderia ser explicada pela diferença entre analistas.

Para demonstrar que a interação entre dia e analista não é significativa, a tabela ANOVA do estudo R&R deverá indicar valores de *p* iguais ou superiores a 0,05 e a tabela de avaliação das medições do estudo R&R deverá apresentar uma porcentagem de variação do estudo inferior a 30% e um número de categorias distintas superiores a 5.

4.2.2.4.3 Linearidade

A linearidade corresponde à habilidade em produzir resultados proporcionais à concentração de um micro-organismo presente na amostra em um intervalo definido. O método alternativo deve apresentar coeficiente de correlação (R^2) maior ou igual a 0,95, calculado a partir da média das réplicas de cada uma das concentrações, e inclinação da reta compreendida entre 0,8 e 1,2 (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

4.2.2.4.4 Especificidade

A especificidade consiste na habilidade em detectar uma variedade de micro-organismos, definidos em função do uso pretendido, como por exemplo micro-organismos que apresentam riscos ao paciente ou que podem estar relacionados às falhas no sistema de tratamento para obtenção do padrão de qualidade de água aceitável. O método alternativo deve detectar os micro-organismos de desafio, não sendo estatisticamente diferente do método oficial (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

Para a avaliação deste parâmetro o critério de aceitação foi definido como a detecção positiva para todos os micro-organismos desafiados no nível de concentração definido como limite de detecção do método alternativo.

4.2.2.4.5 Limite de Detecção

O limite de detecção corresponde ao menor número de micro-organismos que podem ser detectados em uma amostra, mas não necessariamente quantificados, sob as condições experimentais estabelecidas. O método alternativo não deve apresentar nível de recuperação estatisticamente diferente ao método oficial quando empregado inóculo contendo baixa concentração de micro-organismos (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

A avaliação foi demonstrada pelo teste do T *de Student* para o nível de concentração em que foi observado crescimento microbiano em 50% das amostras pelo método tradicional para todos os micro-organismos avaliados (PDA, 2013; UNITED, 2019).

4.2.2.4.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor carga microbiana que pode ser enumerada com precisão e exatidão sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação foi determinado através dos resultados obtidos nos ensaios de precisão, exatidão e linearidade, sendo correspondente à menor concentração com conformidade frente a estes três parâmetros. O métodoalternativo deve demonstrar ser tão sensível quanto o método de referência (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

4.2.2.4.7 Intervalo

O intervalo pode ser definido como a faixa de concentração de micro-organismos compreendida entre os limites superiores e inferiores que conseguem ser determinados com precisão, exatidão e linearidade. (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

4.2.2.4.8 Robustez

A robustez e a resistência correspondem à avaliação do grau de reprodutibilidade do método sob distintas condições operacionais e ambientais.

A robustez foi avaliada através da realização de ensaios utilizando distintos períodos de incubação conforme descrito no subitem 4.2.1.3 Metodologia alternativa.

4.2.3 Etapa 3: Equivalência

Esta etapa contemplou a avaliação da equivalência entre o método tradicional (APHA, 2017) e o método alternativo.

O teste de Equivalência pode ser conduzido diretamente com os resultadosobtidos nos ensaios de avaliação dos parâmetros de validação. Alternativamente, também pode ser realizado através da avaliação do método alternativo versus método tradicional, em paralelo, de um determinado número de amostras por um período pré-determinado de tempo (EUROPEAN, 2017).

Desta forma, inicialmente foram avaliados os resultados obtidos na avaliação de desempenho do método (subitem 4.2.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho) e, em seguida, foram conduzidos os ensaios, em paralelo, através do método alternativo e método tradicional para as amostras de água tratada para diálise.

Para a realização destes ensaios foram utilizadas 24 amostras de água tratada para diálise coletadas pelos Grupos de Vigilância Sanitária Municipais e Estaduais do Estado de São Paulo em serviços de diálise localizados em municípios do Estado de São Paulo, como detalhado no subitem 4.1 Material. A amostragem contemplou aproximadamente 12% dos serviços de diálise em funcionamento no Estado de São Paulo.

A execução dos ensaios foi realizada, em paralelo, de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.2.2.2 Metodologia tradicional e 4.2.2.3 Metodologia Alternativa. Foram plaqueadas as diluições 10^0 (1 mL) e 10^{-1} (100 µL)de cada uma das amostras.

A equivalência corresponde à medida do quanto os resultados obtidos com o método alternativo e o método tradicional são similares, sendo demonstrada pelo nível de significância estatística entre métodos através da aplicação do teste de não-inferioridade (PDA, 2013; FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017; UNITED, 2019).

A hipótese de que os dois métodos são equivalentes foi testada usando um critério de aceitação de 70% para o limite de quantificação, exatidão e precisão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as análises estatísticas foram conduzidas através do Software Minitab® v.18 (Minitab Inc., EUA).

5.1 Etapa 1: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum

Para avaliação dos dados, inicialmente foi empregado o teste de normalidade Ryan - Joiner (Similar ao Shapiro Wilk) para determinar se o conjunto de dados obtidos apresentava uma distribuição normal para um intervalo de confiança de 95%.

Os valores de contagem obtidos em UFC não apresentaram distribuição normal (*p* valor inferior a 0,05), em consonância com as informações obtidas na literatura que relata que as contagens microbianas tendem a seguir uma distribuição lognormal quando apresentam elevada ocorrência e uma distribuição de Poisson quando em baixas ocorrências ou quando o conjunto de dados apresenta grande proporção de contagens com valor igual a zero (GONZALES-BARRON *et al*., 2010; APHA, 2017). Deste modo, foi realizada a padronização por meio da transformação logarítmica como opção para a normalização do conjunto de dados.

Após transformação dos dados foi realizado novamente o teste de normalidade Ryan - Joiner (Similar ao Shapiro Wilk), com obtenção de *p* valor superior a 0,05 para todos os micro-organismos e tempos de incubação avaliados, revelando que os dados apresentam distribuição lognormal e que, portanto, poderiam ser submetidos à aplicação de testes estatísticos paramétricos.

Os resultados das recuperações de fluorescência e viabilidade foram calculados com os valores das contagens obtidas nos ensaios realizados conforme o subitem 4.2.1 Etapa 1 - Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum, após transformação logarítmica, com o auxílio das fórmulas descritas no subitem 4.2.1.4 Critérios de aceitação. Os resultados são apresentados nas tabelas 6 e 7.

O tempo mínimo de incubação para detecção por fluorescência foi obtido após 36 horas de incubação para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e após 40 horas para os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* e

Burkholderia cepacia, tempos a partir dos quais foram obtidos valores de recuperação superiores a 90% para as contagens através de fluorescência.

Tabela 6 - Resultados da recuperação de fluorescência através do sistema Milliflex® Quantum

Micro-organismo	Recuperação de fluorescência ± DP (%)					ANOVA
	24h	36h	40h	48h	120h	*p* valor
Pseudomonas aeruginosa	ND	ND	96,3 ± 2,7	97,8 ± 2,4	99,4 ± 2,1	0,42
Burkholderia cepacia	ND	ND	96,6 ± 3,4	101,0 ± 1,3	100,0 ± 0,8	0,30
Escherichia coli	ND	95,2 ± 2,5	99,7 ± 1,9	97,0 ± 4,1	95,1 ± 5,3	0,73
Staphylococcus aureus	ND	90,7 ± 1,1	100,0 ± 2,3	100,1 ± 0,9	98,3 ± 2,6	0,02

ND = não detectado; DP = desvio padrão

Tabela 7 – Resultados da recuperação de viabilidade através do sistema Milliflex® Quantum

Micro-organismo	Recuperação de viabilidade ± DP (%)					ANOVA
	24h*	36h*	40h*	48h*	120h*	*p* valor
Pseudomonas aeruginosa	98,3 ± 1,5	98,8 ± 2,7	96,5 ± 2,8	98,7 ± 2,3	99,9 ± 1,7	0,60
Burkholderia cepacia	97,5 ± 2,7	99,3 ± 2,6	96,9 ± 4,1	101,0 ± 1,0	99,5 ± 1,8	0,46
Escherichia coli	96,7 ± 1,6	98,8 ± 5,2	99,5 ± 0,6	96,6 ± 4,4	96,4 ± 5,1	0,43
Staphylococcus aureus	99,2 ± 2,1	99,9 ± 4,4	101,0 ± 3,4	99,9 ± 2,4	98,6 ± 2,7	0,82

DP = desvio padrão
* referente ao tempo de incubação utilizado para detecção por fluorescência

O teste ANOVA foi utilizado para avaliar a existência de diferenças estatísticas entre os resultados obtidos em cada um dos períodos de incubação propostos pelo método alternativo e pelo método tradicional. As hipóteses consideradas foram:

- H0 : a média das contagens de fluorescência / viabilidade referentes aos tempos de incubação de 36h = 40h = 48h = 120h (Milliflex® Quantum)
- H1: H0 é falso

A obtenção de *p* valor igual ou superior a 0,05 ($p \geq 0,05$) não rejeita a hipótese nula (H0), permitindo assumir que as contagens obtidas nos tempos de incubação avaliados não apresentam diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95%.

Para as contagens obtidas por fluorescência para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* o teste ANOVA indicou resultados superiores a 0,05 para os valores de *p* relacionados a cada micro-organismo, indicando que não havia diferença significativa entre os valores de recuperação dos tempos de incubação avaliados (Tabela 6).

Entretanto, para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* o teste ANOVA calculou um *p* valor igual a 0,02 para as contagens obtidas por fluorescência, indicando que havia diferença significativa entre os valores de recuperação dos tempos de incubação avaliados. Após aplicação dos testes de Tukey e de Fischer foi verificado que o tempo que apresentou diferença estatística foi o de 36 horas.

Para as contagens de viabilidade foram obtidos valores de recuperação superiores a 90% para todos os micro-organismos avaliados inicialmente para as contagens de fluorescência nos tempos de incubação de 24, 36, 40, 48 e 120 horas, com *p* valor superior a 0,05 após aplicação do teste ANOVA. Com estes dados, pode-se concluir que que não houve diferença significativa entre os valores de recuperação de viabilidade para as amostras avaliadas (Tabela 7).

Portanto, o método Milliflex Quantum demonstrou ser robusto no range de 36 a 120 horas de incubação para o micro-organismo *Escherichia coli* e no range de 40 a 120 horas para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (recuperações de fluorescência e viabilidade ≥ 90% e ANOVA *p* valor ≥ 0,05; n = 4).

De forma a contemplar o tempo mínimo de incubação comum a todos os micro-organismos avaliados, foi selecionado o tempo de incubação de 40 horas para a condução da avaliação de desempenho do método alternativo através do sistema Milliflex® Quantum.

5.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho

Conforme realizado na etapa 1 para determinação do tempo mínimo de incubação através do sistema Milliflex® Quantum, para avaliação dos dados, inicialmente foi empregado o teste de normalidade Ryan - Joiner (Similar ao Shapiro Wilk) para determinar se o conjunto de dados obtidos apresentava uma distribuição normal para um intervalo de confiança de 95%.

Os valores de contagem obtidos em UFC não apresentaram distribuição normal (*p* valor inferior a 0,05), em consonância com as informações obtidas na literatura e no subitem 5.1 (GONZALES-BARRON *et al*., 2010; APHA, 2017). Deste modo, foi realizada a padronização por meio da transformação logarítmica como opção para a normalização do conjunto de dados.

Após transformação dos dados foi realizado novamente o teste de normalidade Ryan - Joiner (Similar ao Shapiro Wilk), com obtenção de *p* valor superior à 0,05 para os níveis de concentração de 5, 10, 25, 50 e 100 UFC/placa dos quatro micro-organismos avaliados, revelando que os dados apresentam distribuição lognormal e que, portanto, podem ser submetidos à aplicação de testes estatísticos paramétricos.

As contagens obtidas para as concentrações alvo de 1 UFC/placa e 0,5 UFC/placa, que apresentaram valores iguais ou inferiores a 1 não foram contempladas nas avaliações estatísticas paramétricas uma vez que a transformação logarítmica destes dados resulta em valores iguais a zero ou negativos.

Os resultados de contagem obtidos através do método tradicional foram utilizados como valores esperados para o inóculo padrão, em seus respectivos níveis de concentração.

5.2.1 Exatidão

Para os estudos de exatidão foram utilizados inóculos na faixa de 0,25 a 100 UFC/placa, com 7 réplicas por nível de concentração para cada micro-organismo. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada réplica, concomitantemente para o método alternativo e tradicional.

Para avaliar a exatidão do método alternativo, os resultados das recuperações de fluorescência e viabilidade foram calculados utilizando o logaritmo dos valores das contagens obtidas nos ensaios realizados conforme os subitens 4.2.2.2 Metodologia tradicional e 4.2.2.3 Metodologia alternativa, com o auxílio das fórmulas 1 e 2 descritas no subitem 4.2.1.4 Critérios de aceitação. Os resultados individuais para cada micro-organismo são apresentados nas tabelas 8 a 11.

