

Desinfecção de Máquinas de Hemodiálise com Ozônio

Disinfection of Hemodialysis Machines With Ozone

Fernando dos Santos, João Carlos Biernat, Ana Maria Giancristoforo dos Santos, Maria Elaine Latosinski Santos Souza, Áurea Alice Schone Raubach, Maria Salete Stumpf Demin

Unidade de Nefrologia do Hospital Parque Belém. Porto Alegre – RS, Clínica Nefrológica Guaíba. Guaíba – RS.

RESUMO

Objetivo: O Ozônio tem sido usado com bons resultados em circuitos hidráulicos de Unidades de Hemodiálise para inibir o crescimento bacteriano e a formação de biofilme. Este estudo investigou o efeito de seu uso também em máquinas de hemodiálise, em comparação com Ácido Peracético. **Métodos:** As máquinas de Hemodiálise, construídas com material compatível com uso de Ozônio, em duas Unidades diferentes foram desinfetadas diariamente com Ácido Peracético ou Ozônio. Bactérias heterotróficas foram identificadas em amostras de solução de diálise através do meio de cultura Plate-Count-Agar, e a medida qualitativa de endotoxinas foi feita através do teste LAL, com um limite de detecção de 0,25EU/ml. Os níveis de Ozônio na água ozonizada em mV foram medidos com um monitor ENATRON D.S. e as concentrações de Ozônio nas máquinas de hemodiálise foram medidas em amostras de água coletadas de seus drenos, após a desinfecção, usando-se método colorimétrico com o reagente DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine). **Resultados:** O número mediano de bactérias na solução de diálise quando Ácido Peracético foi usado foi de 17 unidades formadoras de colônia por ml (UFC/ml) e de 10UFC/ml quando Ozônio foi usado ($p < 0,05$). Os resultados do teste LAL foram positivos para endotoxinas em 14 amostras (35 %) após uso de Ácido Peracético e em seis amostras (18%) quando Ozônio foi usado. Os resultados da concentração média de Ozônio na água tratada (1033mV) e nos drenos das máquinas (0,350mg/L) mostraram valores adequados e seguros. **Conclusão:** O protocolo com Ozônio foi mais eficaz do que com Ácido Peracético, reduziu significativamente o crescimento bacteriano na solução de diálise e determinou menor número de resultados positivos para o teste de endotoxinas. (**J Bras Nefrol 2007; 29(1):14-8**)

Descritores: Ozônio. Desinfecção. Máquinas de Hemodiálise. Biofilmes.

ABSTRACT

Objective: Ozone has been successfully utilized in hydraulic circuits of Hemodialysis units to inhibit bacterial growth and biofilm formation. In this study we investigated the effects of its use in hemodialysis machines and compared the result with that of Peracetic Acid. **Methods:** The hemodialysis machines of two different units built with ozone compatible material were disinfected daily with Peracetic Acid or Ozone. Heterotrophic bacteria were counted in samples of dialysis solution using the Plate-Count-Agar culture medium and endotoxins were determined qualitatively using the LAL assay at a detection limit of 0.25 EU/ml. Ozone levels in treated water, in mV, were controlled with an ENATRON D.S. monitor and Ozone concentrations in hemodialysis machines were measured in water samples collected from the machine drains during disinfection using the colorimetric method with DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) reagent. **Results:** The median number of bacteria in the dialysis solution was 17 CFU/ml utilizing Peracetic Acid and 10 CFU/ml using Ozone ($p < 0.05$). The LAL assay results were positive for endotoxins in 14 samples (35%) after Peracetic Acid use and 6 samples (18%) when Ozone was used. Readings of mean Ozone concentration in treated water (1033 mV) and in machine drains (0.350 mg/l) revealed safe and efficient values. (**J Bras Nefrol 2007; 29(1):14-8**)

Keywords: Ozone. Disinfection. Hemodialysis. Biofilm.

Recebido em 14/02/06 / Aprovado em 12/05/06

Endereço para correspondência: 

João Carlos Biernat
Rua Sport Club São José 222
91030-510, Porto Alegre, RS
E-mail: biernat@terra.com.br

INTRODUÇÃO

O uso de Ozônio para inibir crescimento bacteriano e remoção de biofilmes, de modo eficaz no circuito hidráulico de Unidades de Hemodiálise, já é praticado, como referido por Jensen¹. No entanto, não há relatos do emprego específico de Ozônio em monitores de hemodiálise para a sua desinfecção. Por suas características, tais monitores contêm tubulações que facilitam a proliferação bacteriana e o desenvolvimento de biofilmes. A água que chega à máquina de hemodiálise facilmente pode ser contaminada, pois não apresenta mais cloro (removido previamente pelo carvão ativado), a solução de diálise apresenta nutrientes como glicose e sais minerais, no dialisato, há também nutrientes orgânicos provenientes do paciente (gerados por ultrafiltração e diálise), o concentrado de bicarbonato é um risco bem conhecido para promover infecção, e a inerente precipitação de sais de cálcio e magnésio determina formação de irregularidades na luz do circuito hidráulico que, por sua vez, são facilitadores para alojamento e proliferação bacteriana, com a conseqüente geração de biofilmes. Além disso, pode haver espaço morto no circuito hidráulico interno e períodos de estagnação de água sem cloro, dentro das máquinas, no intervalo entre as sessões de diálise.

A indução de resposta inflamatória crônica nos pacientes em hemodiálise, tanto por lipopolissacarídeos como exotoxinas está bem determinada. Recentemente, fragmentos de DNA de bactérias foram detectados no dialisato, com comprovada capacidade de induzir resposta imune².

Por ser instável e tendo uma meia-vida muito curta, o Ozônio deve ser gerado no local em que vai ser usado³. Em água bidestilada, sua meia-vida é de 10h, aproximadamente. Em água desmineralizada, com condutividade de 1,35µS/cm, a sua meia-vida é de 80 minutos. Já em água monodestilada a meia-vida cai para 20 minutos⁴.

Este estudo constitui o primeiro relato publicado do emprego de Ozônio na desinfecção interna de máquinas de hemodiálise, e não apenas do circuito hidráulico (looping) da Unidade, sendo feita a comparação com o Ácido Peracético.

MÉTODOS

Em duas Unidades diferentes, foi comparada a eficiência da desinfecção de máquinas de hemodiálise, sendo realizada com Ácido Peracético na Unidade A e com Ozônio na Unidade B, aplicando-se protocolo de contagem de bactérias heterotróficas e teste qualitativo de endotoxina. Foi coletado um total de 40 amostras de água da solução de diálise na Unidade A e 33 amostras na Unidade B.

A coleta foi diária, ocorrendo em duas máquinas diferentes por dia em cada Unidade. As amostras foram coletadas de modo asséptico, no turno da manhã, a partir do conector hansen das máquinas, antes de a solução de diálise entrar no dialisador capilar, após 2 horas de hemodiálise. Todas as máquinas eram Gambro®, modelo AK95, sendo avaliadas nove máquinas na Unidade A e dez na Unidade B, representada na Figura 1.

A tubulação hidráulica das máquinas, por onde circula a solução de diálise, dialisato, água, concentrados ácido e bicarbonato, é elaborada com vários tipos de materiais compatíveis com ozônio⁵, como: *polímeros* (silicone, santopreno, PVC, PEEK, PEX, PP, PSU, PVDF, PTFE), *metais* (aço inoxidável, titânio, platina), além de carbono, cerâmica, óxido de alumínio e vidro.

A contagem de bactérias heterotróficas na solução de diálise foi realizada através da semeadura em meio de cultura Plate-Count-Agar, da Merck®, aprovada por “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, fornecendo-se os resultados em UFC/ml (unidades formadoras de colônia/ml). As placas foram incubadas a 36°C, por 48 horas. A medida da concentração de endotoxinas foi feita através do teste do lisado de amebócitos do limulus (LAL), Pyrosate, Cape Cod®, com um limite de detecção de 0,25 EU/ml, conforme descrito por Novitsky⁶.

A desinfecção das máquinas de hemodiálise na Unidade A foi feita através da mistura de Ácido Peracético, Ácido Acético e Peróxido de Hidrogênio, com uma concentração final de 0,05% de Ácido Peracético, após a diluição de 1:35, sendo realizada diariamente após o último turno de diálise, durante 28 minutos.