Tabela 8 - Resultados de exatidão obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=7)

Concentração alvo (UFC)	Média Contagem Fluorescência ± DP (UFC)	Média Contagem Viabilidade ± DP (UFC)	Média Contagem Método tradicional ± DP (UFC)	Média Recuperação Fluorescência ± DP (%)	Média Recuperação Viabilidade ± DP (%)	*p* valor Teste de Levene	*p* valor ANOVA
0,25	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
0,50	0,3 ± 0,4	0,3 ± 0,3	ND	NA	NA	NA	NA
1	0,4 ± 0,4	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,4	NA	NA	NA	NA
5	4,1 ± 0,7	4,1 ± 0,7	4,1 ± 1,3	101,3 ± 24,5	102,5 ± 23,1	0,11	0,97
10	7,9 ± 0,7	8,4 ± 0,9	8,8 ± 1,0	95,4 ± 6,7	98,1 ± 9,4	0,28	0,16
25	20,7 ± 1,3	21,1 ± 1,0	21,5 ± 0,6	98,7 ± 1,6	99,3 ± 1,1	0,28	0,30
50	41,7 ± 2,3	43,0 ± 4,1	43,1 ± 1,7	99,1 ± 1,2	99,9 ± 1,8	0,08	0,52
100	85,5 ± 3,9	86,5 ± 5,8	88,3 ± 3,6	99,3 ± 0,8	99,5 ± 1,1	0,36	0,34

ND = não detectado; DP = desvio padrão; NA = não aplicável

Tabela 9 - Resultados de exatidão obtidos para *Escherichia coli* (n=7)

Concentração alvo (UFC)	Média Contagem Fluorescência ± DP (UFC)	Média Contagem Viabilidade ± DP (UFC)	Média Contagem Método tradicional ± DP (UFC)	Média Recuperação Fluorescência ± DP (%)	Média Recuperação Viabilidade ± DP (%)	*p* valor Teste de Levene	*p* valor ANOVA
0,25	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
0,50	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
1	0,6 ± 0,4	0,8 ± 0,3	0,6 ± 0,4	NA	NA	NA	NA
5	4,0 ± 0,4	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,5	97,6 ± 7,4	98,9 ± 10,0	0,93	0,90
10	7,4 ± 1,0	7,8 ± 0,7	7,3 ± 0,7	100,8 ± 9,1	103,4 ± 8,7	0,87	0,52
25	18,1 ± 0,7	18,6 ± 0,5	18,1 ± 0,9	100,0 ± 1,6	100,8 ± 1,6	0,07	0,64
50	38,7 ± 1,0	38,9 ± 1,1	37,9 ± 1,3	100,6 ± 0,9	100,7 ± 1,0	0,54	0,37
100	72,9 ± 1,3	73,4 ± 1,1	73,6 ± 0,9	99,8 ± 0,3	99,9 ± 0,2	0,85	0,54

ND = não detectado; DP = desvio padrão; NA = não aplicável

Tabela 10 - Resultados de exatidão obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=7)

Concentração alvo (UFC)	Média Contagem Fluorescência ± DP (UFC)	Média Contagem Viabilidade ± DP (UFC)	Média Contagem Método tradicional ± DP (UFC)	Média Recuperação Fluorescência ± DP (%)	Média Recuperação Viabilidade ± DP (%)	*p* valor Teste de Levene	*p* valor ANOVA
0,25	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
0,50	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
1	0,5 ± 0,4	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,3	NA	NA	NA	NA
5	4,1 ± 0,4	4,4 ± 0,7	3,9 ± 0,3	102,5 ± 9,3	107,0 ± 12,4	0,41	0,33
10	7,5 ± 0,4	7,9 ± 0,4	7,8 ± 0,6	98,2 ± 2,2	100,5 ± 4,7	0,49	0,49
25	19,6 ± 1,1	21,0 ± 1,8	20,6 ± 2,0	98,3 ± 3,5	100,6 ± 2,7	0,52	0,15
50	37,7 ± 0,6	38,9 ± 1,5	38,1 ± 1,3	99,7 ± 1,3	100,5 ± 1,0	0,25	0,19
100	82,8 ± 1,6	83,0 ± 1,4	84,0 ± 1,1	99,7 ± 0,5	99,7 ± 0,3	0,49	0,17

ND = não detectado; DP = desvio padrão; NA = não aplicável

Tabela 11 - Resultados de exatidão obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=7)

Concentração alvo (UFC)	Média Contagem Fluorescência ± DP (UFC)	Média Contagem Viabilidade ± DP (UFC)	Média Contagem Método tradicional ± DP (UFC)	Média Recuperação Fluorescência ± DP (%)	Média Recuperação Viabilidade ± DP (%)	*p* valor Teste de Levene	*p* valor ANOVA
0,25	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
0,50	ND	ND	ND	NA	NA	NA	NA
1	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,7	NA	NA	NA	NA
5	5,6 ± 0,4	5,6 ± 0,3	5,2 ± 0,8	104,8 ± 6,3	104,1 ± 7,2	0,90	0,32
10	10,2 ± 1,1	10,3 ± 1,0	10,0 ± 1,7	101,2 ± 5,3	101,6 ± 4,4	0,08	0,92
25	26,1 ± 0,8	26,3 ± 0,6	25,4 ± 1,9	100,9 ± 1,9	101,2 ± 1,8	0,25	0,25
50	53,2 ± 0,8	53,4 ± 1,0	54,2 ± 3,1	99,6 ± 0,9	99,6 ± 1,0	0,19	0,54
100	116,3 ± 3,7	115,5 ± 6,1	113,4 ± 6,8	100,6 ± 0,8	100,6 ± 0,9	0,76	0,83

ND = não detectado; DP = desvio padrão; NA = não aplicável

Conforme observado nas tabelas 8 a 11, os valores de recuperação de fluorescência e viabilidade foram superiores a 90% para os níveis de concentração entre 5 e 100 UFC/placa para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* com valor de desvio padrão máximo de 24,5% para a recuperação de fluorescência com o inóculo de 5 UFC/placa para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*.

Não foi obtido crescimento microbiano para os inóculos com concentração alvo de 0,25 e 0,5 UFC/placa através dos métodos alternativo e tradicional para os micro-organismos *Burkholderia cepacia, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.*

Para os inóculos com concentração alvo de 1 UFC/placa de todos os micro-organismos avaliados bem como para o inóculo com concentração alvo de 0,5 UFC/placa de *Staphylococcus aureus*, não foi obtido crescimento microbiano em todas as réplicas ensaiadas pelos métodos alternativo e tradicional.

Desta forma, como algumas réplicas apresentaram o valor médio de contagem igual a um ou zero, após transformação logarítmica destes dados resultam emvalores iguais a zero, impossibilitando o cálculo do valor médio de recuperação de fluorescência e de viabilidade para o método alternativo para os inóculos com concentração alvo de 0,5 UFC/placa e 1 UFC/placa, motivo pelo qual os respectivos campos nas tabelas 8 a 11 são apresentados como não aplicável (NA).

Foi realizada, adicionalmente, a aplicação do teste de Levene para avaliação da homogeneidade de variância por faixa de concentração para cada micro-organismo, para o intervalo de confiança de 95%. Foram obtidos resultados de *p*-valor

superiores a 0,05 para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, indicando que os erros apresentam variância homogênea, um pressuposto para a aplicação do teste ANOVA (Tabelas 8 a 11).

Em seguida, foi empregado o teste ANOVA com um fator, para o intervalo de confiança de 95%, com o objetivo de determinar se o logaritmo das contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo após 40 horas e 120 horas de incubação, respectivamente, não era estatisticamente diferente do logaritmo das contagens obtidas pelo método tradicional após 120 horas de incubação.

As hipóteses consideradas foram:

- H0 : o logaritmo das contagens médias por fluorescência obtidas pelo método alternativo após 40h de incubação = o logaritmo das contagens médias de viabilidade obtidas pelo método alternativo após 120h de incubação = o logaritmo das contagens médias visuais obtidas pelo método tradicional após 120 horas de incubação
- H1: H0 é falso

A tomada de decisão para um teste de hipótese é baseada no valor de probabilidade (valor *p*) para o teste. Se o valor *p* for menor ou igual ao nível de significância predeterminado, a hipótese nula é rejeitada. Entretanto, se o valor *p* for maior que o nível alfa, a hipótese nula não é rejeitada. O nível alpha é definido como o risco definido de estar errado em tomar a decisão. Quanto menor o valor, menos provável a hipótese nula (H0) seja incorretamente rejeitada.

A obtenção de *p* valor igual ou superior a 0,05 ($p \geq 0,05$) não rejeita a hipótese nula (H0), permitindo assumir que o logaritmo das contagens obtidas pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional não apresentam diferenças estatísticas para um intervalo de confiança de 95%.

O teste ANOVA com um fator indicou resultados superiores a 0,05 para osvalores de *p* relacionados a cada nível de concentração de cada micro-organismo, indicando que não há diferença estatística entre o logaritmo das contagens porfluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo bem como pelo método tradicional (Tabelas 8 a 11) para a faixa de 5 a 100 UFC/placa dos micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Portanto, é possível concluir que a metodologia alternativa é exata para a faixa de 5 a 100 UFC/placa para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa.*

5.2.2. Precisão

Para os estudos de precisão foram utilizados inóculos na faixa de 5 a 100 UFC/placa, com 7 réplicas por nível de concentração para cada micro-organismo. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada réplica, concomitantemente para o método alternativo e tradicional. Os resultados encontram-se descritos nas tabelas 12 a 15.

Foram calculados os coeficientes de variação (CV) para o logaritmo das contagens por fluorescência, viabilidade e para o logaritmo das contagens obtidas pelo método tradicional para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa,* em cada nível deconcentração.

De acordo com *Parenteral Drug Association* (2013), são aceitos coeficientes de variação inferiores a 35% para métodos tradicionais de contagem em placa para contagens superiores a 10 UFC/placa. O atendimento a este critério pelo método alternativo isenta a necessidade comparação entre o coeficiente de variação do método alternativo com o coeficiente de variação do método tradicional (PDA, 2013). A Farmacopeia Brasileira (2016) estabelece que valores inferiores a 30% para o coeficiente de variação demonstram uma precisão aceitável para os métodos.

Desta forma, conforme demonstrado nas tabelas 12 a 15, todos os valores encontram-se em conformidade com os critérios de aceitação normativos. Conforme esperado, os maiores valores de coeficiente de variação foram obtidos para as contagens realizadas com os inóculos com concentração alvo de 5 UFC/placa, para os quatro micro-organismos avaliados.

Portanto, como os valores de coeficiente de variação calculados se encontram abaixo de 30%, o critério mais restritivo, para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, é possível concluir que a metodologia de avaliação é precisa para os micro- organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa.*

Tabela 12 - Resultados de precisão obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=7)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
5	19,8	21,1	28,7
10	5,1	6,8	6,6
25	2,6	2,2	1,5
50	2,1	2,8	1,6
100	1,1	1,6	1,2

Tabela 13 - Resultados de precisão obtidos para *Escherichia coli* (n=7)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
5	14,7	13,4	14,8
10	8,5	7,3	8,8
25	2,7	2,0	3,6
50	1,2	1,3	1,6
100	0,6	0,5	0,6

Tabela 14 - Resultados de precisão obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=7)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
5	11,2	13,7	11,8
10	6,3	4,7	5,8
25	2,9	3,1	3,5
50	0,8	1,3	1,3
100	0,5	0,5	0,4

Tabela 15 - Resultados de precisão obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=7)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
5	8,9	8,2	9,2
10	5,3	4,7	7,4
25	1,9	1,3	2,3
50	1,0	0,9	1,4
100	1,0	1,0	1,3

5.2.2.1 Precisão intermediária

Para os estudos de precisão intermediária foram utilizados inóculos na faixa de 10 a 100 UFC/placa para a realização de ensaios em triplicata pelos analistas A e B

em dias distintos. Foram ensaiadas três réplicas, por nível de concentração para cada micro-organismo, por cada analista. Os ensaios foram conduzidos em duplicatapara cada réplica, concomitantemente para o método alternativo e tradicional.

Foram avaliados os coeficientes de variação calculados com o logaritmo das contagens por fluorescência, viabilidade e pelo método tradicional para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa,* em cada nível de concentração. Todos os valores obtidos encontram-se em conformidade com o critério de aceitação definido no subitem 4.2.2.4.2.1 (CV < 30%). Os resultados encontram-se descritos nas tabelas 16 a 19.

Tabela 16 - Coeficientes de variação obtidos para *Staphylococcus aureus* (n=6)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	**Viabilidade**	**Método tradicional**
10	4,3	3,8	4,3
25	2,2	1,2	0,9
50	1,6	2,6	1,1
100	1,1	1,6	1,0

Tabela 17 - Coeficientes de variação obtidos para *Escherichia coli* (n=6)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	**Viabilidade**	**Método tradicional**
10	6,2	4,5	5,4
25	1,6	1,0	1,6
50	0,8	0,9	0,8
100	0,4	0,4	0,3

Tabela 18 - Coeficientes de variação obtidos para *Burkholderia cepacia* (n=6)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	**Viabilidade**	**Método tradicional**
10	3,4	1,6	3,9
25	1,9	2,7	2,2
50	0,4	0,9	1,0
100	0,2	0,3	0,3

Tabela 19 - Coeficientes de variação obtidos para *Pseudomonas aeruginosa* (n=6)

Concentração alvo	Coeficiente de variação (%)		
	Fluorescência	Viabilidade	Método tradicional
10	3,8	4,4	5,7
25	1,0	1,6	1,5
50	0,4	0,5	0,8
100	0,8	0,8	1,1

Para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* os maiores valores de coeficiente de variação foram obtidos para o logaritmo das contagens referentes ao inóculo de 10 UFC/mL (Tabelas 16, 17 e 19), com exceção do coeficiente de variação calculado com as contagens de viabilidade para o inóculo de 25 UFC/placa de *Burkholderia cepacia*, o qual apresentou um valor superior ao de 10 UFC/placa (Tabela 18).

Com o objetivo de avaliar se a variabilidade das medições poderia ser explicada pela diferença de analistas, foi realizado o estudo de medição de repetibilidade e reprodutibilidade (R&R). Para a condução do teste foram utilizados os valores logarítmicos das contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo bem como das contagens visuais obtidas pelo método tradicional, pelos analistas A e B. Os resultados são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Resultados do estudo R&R para precisão intermediária com os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=6)

Micro-organismo	*p* valor Teste de Levene	*p* valor ANOVA	Variação do estudo (%)	Número de categorias distintas
Staphylococcus aureus	0,99	0,55	7,4	19
Escherichia coli	0,99	0,05	3,7	38
Burkholderia cepacia	0,96	0,57	5,5	25
Pseudomonas aeruginosa	0,97	0,07	6,0	23

A avaliação da homogeneidade das variâncias por meio do teste de Levene entre os grupos de contagem de fluorescência, viabilidade e método tradicional para cada micro-organismo, com intervalo de confiança de 95%, demonstrou que os dados apresentam homogeneidade de variâncias (*p* valor superior a 0,05), um pressuposto para a aplicação do teste ANOVA, contemplado no estudo R&R.

As tabelas ANOVA dos estudos R&R indicaram resultados iguais ou superiores a 0,05 para os valores de *p* relacionados a cada micro-organismo, indicando que a

interação entre dia e analista não foi significativa ao nível de significância de 5% para as contagens obtidas pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional (Tabela 20).

Conforme apresentado na tabela 20, as tabelas de avaliação das medições dos estudos R&R para os quatro micro-organismos empregados apresentaram valores compreendidos entre 3,7 e 7,4% para a porcentagem de variação do estudo e valor mínimo de 19 para o número de categorias distintas (*Staphylococcus aureus*), ambos parâmetros em conformidade com os critérios de aceitação definidos no subitem 4.2.2.4.2.1 (porcentagem de variação do estudo <30% e número de categorias distintas superiores a 5).

A amplitude amostral obtida pelos analistas A e B para cada micro-organismo avaliado, por nível de concentração e metodologia empregada, é demonstrada pelas cartas de controle R, através das figuras 8 a 11.