Na Unidade B, a desinfecção foi realizada unicamente com Ozônio obtido por um ozonizador OZONIC®, através de efeito Corona, pela aplicação de uma descarga elétrica sobre oxigênio superseco, oriundo do ar atmosférico. A geração de Ozônio deu-se localmente na Unidade B, sendo o Ozônio introduzido na água a ser purificada por meio de injetor, através de efeito Venturi, para realizar tal dissolução. Quando o Ozônio alcançava a concentração adequada na água do looping (acima

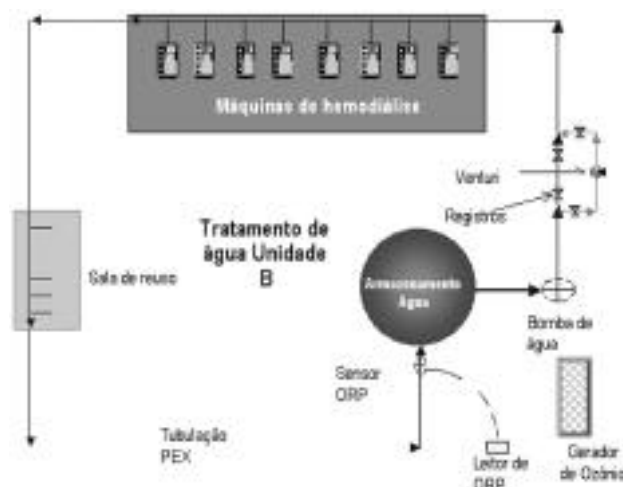


Figura 1. Circuito Hidráulico Unidade B (ozônio), composto de um gerador de Ozônio, Sistema Venturi, Sensor ORP, Leitor ORP, Tubulação PEX

de 700 mV), aferida pelo monitor ENATRON D.S.[®], a máquina de hemodiálise era programada em “Lavar e Drenar”, por 30 minutos. Essa desinfecção com água ozonizada foi realizada diariamente, após o último turno de diálise.

A monitorização do nível de Ozônio dissolvido na água (Ozônio residual) foi feita através do equipamento monitor ENATRON D.S.[®], que faz a leitura do Potencial de Oxi-Redução (ORP) e do seu sensor (eletrodo). O sensor foi instalado no looping de água ozonizada, antes do retorno para o tanque de armazenamento e um sinal, oriundo do eletrodo, alimentava o monitor ORP, que fornecia permanentemente, num display do equipamento, a concentração de Ozônio em mV.

A monitorização da concentração de Ozônio na máquina de hemodiálise foi feita através de amostra de água ozonizada, coletada no dreno da máquina, 15 minutos após o início da desinfecção com Ozônio. A leitura foi feita através da dosagem do Cloro total, por colorimetria, com adição do reagente DPD (N, N-dietil-p-fenilenodiamina). O teste químico foi realizado imediatamente após a coleta da amostra de 5,0ml, comparando-se visualmente a cor obtida após a adição de DPD, em uma escala comparativa, com amostra de água tratada, não ozonizada. Os valores assim obtidos são multiplicados por uma constante (0,68) para se chegar à concentração final de Ozônio dissolvido na água, em mg/mL³.

A desinfecção das tubulações e tanques na Unidade A foi feita através de solução contendo Hipoclorito de Sódio a 1%, aplicada mensalmente. Na Unidade B, foi empregado Ozônio, gerado como descrito acima, aplicado diariamente após o último turno de diálise, simultaneamente com a desinfecção das máquinas. Além disso, Ozônio foi aplicado quatro vezes por semana, durante 3 horas de modo automatizado, após as 24h, sob controle eletrônico.

O procedimento de descalcificação das máquinas de diálise nas Unidades A e B foi feito com solução de Ácido Acético a 0,5%.

Conversão de valores em mg/L para mV

Através de um gráfico de Potencial de Redução de Ozônio ou Potencial de Oxi-redução, mostrado na **Figura 2**, facilmente pode ser feita a conversão de valores obtidos em mg/L para mV⁷.

Análise Estatística

Foi realizada através do teste U de Mann-Whitney e teste exato de Fischer, com programa SPSS-MS, apresentando-se os resultados como contagem (percentual) e mediana, sendo as diferenças consideradas significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Quanto a intercorrências clínicas, não foram registradas anormalidades nos pacientes tratados em máquinas submetidas à desinfecção com Ozônio ou Ácido Peracético, atribuíveis a estes procedimentos.

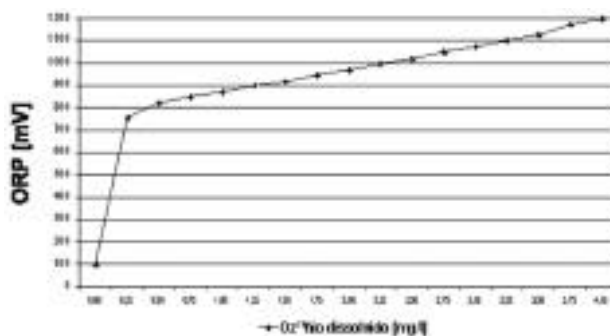


Figura 2. Potencial de Oxi-redução (ORP [mV] & OZONE [mg/L])

A concentração média de Ozônio no looping (origem) e na água ozonizada coletada no dreno de cada máquina (destino), após 30 mensurações em cada ponto, foi de 2,25mg/L no looping e de 0,350mg/L no dreno das máquinas, como mostrado na **Tabela 1**.

Quanto à contagem de bactérias heterotróficas, na Unidade A (Ácido Peracético), a mediana de colônias observada foi de 17 UFC/ml, em 40 amostras de dialisato analisadas. Na Unidade B (Ozônio), a mediana de colônias foi de 10UFC/ml, em 33 amostras como é mostrado na **Tabela 2**. Estatisticamente, foi encontrado $p=0,045$, ($p < 0,05$), avaliado pelo teste U de Mann-Whitney, sendo os dados apresentados como mediana.

A positividade qualitativa do Teste do LAL, para endotoxinas (valor = ou > 0,25 EU/ml), registrada na Unidade A (Ac. Peracético) foi de 14 testes positivos, em 40 amostras, com um percentual de positividade de 35%. Já na Unidade B (Ozônio), foram observadas seis amostras com Teste do LAL positivo, em 33 amostras, com um percentual de 18%, como mostrado na Tabela 2. A análise estatística deste material, realizada pelo teste exato de Fischer, mostrou uma significância de $p=0,123$, sendo os dados apresentados como contagem (percentual).

Tabela 1. Concentração de Ozônio no looping e máquinas de hemodiálise

Local da aferição		
Looping (N=30)	2,25 mg/L	(2,23 -2,29)
Máquinas (N=30)	0,350 mg/L	(0,136-0,476)

Tabela 2. Comparação entre Ácido Peracético e Ozônio na desinfecção de máquinas de hemodiálise

Características	Ácido Peracético	Ozônio	p
Endotoxina LAL [+], N(%)	14 (35)	6 (18)	0,123 ^a
CFU, U/mL	17(9-28)	10(3-26)	0,045 ^b

Os dados são apresentados como contagem (percentual) e mediana (amplitude interquartil = p25-p75). (a) Teste exato de Fisher; (b) Teste U da Mann-Whitney.

Os resultados, comparando o emprego de Ozônio e Ácido Peracético, de forma gráfica, quanto à contagem de bactérias heterotróficas, são mostrados na **Figura 3**.

Não foram observadas anormalidades técnicas, obstruções ou precipitados de sais de cálcio e magnésio ao longo do circuito hidráulico, tanto na Unidade A como na B, durante o período de observação, bem como alterações por corrosão atribuíveis ao Ácido Peracético ou Ozônio.

DISCUSSÃO

Devido à sua elevada capacidade oxidativa, o Ozônio destrói bactérias, vírus, esporos, endotoxinas e biofilmes. Afeta a membrana citoplasmática e sistemas enzimáticos, determinando a lise de células, não permitindo o desenvolvimento de resistência bacteriana³.