Figura 8 - Estudo de R&R: Carta R - *Staphylococcus aureus*

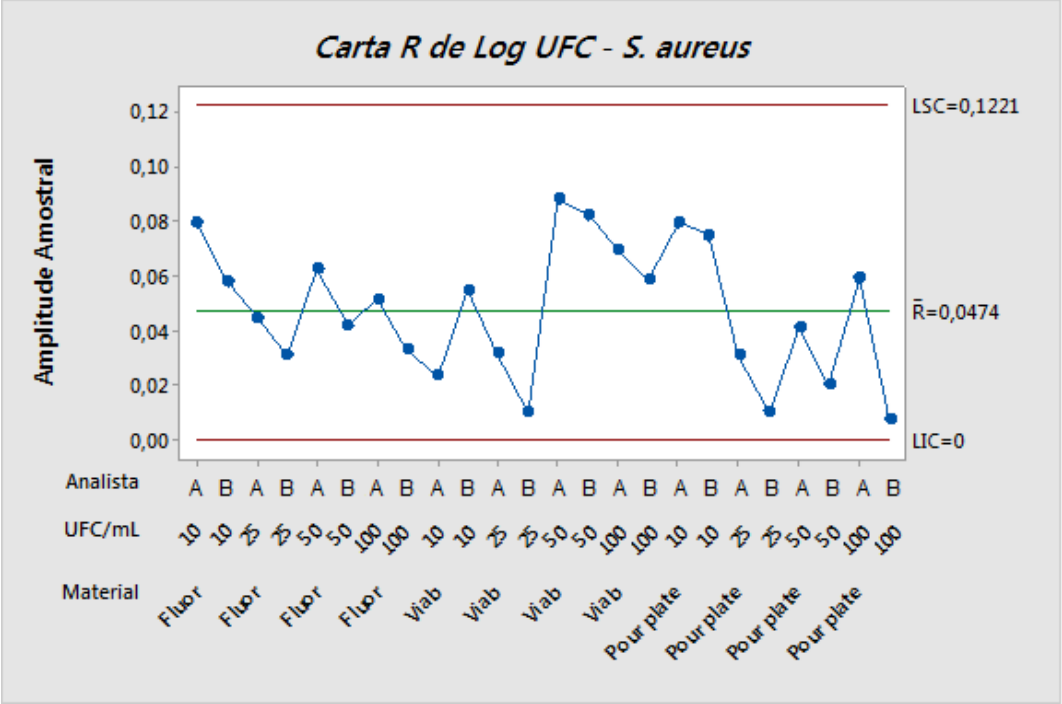


Figura 9 - Estudo de R&R: Carta R - *Burkholderia cepacia*

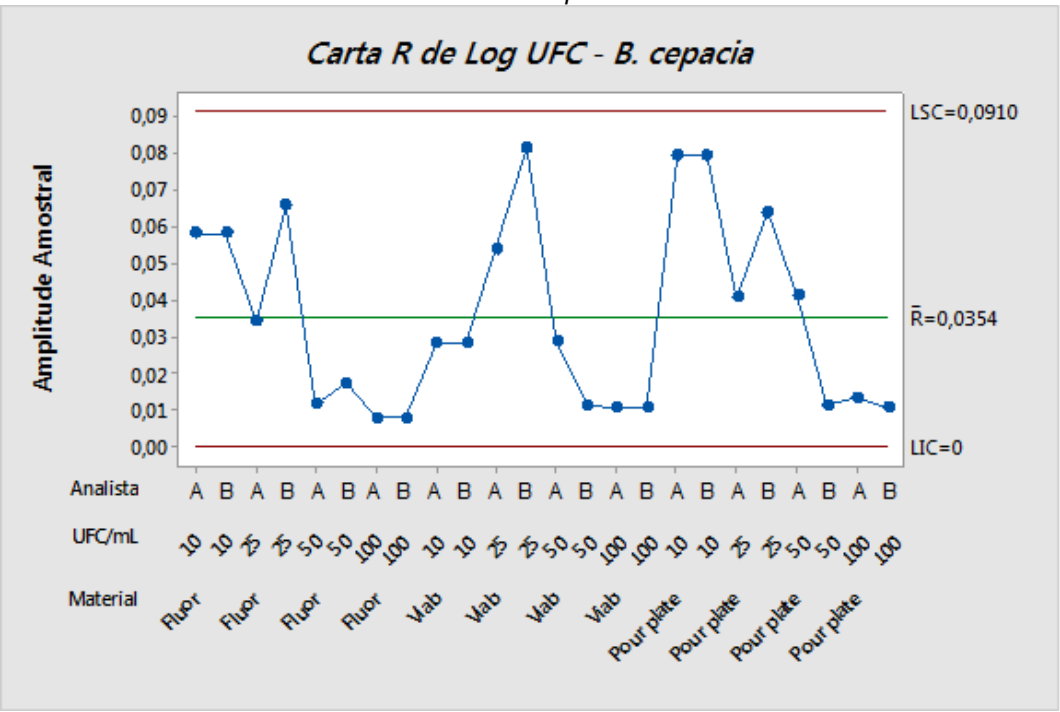


Figura 10 - Estudo de R&R: Carta R - *Escherichia coli*

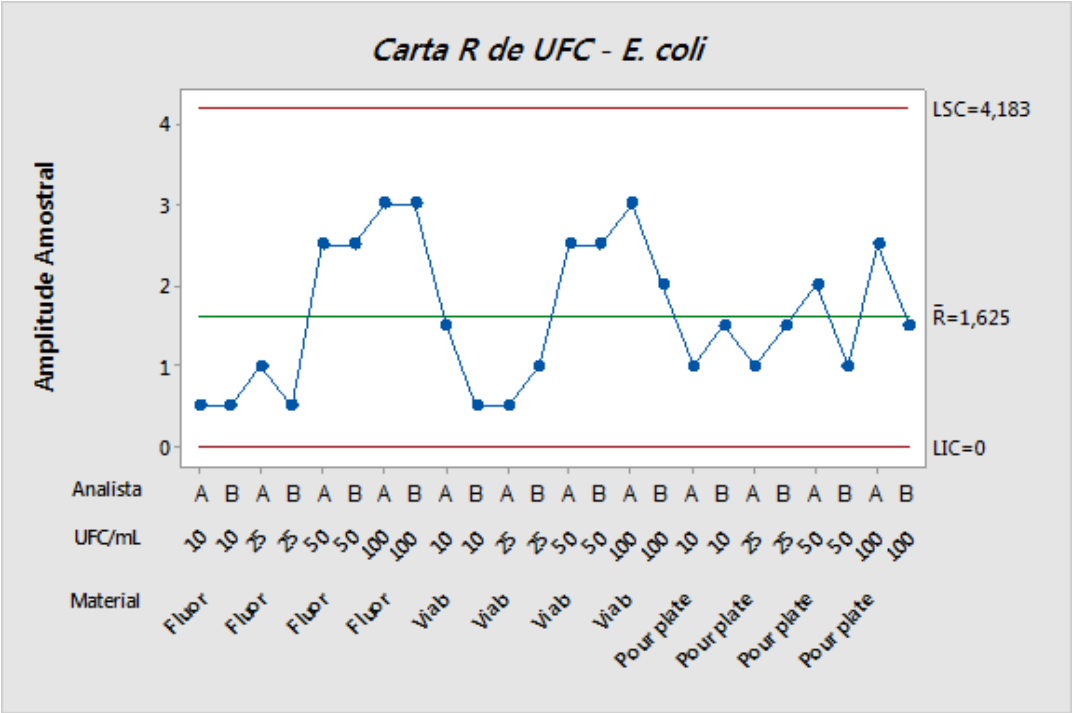
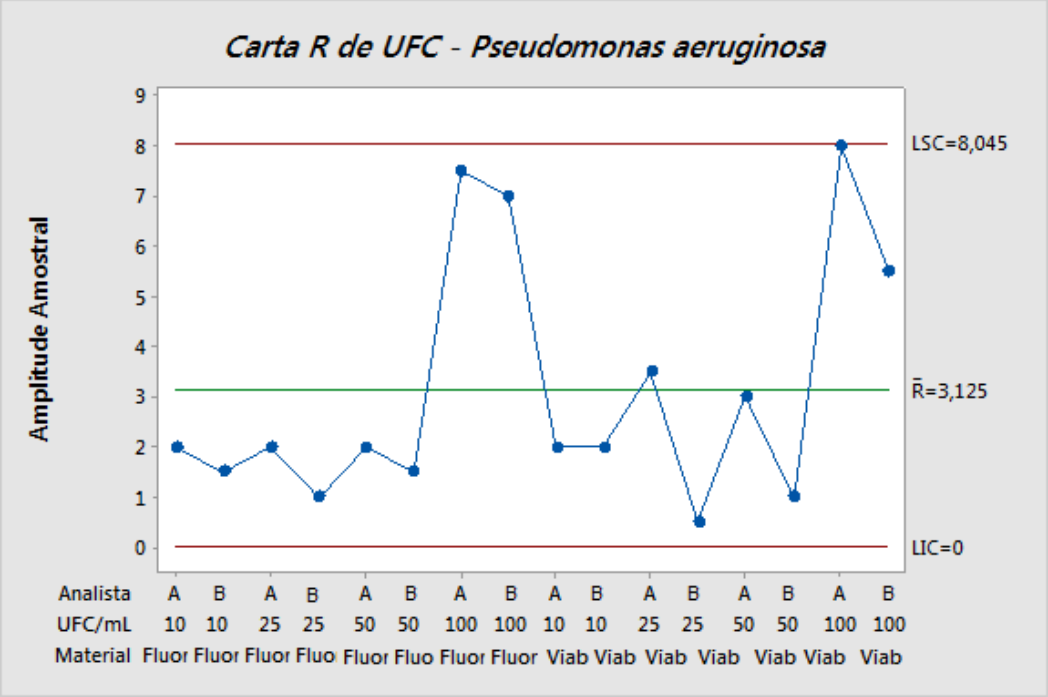


Figura 11 - Estudo de R&R: Carta R - *Pseudomonas aeruginosa*



Como pode ser observado nas figuras 8 a 11, todos os pontos encontram-se dentro dos limites da carta de controle das amplitudes, demonstrando que as medições entre analistas são consistentes.

Portanto, com base nos resultados obtidos em todos os testes estatísticos apresentados, é possível concluir que os efeitos dos fatores dia e analista não foram significativos para o estudo com os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa.*

5.2.3 Linearidade

Para os estudos de linearidade foram utilizados inóculos em cinco níveis de concentração, compreendidos na faixa de 5 a 100 UFC/placa. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada uma das 7 réplicas, por nível de concentração para cada micro-organismo, concomitantemente para o método alternativo e tradicional.

A escolha do range foi baseada nos dados apresentados nos subitens 5.2.1 Exatidão e 5.2.2 Precisão, onde foi demonstrada a exatidão e precisão do método alternativo para a faixa de 5 a 100 UFC/placa.

Para o estudo de linearidade com os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa*, o teste de

correlação de Pearson indicou forte correlação (valores superiores a 0,95) entre as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente às contagens obtidas pelo método tradicional. A obtenção de *p*-valor inferior a 0,05 para ambas correlações permite rejeitar a hipótese de que o coeficiente de correlação é igual a zero, indicando que existe uma relação significativa entre as variáveis testadas.

Para as análises de regressão linear individuais para cada micro-organismo avaliado foi utilizada a média dos logaritmos das contagens obtidas pelas 7 réplicas por nível de concentração pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional. Para as análises de regressão linear contemplando o conjunto dos dados dos quatro micro-organismos avaliados, foi utilizada a média doslogaritmos das contagens obtidas pelas 7 réplicas por nível de concentração pelo método alternativo (fluorescência e viabilidade) e pelo método tradicional de cada micro-organismo.

A análise de regressão demonstrou correlação linear entre as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente as contagens obtidas pelo método tradicional para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, para os micro- organismos *Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa,* como pode ser observado nas figuras 12 a 21.

Figura 12 - Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus*: Fluorescência X Método Tradicional

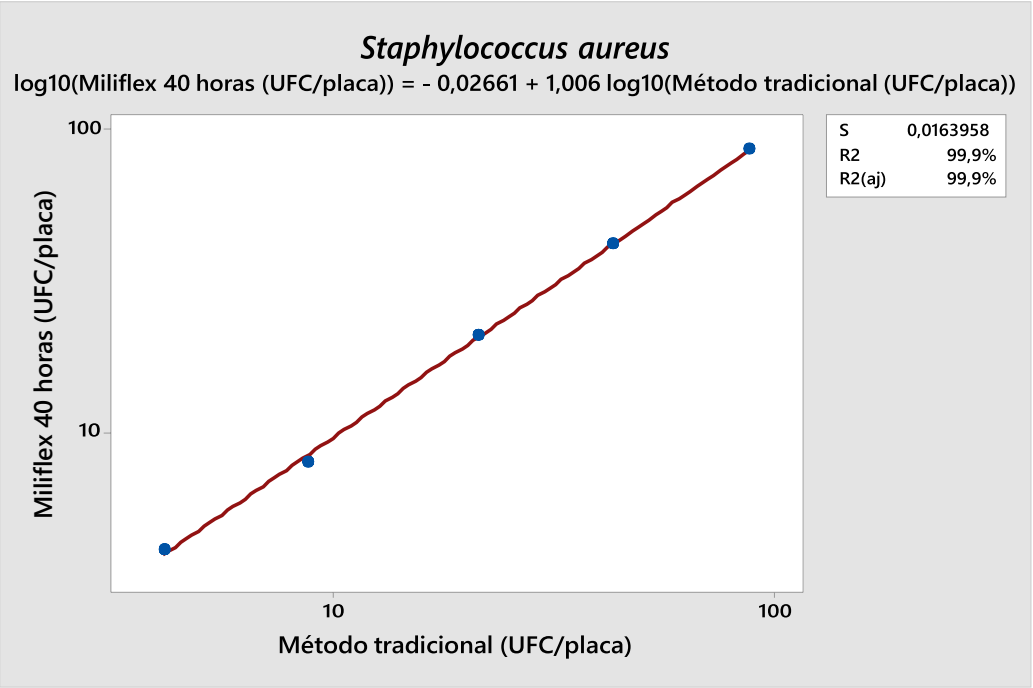


Figura 13 - Análise de regressão linear para *Staphylococcus aureus:* Viabilidade X Método Tradicional

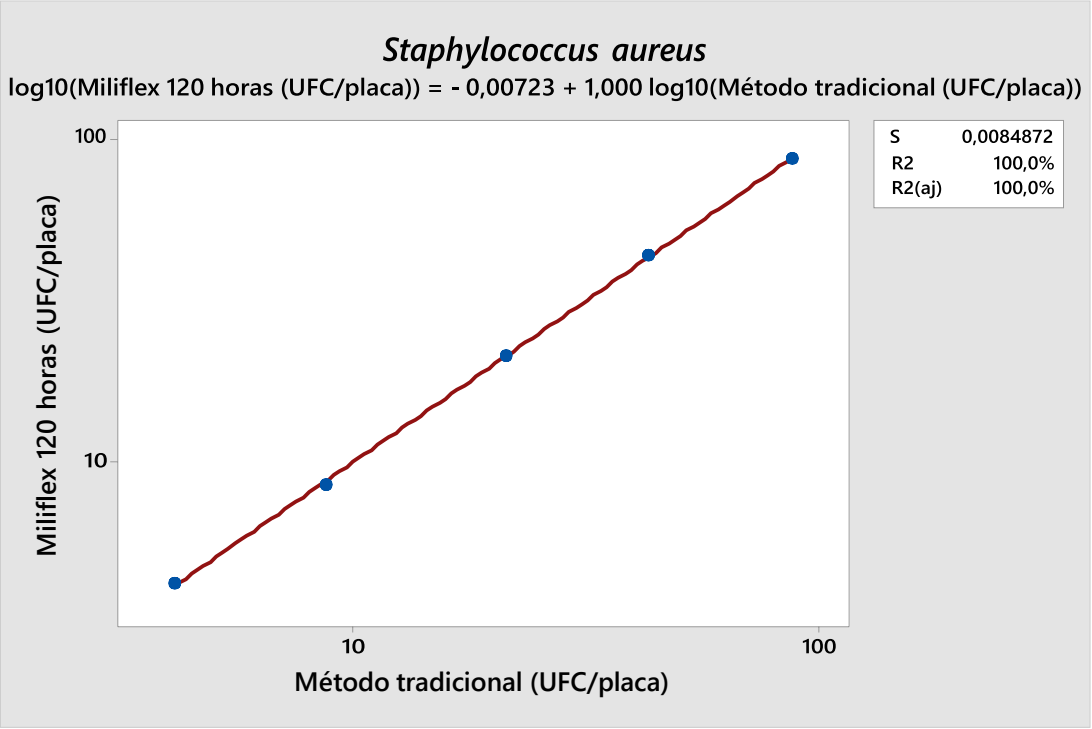


Figura 14 - Análise de regressão linear para *Burkholderia cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional

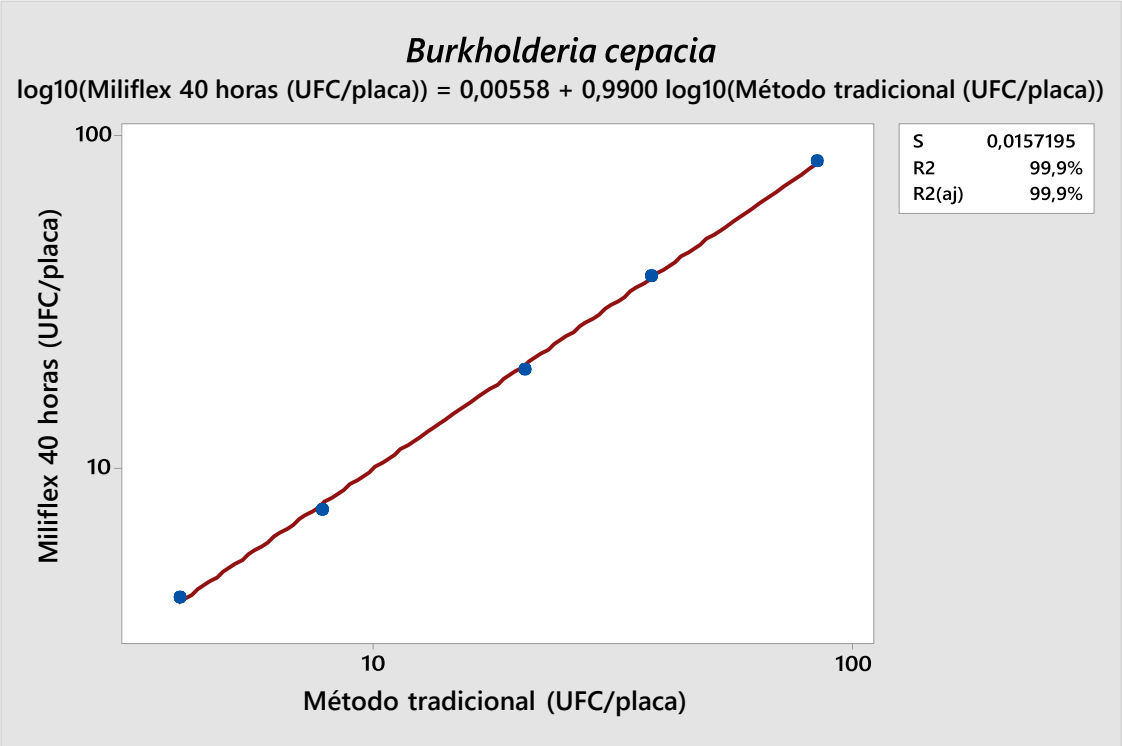


Figura 15 - Análise de regressão linear para *Burkholderia cepacia:* Viabilidade X Método Tradicional

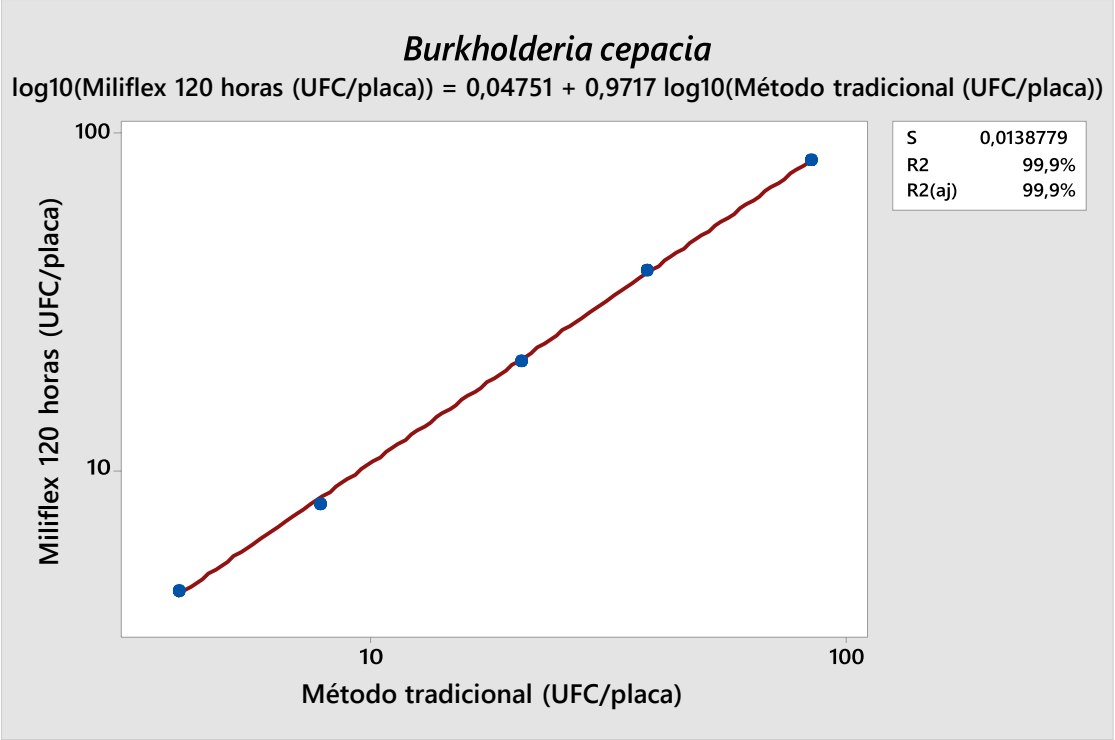


Figura 16 - Análise de regressão linear para *Escherichia coli*: Fluorescência X Método Tradicional

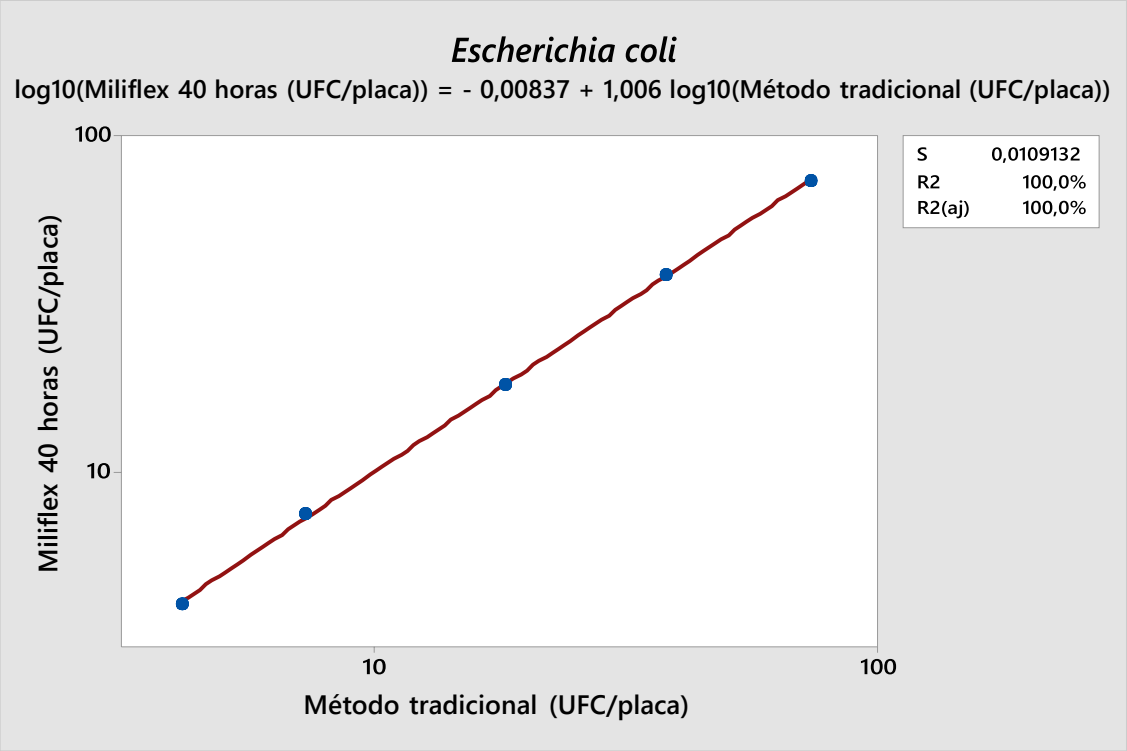


Figura 17 - Análise de regressão linear para *Escherichia coli:* Viabilidade X Método Tradicional

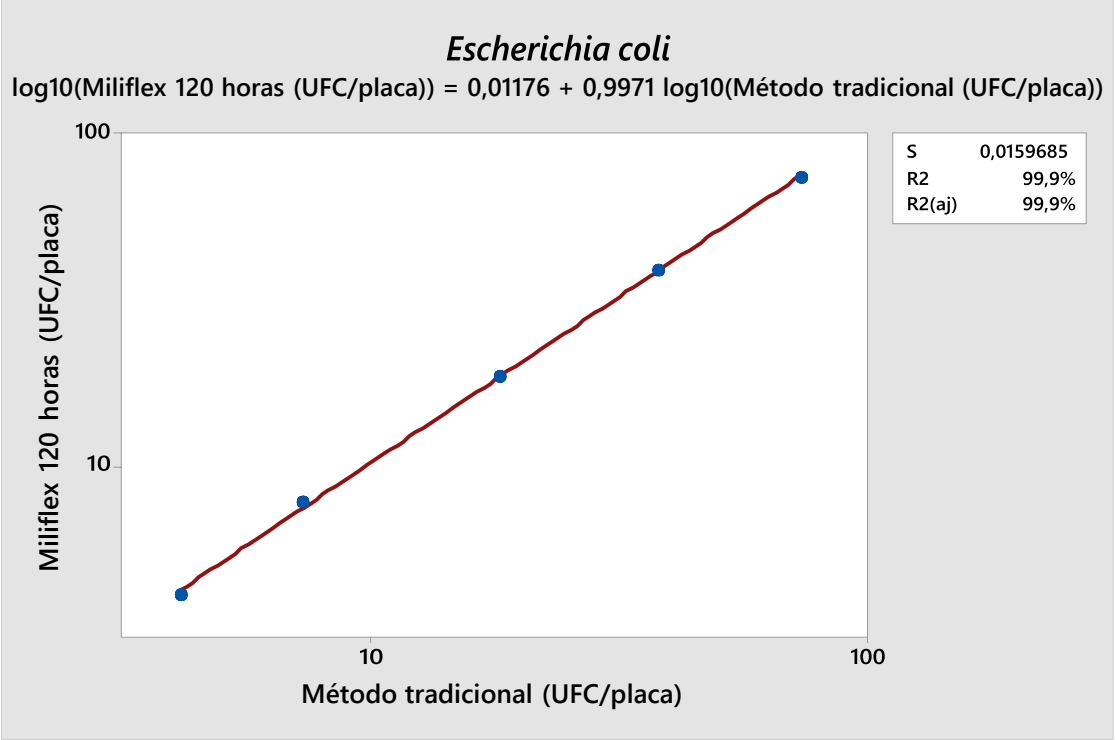


Figura 18 - Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa*: Fluorescência X Método Tradicional

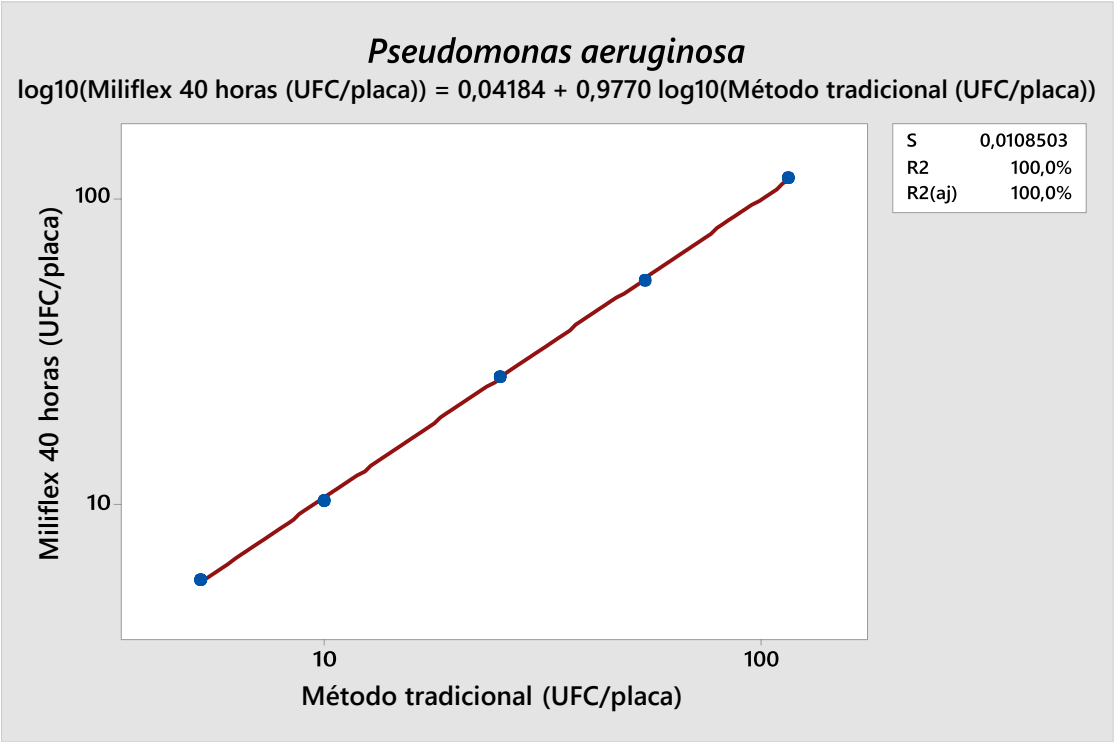


Figura 19 - Análise de regressão linear para *Pseudomonas aeruginosa:* Viabilidade X Método Tradicional