Com esse estudo, demonstrou-se que o Ozônio é capaz de reduzir de modo significativo o número de bactérias heterotróficas em monitores de hemodiálise, na comparação com Ácido Peracético. A mediana cai de 17 UFC/ml, após desinfecção com Ácido Peracético para 10 UFC/ml com Ozônio, com um nível de significância de $p < 0,05$. Também a presença de endotoxinas, avaliada pelo Teste do LAL, com um limite de detecção de 0,25 EU/ml, foi bem menor nas amostras de água oriundas de máquinas tratadas com Ozônio (positividade de 18%), em relação a máquinas tratadas com Ácido Peracético (positividade de 35%). Mesmo com todas as condições

favoráveis à proliferação bacteriana, inerentes a um monitor de hemodiálise, com Ozônio foram obtidos resultados, em termos bacteriológicos, que satisfazem as recomendações da Association for the Advancement of Medical Instrumental (AAMI)⁸ e diretrizes da EDTA⁹ para solução de hemodiálise. Saliente-se que a norma brasileira, definida pela Resolução RDC 154, da ANVISA¹⁰, recomenda positividade máxima do teste do LAL, em água de diálise, até 2,0EU/ml, valor esse que é oito vezes superior ao limite de positividade usado no presente trabalho.

A concentração de Ozônio dissolvido na água, medida no dreno do monitor de hemodiálise, durante a sua aplicação, variou de 0,136mg/L até 0,476mg/L, sendo suficiente para determinar reação de oxi-redução capaz de exercer o efeito bactericida desejado⁶.

Além de ser mais eficiente que o regime de desinfecção com Ácido Peracético, o protocolo com Ozônio determina considerável redução no tempo do procedimento, podendo ser feito diariamente após o último turno de diálise, em 30 minutos, já que o Ozônio se transforma em Oxigênio após 15 minutos⁶. Por isso, não há risco de produto químico residual permanecer no circuito hidráulico, nem há necessidade de limpeza de tais resíduos, o que consome tempo e grande volume de água tratada. Além disso, o custo final do sistema com Ozônio é bem inferior ao do Ácido Peracético, pois ele é gerado na própria Unidade.

Ao ser empregado Ozônio desse modo, tanto a rede hidráulica da Unidade como as máquinas de hemodiálise são tratadas simultaneamente, inclusive o segmento de conexão entre a rede hidráulica e o monitor. Esse segmento muito vulnerável, que fica entre o looping e o monitor, e inclusive parte inicial do circuito hidráulico do próprio monitor, anterior à bomba de recirculação, em alguns protocolos com agentes químicos, não é atingida, constituindo-se em zona de alto risco ("ponto cego") para desenvolvimento de bactérias e biofilmes^{13,14}.

Cabe salientar que o estudo foi realizado exclusivamente em máquinas de hemodiálise da marca Gambro® construídas com material compatível com o emprego de Ozônio em seu circuito hidráulico. O emprego deste protocolo em outros tipos de máquinas requer estudos específicos quanto à compatibilidade de seus componentes com Ozônio.

A presença de biofilmes reduz a eficiência de agentes químicos normalmente usados como desinfetantes, como Hipoclorito de Sódio e Ácido Peracético, gerando um ciclo vicioso, pois o aumento do biofilme interfere com a destruição de bactérias e endotoxinas¹³. O uso prévio de agentes físicos com propriedades desca- mantantes, como o Ácido Acético, Ácido Cítrico ou Ácido

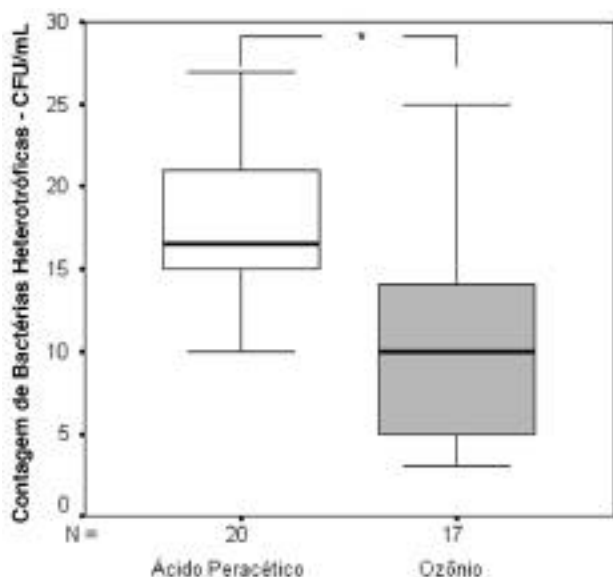


Figura 3. Valores de Mediana para CFU no protocolo com Ácido Peracético (barra aberta) e Ozônio (barra fechada). * $p=0,045$

Oxálico, pode facilitar a penetração mais profunda do desinfetante na estrutura do biofilme, aumentando assim a sua eficácia. Embora a desinfecção adequada e periódica seja o melhor método para reduzir a proliferação bacteriana em monitores de Hemodiálise, dispomos apenas de protocolos validados para eliminação de bactérias, faltando ainda protocolos específicos para a prevenção e erradicação de biofilmes^{14,15}.