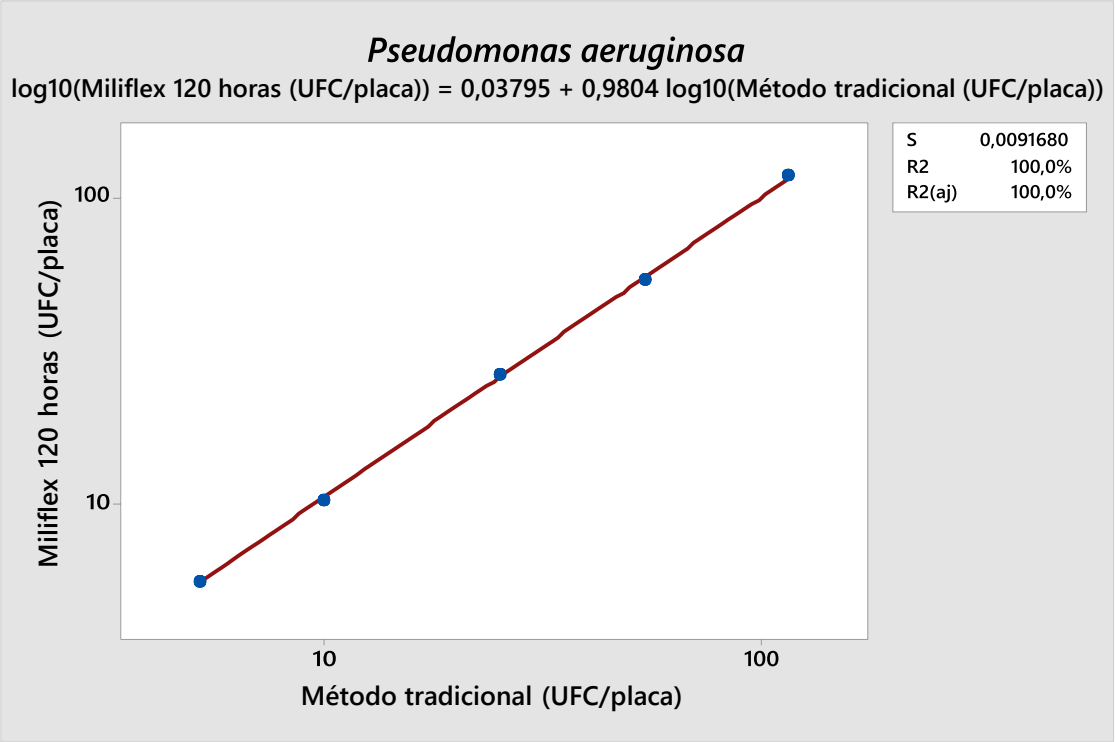


Figura 20 - Análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional

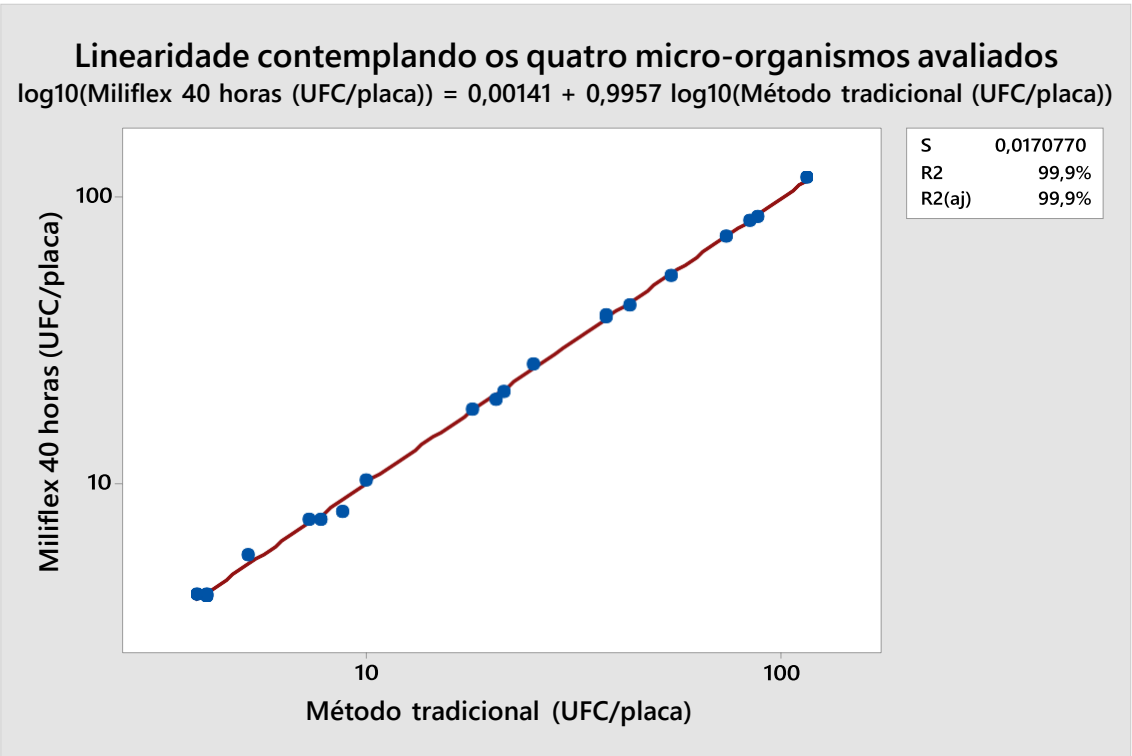
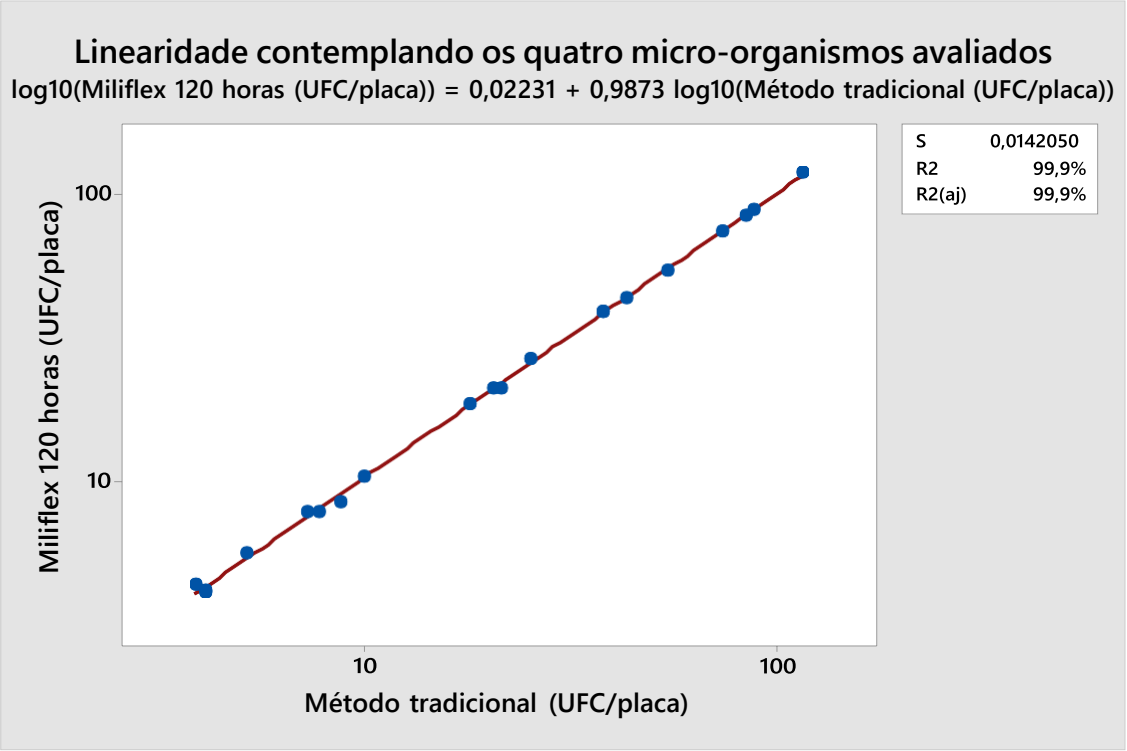


Figura 21 - Análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Viabilidade X Método Tradicional



Os gráficos de resíduos obtidos nas análises de regressão linear individuais para cada micro-organismo bem como nas que contemplaram o conjunto de dados dos quatro micro-organismos alvo (Figuras 22 e 23), foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos padronizados, à variância e à independência dos resíduos.

A presunção de normalidade da distribuição dos resíduos foi confirmada pela obtenção de *p*-valor superior a 0,05 para a faixa entre 5 UFC/placa e 100 UFC/placa, para cada micro-organismo, através do teste de normalidade e do gráfico de probabilidade normal dos resíduos. Com estes valores, a hipótese alternativa pode ser rejeitada, permitindo assumir que a distribuição dos resíduos é normal (Tabela 21).

O gráfico de resíduos versus ajustes permitiu verificar a pressuposição de que os resíduos são aleatoriamente distribuídos e apresentam variância constante. Esta hipótese foi confirmada após aplicação do teste Levene para avaliação da igualdade de variâncias, por faixa de concentração, no qual foram obtidos resultados de *p*-valor superiores a 0,05 para a faixa de 5 a 100 UFC/placa. Com estes valores, a hipótese alternativa pode ser rejeitada, permitindo assumir que os erros resíduos são homocedásticos.

A independência dos resíduos foi observada através do gráfico de resíduos versus ordem gerado pelo software Minitab.

Tabela 21 - Resultados da análise de regressão para as contagens de fluorescência e viabilidade obtidas pelo método alternativo frente as contagens obtidas pelo método tradicional para a faixa de 5 a 100 UFC/placa, para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=7)

	Micro-organismo	Coeficiente de correlação (R^2)	Coeficiente angular	*p*-valor Teste de normalidade dos resíduos
Fluorescência	*S. aureus*	1,00	1,01	0,15
	E. coli	1,00	1,01	0,61
	B. cepacia	1,00	0,99	0,44
	P. aeruginosa	1,00	0,98	0,18
Viabilidade	*S. aureus*	1,00	1,00	0,62
	E. coli	1,00	1,00	0,79
	B. cepacia	1,00	0,97	0,72
	P. aeruginosa	1,00	0,98	0,26

Figura 22 - Gráficos de resíduos da análise de regressão linear contemplando *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Fluorescência X Método Tradicional

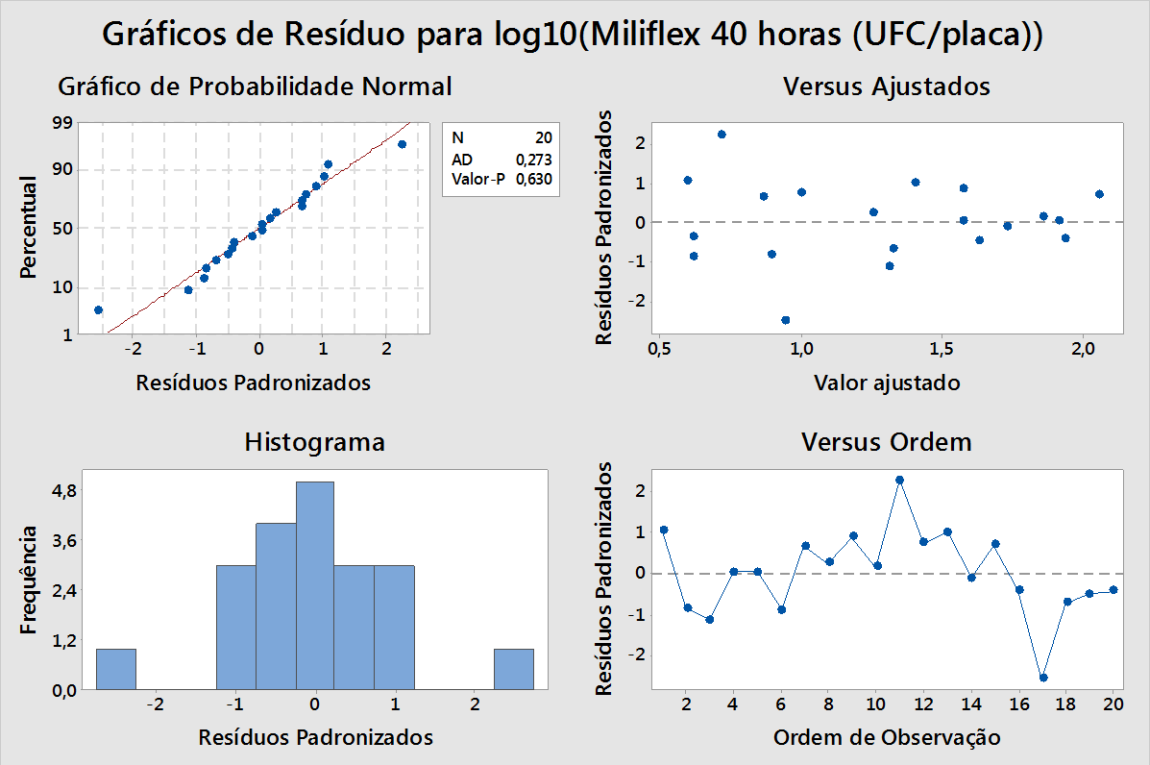
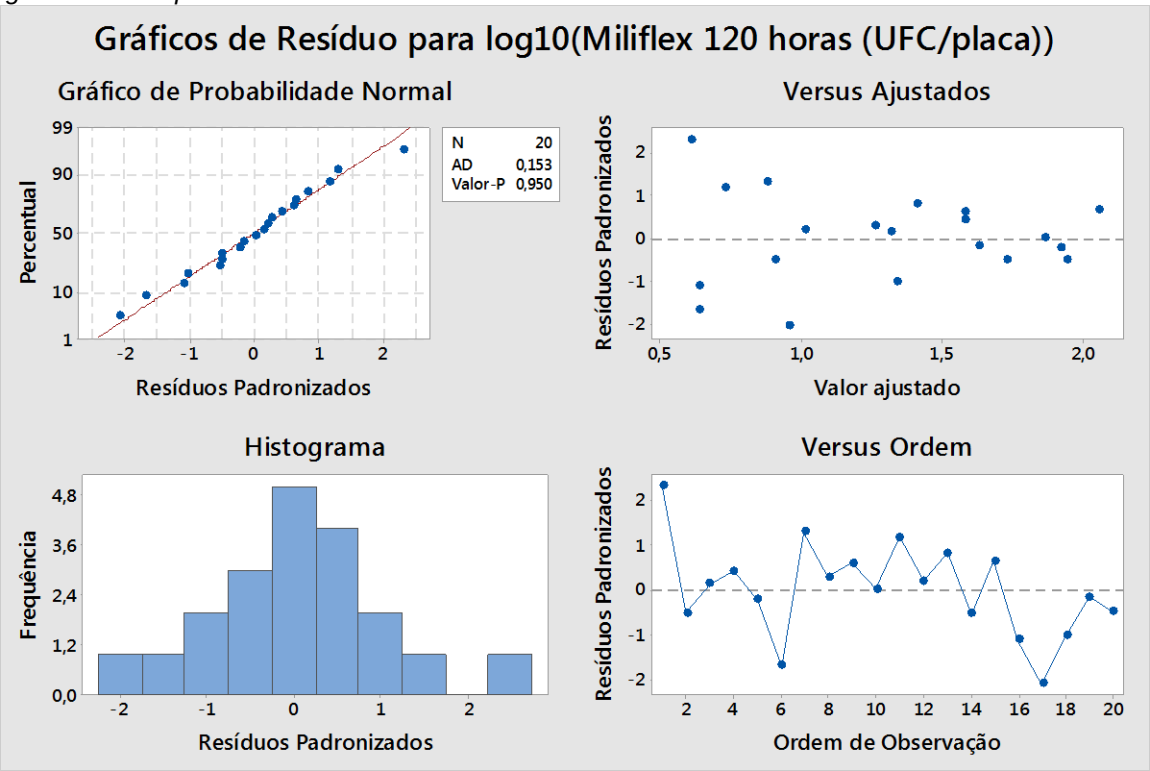


Figura 23 - Gráficos de resíduos da análise de regressão linear *contemplando S. aureus, E. coli, P. aeruginosa* e *B. cepacia*: Viabilidade X Método Tradicional



Portanto, ao realizar a análise de regressão linear dos dados obtidos no range de 5 a 100 UFC/placa para os quatro micro-organismos desafiados, foi possível avaliar a existência de correlação entre as contagens de fluorescência (método alternativo) e as contagens visuais (método tradicional), bem como entre as contagens de viabilidade (método alternativo) e as contagens visuais (método tradicional).

A partir destes resultados é possível concluir que a metodologia alternativa se apresentou linear e específica para a enumeração de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia e Pseudomonas aeruginosa,* uma vez que foi possível a detecção positiva de todos os micro-organismos alvo bem como foram obtidos coeficientes de correlação maiores que 0,95 e retas com inclinação entre 0,8-1,2, atendendo aos critérios estabelecidos no subitem 4.2.2.4.3.

5.2.4 Especificidade

A especificidade do método alternativo pode ser evidenciada pela detecção positiva das bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas

(*Escherichia coli, Burkholderia cepacia e Pseudomonas aeruginosa*) desafiadas nos ensaios de precisão, exatidão e linearidade para o range de 5 a 100 UFC/placa.

5.2.5 Limite de detecção

Para os estudos de limite de detecção foram utilizados inóculos em cinco níveis de concentração, compreendidos na faixa de 0,25 a 10 UFC/placa. Os ensaios foram conduzidos em duplicata para cada uma das 7 réplicas, por nível de concentração para cada micro-organismo, concomitantemente para o método alternativo e tradicional.

Não foi observado crescimento microbiano nas placas inoculadas com suspensões bacterianas com concentração alvo de 0,25 e 0,5 UFC/placa através dos métodos alternativo e tradicional para os micro-organismos *Burkholderia cepacia, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.*

Para os micro-organismos *Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* foi possível observar crescimento microbiano em pelo menos 50% das placas inoculadas com suspensão na concentração alvo de 1 UFC/placa através dos métodos alternativo e tradicional. Entretanto, para o micro-organismo *Staphylococcus aureus*, apesar da observação de crescimento microbiano em algumas placas inoculadas com suspensões nas concentrações de 0,5 UFC/placa e1 UFC/placa, apenas foi possível observar crescimento microbiano em pelo menos 50% das placas inoculadas através dos métodos alternativo e tradicional, a partir da suspensão com concentração alvo de 5 UFC/placa.

Portanto, para o parâmetro limite de detecção, a faixa de concentração em que foi observado crescimento microbiano em 50% das amostras pelo método tradicional para todos os micro-organismos desafiados foi a de 5 UFC/placa, com detecção positiva em todas as réplicas. O mesmo comportamento foi verificado no método alternativo para as contagens de fluorescência e viabilidade. Para esta faixa, o teste T de *Student* não identificou diferenças estatísticas entre as contagens por fluorescência (método alternativo) versus contagens visuais pelo método tradicional bem como entre as contagens de viabilidade (método alternativo) versus contagens visuais pelo método tradicional (*p* valor superior a 0,05), para os quatro micro-organismos avaliados, conforme apresentado na tabela 22.

Tabela 22 - Resultados do estudo de limite de detecção obtidos para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* (n=7)

Micro-organismo	Média Contagem Fluorescência ± DP (UFC)	Recuperação Fluorescência ± DP (%)	*p* valor Teste T de *Student pareado*[1]	Média Contagem Viabilidade ± DP (UFC)	Recuperação Viabilidade ± DP (%)	*p* valor Teste T de *Student pareado*[2]	*p* valor Teste T de *Student pareado*[3]
S. aureus	4,1 ± 0,7	101,3 ± 24,5	0,87	4,1 ± 0,7	102,5 ± 23,1	0,74	0,62
E. coli	4,0 ± 0,4	97,6 ± 7,4	0,57	4,1 ± 0,3	98,9 ± 10,0	0,79	0,57
B cepacia	4,1 ± 0,4	102,5 ± 9,3	0,49	4,4 ± 0,7	107,0 ± 12,4	0,17	0,11
P. aeruginosa	5,6 ± 0,4	104,8 ± 6,3	0,16	5,6 ± 0,3	104,1 ± 7,2	0,24	0,74

DP = desvio padrão
[1]Contagens Fluorescência X Contagens método tradicional;
[2]Contagens Viabilidade X Contagens método tradicional;
[3] Contagens Fluorescência X Contagens Viabilidade

5.2.6 Limite de quantificação

Para o parâmetro limite de quantificação, a menor concentração testada que atendeu aos critérios de precisão e exatidão para todos os micro-organismos avaliados para o método alternativo foi a de 5 UFC/placa.

Portanto, foi estabelecido o limite de quantificação de 5 UFC/placa para o método alternativo.

5.2.7 Intervalo

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios para avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão e linearidade frente aos quatro micro-organismos avaliados, foi estabelecido o intervalo de 5 a 100 UFC/placa para o método alternativo.

5.2.8 Robustez

Para a determinação da robustez do método alternativo foi avaliado o parâmetro tempo de incubação da amostra.

Os ensaios foram realizados utilizando distintos períodos de incubação conforme descrito no subitem 4.2.1.3 Metodologia alternativa.

Conforme apresentado no subitem 5.1 Etapa 1: Determinação do tempo mínimo de incubação para bactérias através do sistema Milliflex® Quantum, o método Milliflex Quantum demonstrou ser robusto no range de 36 a 120 horas de incubação

para o micro-organismo *Escherichia coli* e no range de 40 a 120 horas para os micro-organismos *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* (recuperações de fluorescência e viabilidade ≥ 90% e ANOVA *p* valor ≥ 0,05; n = 4).

Portanto, contemplando o intervalo de incubação comum a todos os micro-organismos avaliados no estudo, pode-se afirmar que o método alternativo é robusto para o período entre 40 e 120 horas de incubação através do sistema Milliflex® Quantum.

5.3 Etapa 3: Equivalência

Os estudos de equivalência são empregados para demonstração da ausência de diferenças entre os resultados obtidos por dois métodos analíticos enquanto os estudos de não-inferioridade possuem o objetivo de demonstrar que um novo método analítico não é, dentro de certos critérios, menos sensível, exato e preciso a um método analítico já existente. Deste modo, a formulação das hipóteses a serem testadas é o que caracteriza a diferença entre os dois tipos de estudos.

Na avaliação de desempenho do método alternativo, a não inferioridade do método alternativo em relação ao método tradicional necessita ser comprovada (FARMACOPEIA, 2016; EUROPEAN, 2017).

Para este propósito foi aplicado o teste de equivalência (TOST) para amostras pareadas com o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados conforme o subitem 4.2.2 Etapa 2: Avaliação de Desempenho bem como para o logaritmo das contagens obtidas nos ensaios realizados com as amostras de água tratada para diálise descritos no subitem 4.2.3 Etapa 3: Equivalência.

Com relação aos dados obtidos nos ensaios realizados com as 24 amostras de água tratada para diálise na etapa 3, foram excluídos da análise estatística nesta etapa, os resultados das amostras que apresentaram contagem de bactérias heterotróficas igual a zero (n=9) devido a impossibilidade de realizar umacomparação estatística para equivalência entre o método alternativo e o método tradicional se ambos métodos reportarem ausência deste grupo de bactérias. Uma amostra teve os resultados também excluídos da análise estatística nesta etapa devido à impossibilidade de quantificação pois as contagens obtidas nas placas da diluição 10^{-1} apresentaram contagens superiores a 100 UFC/placa, resultando em

valores superiores a 1000 UFC/mL para esta amostra. Desta forma, as análises estatísticas contemplaram a avaliação de 14 amostras (n=14).

As hipóteses consideradas para os estudos de não inferioridade foram:

- H0 : T - A ≥ M ; o método alternativo é inferior ao método tradicional
- H1: T - A < M ; o método alternativo não é inferior ao método tradicional

A hipótese de que o método alternativo não é inferior ao método tradicional foi testada usando um limite inferior de 70%.

Rejeitar a hipótese nula significa que a diferença entre o resultado numérico da metodologia tradicionalmente empregada (T) e o resultado numérico de uma metodologia alternativa (A) é menor que uma margem de tolerância (M) e, que, portanto o método alternativo (A) não é inferior ao método tradicional (T). O método alternativo é considerado não-inferior se o limite inferior do intervalo de confiança de 95% da diferença entre método tradicional e alternativo não incluir o valor da margem especificada. Desta forma, um *p*-valor inferior a 0,05 como resultado do teste permite rejeitar a hipótese nula e provar a não inferioridade do método alternativo frente ao método tradicional, para um intervalo de confiança de 95%.

Conforme observado nas figuras 24 a 28, para todos os micro-organismos testados na etapa 2 bem como para as amostras de água para diálise avaliadas na etapa 3, os valores estão compreendidos dentro nos limites de não inferioridade, demonstrando a não inferioridade do método alternativo frente ao método tradicional.

Figura 24 – Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Staphylococcus aureus*

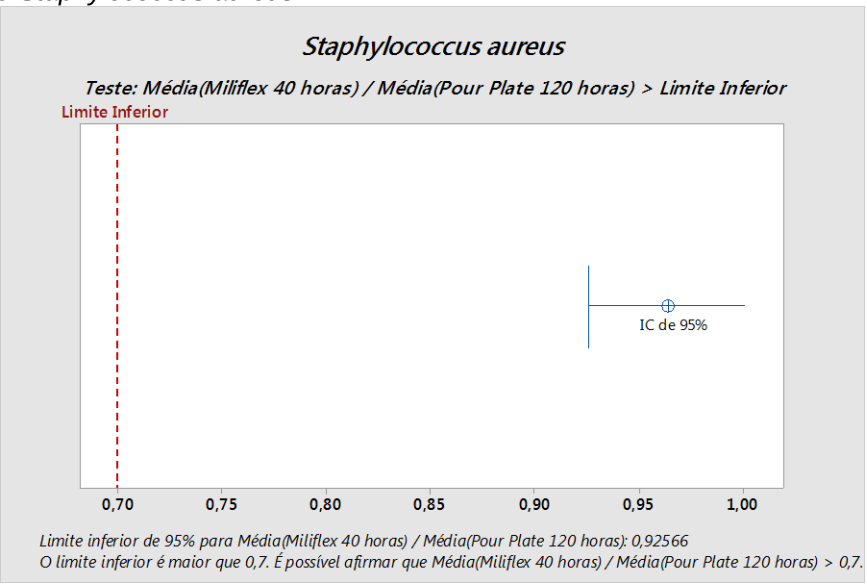


Figura 25 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Burkholderia cepacia*

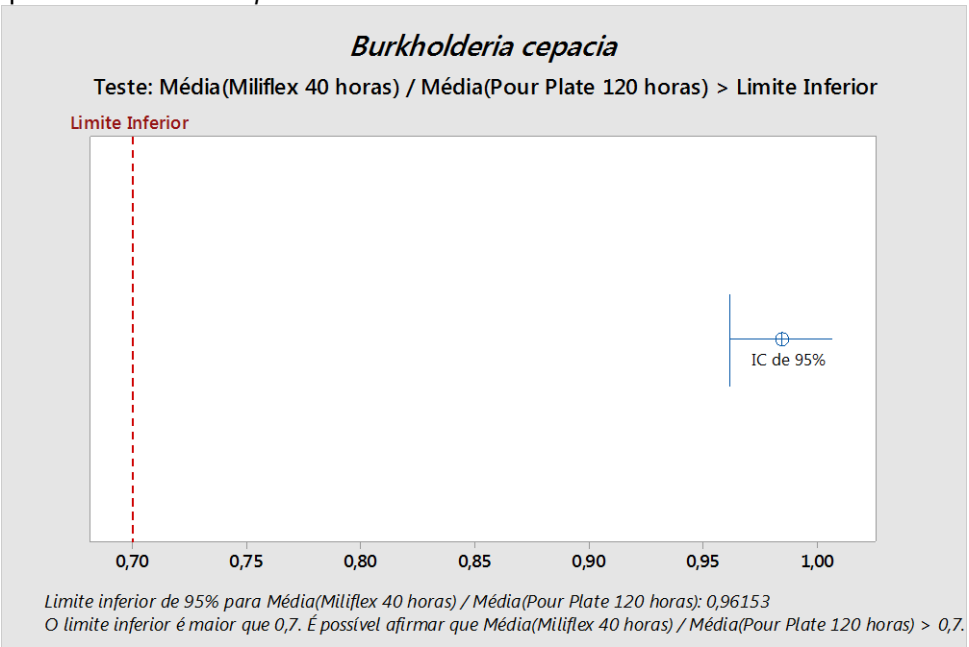


Figura 26 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Escherichia coli*

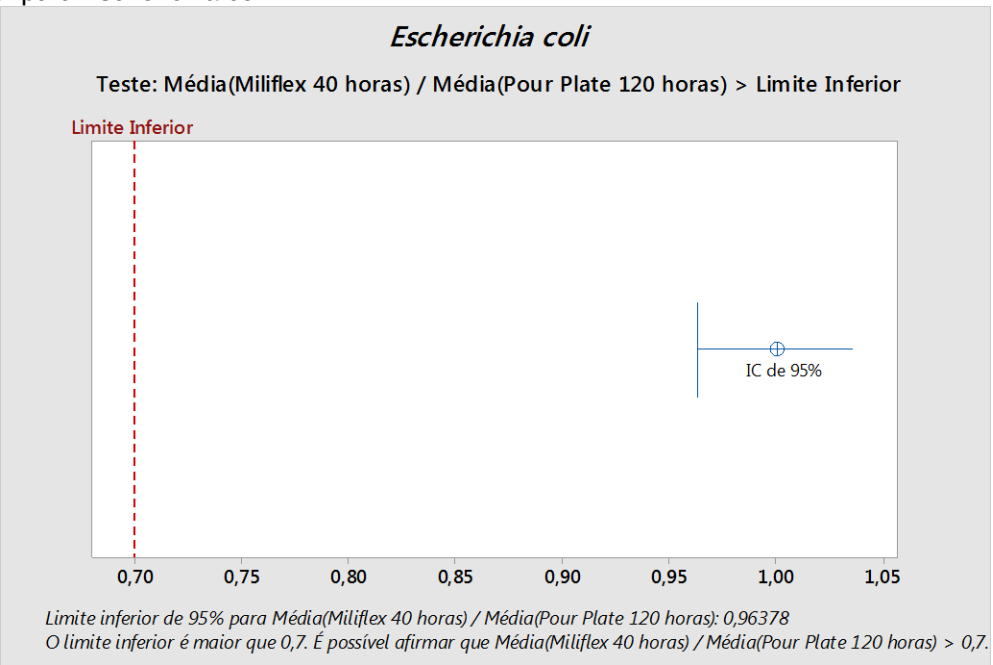


Figura 27 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para *Pseudomonas aeruginosa*