Já o Ozônio, por suas propriedades de oxi-redução, em concentração adequada, destrói por completo o biofilme e também suas bactérias, inclusive em estudos realizados em segmentos removíveis de circuitos hidráulicos de Unidades de Hemodiálise, sendo muito bem documentada a efetiva destruição do biofilme por meio de microscopia eletrônica^{16,17}.

Um altíssimo nível de descontaminação de máquina de hemodiálise é recomendado atualmente, mesmo em hemodiálise convencional, pela possibilidade de ocorrer reação inflamatória crônica em pacientes com níveis elevados de endotoxina na solução de diálise. Quando a efetiva descontaminação de monitores de hemodiálise continua sendo uma preocupante dificuldade operacional, o correto emprego de Ozônio dissolvido na água surge como um método seguro, prático, barato e altamente eficaz para prevenir e remover bactérias e biofilmes.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Dr. Mário Wagner, Professor Titular de Estatística da Faculdade de Medicina da UFRGS, pela colaboração ao realizar a análise estatística apresentada.

REFERÊNCIAS

- Jensen E. Ozone: The alternative for clean dialysis water. **Dialysis & Transplantation** 1998; 27:706-12.
- Schindler R, Beck W, Deppish R, Aussieker M, Wilde A, Göhl H. Short Bacterial DNA fragments: Detection in Dialysate and induction of Cytokines. **J Am Soc Nephrol** 2004; 15:3207-14.
- Amato R, Curtis J. The practical application of ozone in dialysis. **Neph News & Issues** 2002; 16:27-9.
- Viebahnhaensler R. The use of ozone in Medicine, 4th ed. **Odrei-Publishers**; 2002. p. 38-40.
- Murphy J C. Materials Compatibility for Ozone. **Water Conditioning and Purification** 1998; vol 40(5).
- Novitsky T, Ridge R, Castro C. Endotoxin testing in the dialysis setting. **Nephrol News & Issues** 2004; 5:50-5.
- The Method of O3 Residual Control. In: Handbook of Chlorination and Alternative Disinfectants. 4th Edition. **Geo. Clifford White**; 1998. p. 1318-9.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation. Vol 3: Hemodialysis systems. ANSI/AAMI, **Arlington**. Va RD 62-2001.
- European Best Practice Guidelines for Hemodialysis. Water treatment system. **Nephrol Dial Transplant** 2002; 17(Suppl.7):45-62.
- Ministério da Saúde. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução RDC nº 154,15/06/2004.
- Ledebo I. Ultrapure dialysis fluid: Improving conventional and daily dialysis. **Hemodialysis Int** 2004; 8:159-68.
- Marion-Ferey K, Enkiri F, Pasmore M, Husson GP, Vilagines R. Methods for Biofilm Analysis on Silicone Tubing of Dialysis Machines. **Artificial Organs** 2003; 20:658-64.
- Capelli G, Tetta C, Canaud B. Is biofilm a cause of silent chronic inflammation in haemodialysis patients? A fascinating working hypothesis. **Nephrol Dial Transplant** 2005; 20:266-270.
- Lonneman G. When good water goes bad: how it happens, clinical consequences and possible solutions. **Blood Purif** 2004; 22:124-9.
- Cappelli G, Sereni L, Scialoja MG, Morselli M, Perrone S, Ciuffreda A, et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **Nephrol Dial Transplant** 2003; 18:2105-11.
- Penders C, Kooman JP, Stobberingh EE, van Der Sande FM, Frederik PM, Leunissen KM. Does ultrapure dialysate prevent the development of biofilm in dialysis therapy? **Nephrol Dial Transplant** 2001; 16:1522-4.
- Smeets E, Kooman J, van der Sande F, Stobberingh E, Frederik P, Claessens P, et al. Prevention of biofilm formation in dialysis water treatment systems. **Kidney Int** 2003; 63:1574-6.