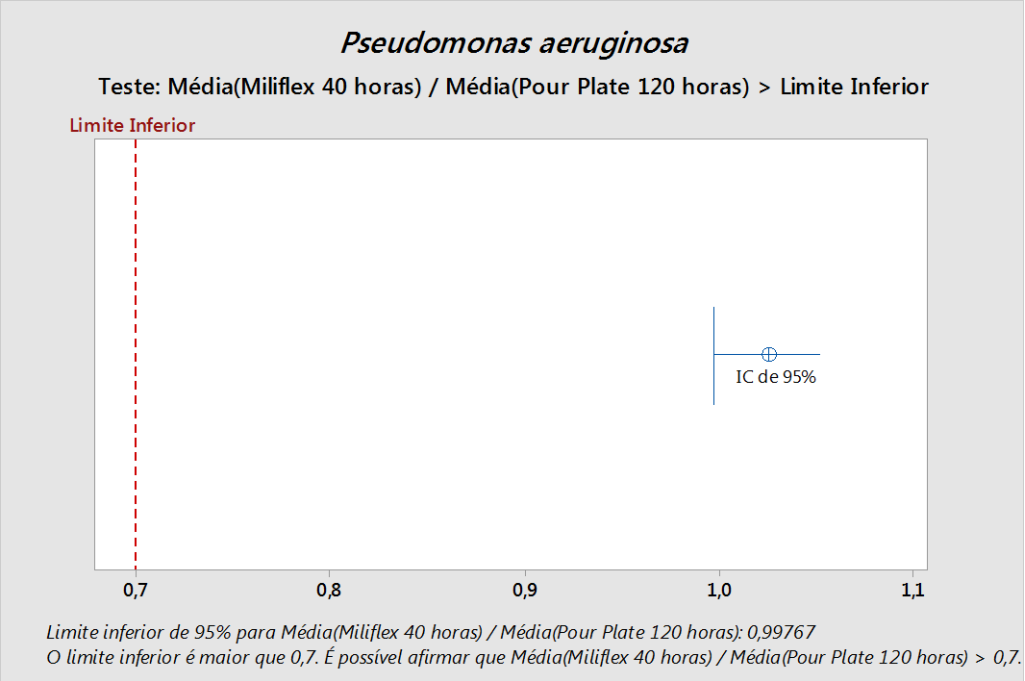
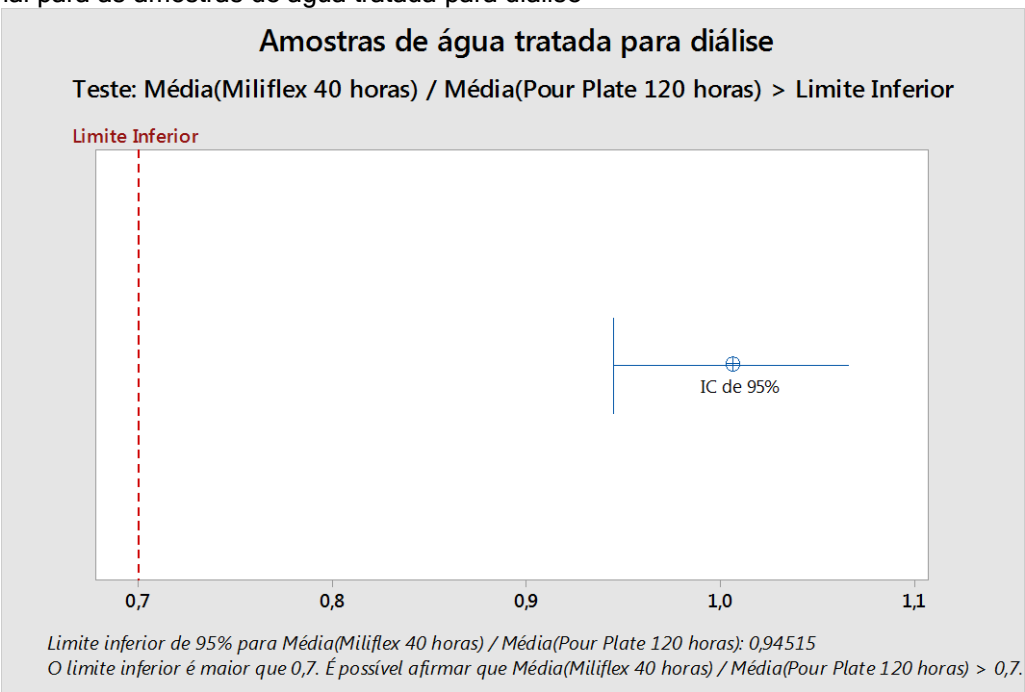


Figura 28 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para as amostras de água tratada para diálise



O teste de equivalência com dados pareados pode ser utilizado para testar se a média de um conjunto de dados teste é equivalente à média de um conjunto de dados de referência quando as observações forem realizadas concomitantemente, sendo a equivalência para o teste definida por um intervalo de valores especificado

denominado intervalo de equivalência. O resultado determinará se as provas são suficientes para afirmar que a diferença (ou a razão) entre as médias dos conjuntos de dados está compreendida dentro do intervalo de equivalência.

A hipótese de que os dois métodos (alternativo e tradicional) são equivalentes foi testada com os dados obtidos na etapa 2 para os quatro micro-organismos avaliados bem como com os dados obtidos nos ensaios das amostras de água tratada para diálise na etapa 3, utilizando um limite inferior de 70% e um limite superior de 130%.

As hipóteses para a aplicação do teste foram:

- Hipótese nula (H_0): A diferença entre as médias não está compreendida no intervalo de equivalência. As médias não são equivalentes.
- Hipótese alternativa (H_1): A diferença entre as médias está compreendida no intervalo de equivalência. As médias são equivalentes.

A obtenção de *p*-valor inferior a α (0,05), permite rejeitar a hipótese nula econcluir que as médias são equivalentes. As figuras 29 e 30 ilustram os resultados.

Figura 29 - Teste de equivalência entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional na etapa 2

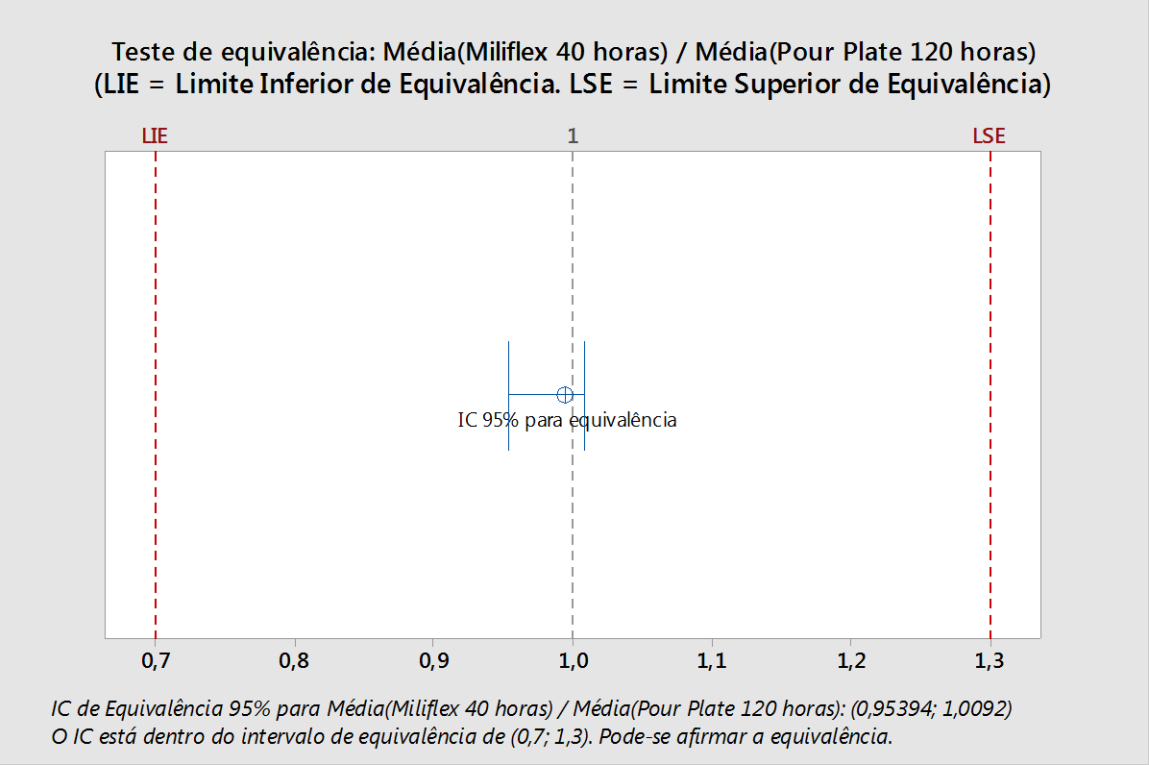
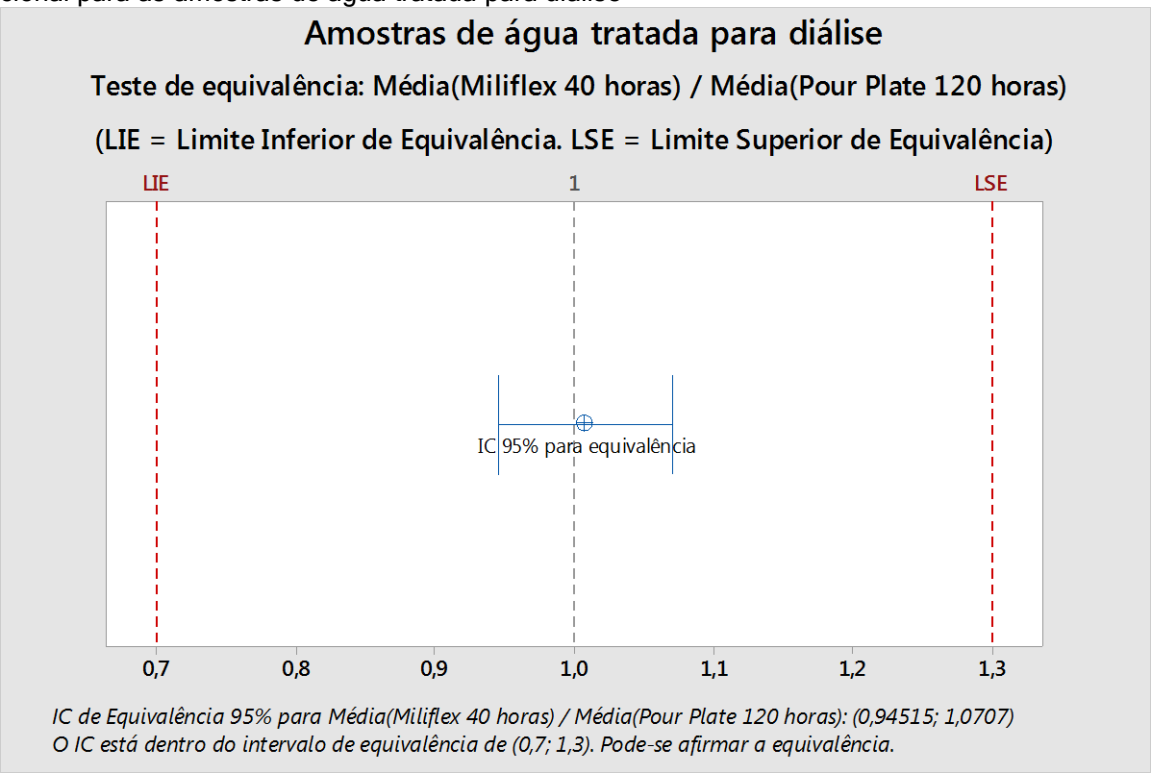


Figura 30 - Teste de não-inferioridade entre as contagens obtidas pelo método alternativo e tradicional para as amostras de água tratada para diálise



Portanto, de acordo com as figuras 29 e 30 é possível afirmar que o método alternativo, para um período mínimo de incubação de 40 horas, possui resultados equivalentes ao método tradicional, uma vez que o intervalo de confiança do método alternativo encontra-se inteiramente compreendido dentro do intervalo de equivalência em ambos gráficos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o método alternativo permite a quantificação de bactérias heterotróficas após 40 horas de incubação, atendendo aos critérios de exatidão, precisão e linearidade para o range de 5 a 100 UFC/placa, resultando em uma redução de aproximadamente 67% do tempo atualmente empregado no método tradicional, apresentando resultados equivalentes ao método tradicional. Portanto, a técnica de detecção microbiana pelo uso de fluorescência se mostrou uma opção viável para a implementação de um método microbiológico rápido para a contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada para hemodiálise.

7 PERSPECTIVAS

A importância da implementação de métodos microbiológicos rápidos para o monitoramento da qualidade microbiológica da água tratada para diálise constitui importante ferramenta para os Laboratórios de Saúde Pública deste país, de forma a auxiliar que os pacientes renais crônicos que utilizam os serviços de diálise sejam expostos a baixos riscos.

Portanto, com os resultados obtidos neste projeto, o trabalho pretende auxiliar no incremento da capacidade de resposta analítica dos laboratórios prestadores de serviços públicos e privados responsáveis pelo controle de qualidade de água tratada para diálise e contribuir com as Autoridades Regulatórias, no sentido de aperfeiçoar as ações sanitárias e regulatórias nos Serviços de Saúde.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

AL-GABR, H. M.; ZHENG, T.; YU, X. Occurrence and quantification of fungi and detection of mycotoxigenic fungi in drinking water in Xiamen City, China. *Science of The Total Environment*. v. 466-467, p. 1103-1111. 2014.

ALLEN, M. J.; EDBERG, S. C.; REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology.* v. 92, p. 265-274. 2004.

ALMODOVAR, A. A. B.; BUZZO, M. L.; SILVA, F. P. L.; HILINSKI, E. G.; BUGNO, A. Effectiveness of the monitoring program for ensuring the quality of water treated for dialysis in the state of São Paulo. *Braz. J. Nephrol.* v. 40, n. 4, p. 344-350. 2018.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; CONSTANTINIDES, T. C.; KATSOUYANNOPOULOS, V. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett Appl Microbiol*. v. 29, n. 2, p. 81-84. 1999.

Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI). *ANSI/AAMI 13959:2014. Water for hemodialysis and related therapies*. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2014. p. 5-14.

American Public Health Association (APHA). *Standard methods for examination of water and wastewater*. 23th ed. Baltimore: Port City Press; 2017. p. 1.1-1.68, 9.1- 9.44, 9.53-9.59, 9.212-9.215.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*. v. 181-182, p. 441-446. 2002.

BAUMSTUMMLER, A.; CHOLLET, R.; MEDER, H.; ROFEL, C.; VENCHIARUTTI, A.; RIBAULT, S. Detection of microbial contaminants in mammalian cell cultures using a new fluorescence-based staining method. *Lett Appl Microbiol*. v. 51, n. 6, p. 671-677. 2010.

BIOMERIEUX. Bioball: Introducing the new Bioball 14 Day Re-Hydration Fluid. Lyon: Biomerieux S.A; 2010. Disponível em: <http://bioball.com/wp-content/themes/bioball/upload/product_notes/BioBall%20MultiShot%20550%20-%2014%20Day%20RHF%20Flyer.pdf>. Acesso em: 08 de ago. de 2018.

BRASIL. *Portaria nº 2.042, de 11 outubro de 1996.* Estabelece o Regulamento Técnico para funcionamento dos Serviços de Terapia Renal Substitutiva e as normas para cadastramentos desses estabelecimentos junto ao Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, 14 de outubro de 1996. Disponível em: < http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/ter_r_s/>. Acesso em: 24 de abr. de 2017.

BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº* 08, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico que institui as Boas Práticas de Fabricação do Concentrado Polieletrolítico para Hemodiálise – CPHD. Diário Oficial da União, 10 de

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

janeiro de 2001. Disponível em: < http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/legislacao/RDC_n_8_de_2001_CPHD.pdf>. Acesso em: 24 de abr. de 2017.
BRASIL. *Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 212 p.

BRASIL. *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 13 de março de 2014*. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União, 14 de março de 2014. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf>. Acesso em: 24 de abr. de 2017.

BRASIL. *Portaria de Consolidação nº 05, de 28 de setembro de 2017.* Dispõe sobre a consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, 03 de outubro de 2017. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html>. Acesso em 21 de fev. de 2018.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA T. C.; AURICCHIO, M. T. Detecção de bactérias gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v. 66, n. 2, p. 172-175. 2007.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C. Enumeration of heterotrophic bacteria in water for dialysis: comparison of the efficiency of Reasoner'2 Agar and Plate Count Agar. *Braz J Microbiol*. v. 41, n. 1, p. 15-18. 2010.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; PEREIRA, T. C. Qualificação do transporte de amostras para o monitoramento da qualidade de água tratada para uso em diálise. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v. 77, e1744, p. 01-09. 2018. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial77_completa/1744.pdf>. Acesso em 01 de out. de 2018.

BUZZO, M. L.; BUGNO, A.; ALMODOVAR, A. A. B.; KIRA, C. S.; CARVALHO, M. F. H.; SOUZA, A.; SCORSAFAVA, M. A. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes.*Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 69, n. 1, p. 1-6. 2010.

CANAUD, B. Rapid assessment of microbiological purity of dialysis water: the promise of solid-phase cytometry assessment and epifluorescence microscopy method. *Nephrology Dialysis Transplantation*. v. 26, n. 11, p. 3426-3428. 2010.

COULLIETTE, A. D.; ARDUINO, M. J. Hemodialysis and water quality. *Seminars in Dialysis*. v. 26, n. 4, p. 427-438. 2013.

DAMASIEWCIZ, M. J.; POLKINGHORNE, K. R.; KERR, P. G. Water quality in conventional and home haemodialysis. *Nature Reviews Nephrology.* v. 8, p. 725-734. 2012.

DE BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*. v. 50, n. 1-2, p. 119-130. 1999.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. v. 8, n. 9, p. 881-890. 2002.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9.2.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2017. p.4339-4348.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9.6.ed. Strasbourg: Council of Europe, 2019. p.6115-6118.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. p. 230, 236-253, 391-398.

FARMACOPEIA Brasileira. 5.ed. supl.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2016. p. 33-41.

FASSBINDER, T. R. C.; WINKELMANN, E. R.; SCHENEIDER, J.; WENDLAND, J.; OLIVEIRA, O. B. Capacidade funcional e qualidade de vida de pacientes com doença renal crônica pré-dialítica e em hemodiálise – um estudo transversal. *J Bras Nefrol*. v. 37, n. 1, p. 47-54. 2015.

FERREIRA, J. A. B.; NOBREGA, H. N.; VIEIRA, V. V.; ABRANTES, S. M. P. Diversidade genética e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de Terapia Renal Substitutiva. *Revista Analytica*. v. 65, p. 56-69. 2013.

FREITAS, M. B.; FREITAS, C. M. A vigilância da qualidade da água para consumo humano: desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. *Ciênc. saúde coletiva*. v. 10, n. 4, p. 993-1004. 2005.

GONÇALVES, A. B.; PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*. v. 209, p. 257-264. 2006.

GONZALES-BARRON, U.; KERR, M.; SHERIDAN, J. J., BUTLER, F. Count data distributions and their zero-modified equivalents as a framework for modeling microbial data with a relatively high occurrence of zero counts. *International Journal of Food Microbiology*. v. 136, p. 268-277. 2010.

HAGESKAL, G.; GAUSTAD, P.; HEIER, B. T.; SKAAR, I. Occurrence of moulds in drinking water. *Journal of Apllied Microbiology*. v. 102, p. 774-780. 2007.

HILINSKI, E. G.; ALMODOVAR, A. A. B.; SILVA, F. P. L.; PINTO, T. J. A.; BUGNO, A. Is dialysis water a safe component for hemodialysis treatment in São Paulo State, Brazil? In: XXII SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2017, São Paulo. *Abstract* ..., 2017.

International Organization for Standardization (ISO). *Preparation and quality management of fluids for haemodialysis and related therapies - Water for haemodialysis and related therapies – Part 3*. ISO 23500-3:2019. Geneva: ISO; 2019. 19p.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTTENDAELE, M. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol*. v. 27, n. 6, p. 710-730. 2010.

KASPAREK, T.; RODRIGUEZ, O. E. What Medical Directors Need to Know about Dialysis Facility Water Management. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. v. 10, n. 6, p. 1061–1071. 2015.

LARSON, K. A.; WEINCK, J. M. Mercury removal from aqueous streams utilizing microemulsion liquid membranes. *Environmental Progress*. v. 13, n. 4, p. 253-262. 1994.

LI, L.; MENDIS, N.; TRIGUI, H.; OLIVER, J. D.; FAUCHER, S. P. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol*. v. 5, n. 258, p. 1-20. 2014.

LONNEMANN, G. L. Assessment of the quality of dialysate*. Nephrol Dial Transplant*. v. 13, n. 5, p. 17-20. 1998.

LOUVISON, M. C. P.; CECÍLIO, M. A. M.; OSIANO, V. L. L. R.; PORTAS, S. L. C.; SESSO, R. Prevalência de pacientes em terapia renal substitutiva no Estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*. v. 8, n. 95, p. 23-42. 2011.

MAGALHÃES, M.; DOHERTYB, C.; GOVANB, J. R. W.; VANDAMMED, P. Polyclonal outbreak of *Burkholderia cepacia* complex bacteraemia in haemodialysis patients. *Journal of Hospital Infection. v.* 54, p. 120–123. 2003.

MARCATTO, M. I. S. J.; GRAU, M. A. F.; MULLER, N. C. S. Projeto de reativação e implantação do programa de monitoramento da água tratada para hemodiálise do Estado de São Paulo, SP. *Boletim Epidemiológico Paulista*. v. 7, n. 74, p. 6-12. 2010.

MEDER, H.; BAUMSTUMMLER, A.; CHOLLET, R.; BARRIER, S.; KUKUCZKA, M.; OLIVIEIRI, F.; WELTERLIN, E.; BEGUIN, V.; RIBAULT, S. Fluorescence-Based Rapid Detection of Microbiological Contaminants in Water Samples. *The Scientific World Journal.* v. 2012, article ID 234858, 10p, 2012. doi:10.1100/2012/234858.

MENEZES, F. G.; BARRETO, D. V.; ABREU, R. M.; ROVEDA, F.; PECOITS FILHO, R. F. S. Panorama do tratamento hemodialítico financiado pelo Sistema Único de Saúde – uma perspectiva econômica. *J Bras Nefrol*. v.37, n.3, p.367-378. 2015.

MICROBIOLOGICS. Instruções de uso: Material de referência certificado Lab-Elite™ PI.289.POR Rev B. St. Cloud, 2013. Disponível em: <https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=918&c=915960&h=642a16dbe773d866b5b3&_xt=.pdf>. Acesso em 01 fev. 2018.

MILLER, M. J. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*: Volume 1. PDA: Bethesda, 2005a. p. 65-104.

MILLER, M. J. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*: Volume 2. PDA: Bethesda, 2005b. p. 103-135, 417-419.

MILLIPORE. Data sheet: Milliflex® Quantum rapid detection system. Billerica: Millipore Corporation; 2010. Disponível em: < https://labface.com/suppliers/pdf/milliflexquantum.pdf>. Acesso em: 05 de jul. de 2017.

MINESHIMA, M.; KAWANISHI, H.; ASE, T.; KAWASAKI, T.; TOMO, T.; NAKAMOTO, H. 2016 update Japanese Society for Dialysis Therapy Standard of fluids for hemodialysis and related therapies. *Renal Replacement Therapy*. v. 4, n. 15, p. 1-14. 2018.

MITTELMAN, M. W.; JONES, A.D.G. A pure life: The Microbial Ecology of High Purity Industrial Waters. *Microb Ecol*. p. 1-10. 2016.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol*. v. 5, n. 11, p. 2458-2461. 2007.

MOSSINI, S. A. G.; TOMOIKE, C.; KOHIYAMA, C. Y.; YAMADA, S. S.; SILVA, S. R. B.; GARCIA, L. B.; TOGNIM, M. C. B.; BANDO, E.; NISHIYAMA, P. Qualidade da água utilizada para equipamentos de hemodiálise em Unidade de Terapia Intensiva. *Vigil. sanit. debate*. v. 2, n. 3, p. 37-43. 2014.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bactéria. *FEMS Microbiol Rev*. v. 34, p. 415-425. 2010.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION (PDA). *Technical Report No 33; Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods (Revised).* 50p. 2013.

PASMORE, M.; MARION, K. Biofilms in hemodialysis. In: SHIRTLIFF, M.; LEID, J.G.; editors. *The role of biofilms in devide-related infections.* Los Angeles: Springer; 2009. p. 167-192.

PEREIRA, V. J.; FERNANDES, D.; CARVALHO, G.; BENOLIEL, M. J.; SAN ROMÃO, M. V.; BARRETO CRESPO, M. T. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Research*. v. 44, p. 4850-4859. 2010.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 4a ed. São Paulo: Manole, 2015. p. 76-94, 129-151.

PIRES, R. H.; DOS SANTOS, J. M.; ZAIA, J. E.; MARTINS, C. H. G.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Candida parapsilosis complex water isolates from a haemodialysis unit: biofilm production and in vitro evaluation of the use of clinical antifungals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 106, n. 6. p. 646-654. 2011.

POURIA, S.; DE ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *The Lancet*. v. 352, n. 9121, p.21-26. 1998.

REASONER, D. J. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol*. v. 92, n. 3, p. 307-315. 2004.

REASONER, D. J.; GELDREICH, E. E. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol.* v. 49, n. 1, p. 1-7. 1985.

RIELLA, M. C. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 869-907.

ROMÃO JUNIOR, J. E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol*. v. 26, n. 3, p. 1-2. 2004.

RONCO, C.; MISHKIN G. J. *Disinfection by sodium hypochlorite: dialysis applications*. Switzerland: Karger; 2007. p. 39-71.

ROTH, V. R.; JARVIS, W. R. Outbreaks of infection and/or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Seminars in Dialysis*. v. 13, n. 2, p. 92-96. 2000.

SANDLE, T. Assessment of the suitability of R3A agar for the subculture of microorganisms isolated from pharmaceutical water systems. *European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences*. v. 19, n. 3, p. 85-93. 2014.

SCHIAVANO, G. F.; PARLANI, L.; SISTI, M.; SEBASTIANELLI, G.; BRANDI, G. Occurrence of fungi in dialysis water and dialysate from eight haemodialysis units in central Italy. *Journal of Hospital Infection*. v. 86, n. 3, p. 194-200. 2014.

SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; MARTINS, C. T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2014. *J. Bras. Nefrol*. v. 38, n. 1, p. 54-61. 2016.

SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; THOMÉ, F. S.; LUGON, J. R.; MARTINS, C. T. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2016. *J. Bras. Nefrol*. v. 39, n. 3, p. 261-266. 2017.

SILVA, A. M. M.; MARTINS, C. T. B.; FERRABOLI, R.; JORGETTI, V.; ROMÃO JUNIOR, J. E. Revisão/Atualização em diálise: água para hemodiálise. *J Bras Nefrol*. v. 18, n. 2, p. 180-188. 1996.

SILVA, S. B.; CAULIRAUX, H. M.; ARAÚJO, C. A. S.; ROCHA, E. Uma comparação dos custos do transplante renal em relação às diálises no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 32, n. 6, p. 1-13. 2016.

SUMAN, E.; VARGHESE, B.; JOSEPH, N.; NISHA, K.; KOTIAN, M. S. The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *J. Clin Diagn Res.* v. 7, n. 5, p. 849-852. 2013.

SUTTON, S. Validation of Alternative microbiology methods for product testing. *Pharm Tech*. v. 29, n. 4, p. 118-122. 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5a ed. São Paulo: Atheneu. 2008. 760p.

UNITED States Pharmacopeia. 42.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2019.

UPADHYAY, A.; JABER B. L. We Use Impure Water to Make Dialysate for Hemodialysis. *Seminars in Dialysis*. v. 29, n. 4, p. 297-299. 2016.

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

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*. v. 60, n. 1, p. 5-15. 2006.

WARRIS, A.; GAUSTAD, P.; MEIS, J. F. G. M.; VOSS, A.; VERWEIJ, P. E.; ABRAHAMSEN, T. G. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection*. v. 47, p. 143-148. 2001.

World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-water Quality. 4th ed. Switzerland: WHO, 2011. p. 1-34, 117-154, 231-258, 294-298.

World Health Organization (WHO). UN-water global analysis and assessment of sanitation and drinking-water (GLAAS) 2014 report: investing in water and sanitation: increasing access, reducing inequalities. Switzerland: WHO, 2014. 108p.

ANEXOS

ANEXO A - Ficha do aluno