



**Universidade Federal da Bahia**

**Instituto de Saúde Coletiva**

**Doutorado em Saúde Coletiva**

**RESÍDUOS INFECTANTES DE SERVIÇOS  
DE SAÚDE E EPIDEMIOLOGIA DO  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

*Aída Cristina do Nascimento Silva*

*Tese de Doutorado*

Salvador-Bahia

2009

# **RESÍDUOS INFECTANTES DE SERVIÇOS DE SAÚDE E EPIDEMIOLOGIA DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

*Aída Cristina do Nascimento Silva*

Tese de Doutorado apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Saúde Coletiva do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutor em Saúde Pública, área de concentração em Epidemiologia

## **Banca Examinadora**

**PROFA. Ediná Alves Costa, Doutora (ISC-UFBA)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

**PROFA. Susan Martins Pereira, Doutora (ISC-UFBA)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

**PROFA. Lucilaine Ferrazoli, Doutora (IAL – SES/SP)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**PROF. Eduardo Hage Carmo, Doutor (SVS-MS)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

**PROF. Eduardo Luiz Andrade Mota, Doutor (ISC-UFBA)  
(CO-ORIENTADOR)**

**PROF. Mitermayer Galvão dos Reis, Doutor (CPqGM/FIOCRUZ-BA)  
(ORIENTADOR)**

## FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, AÍDA CRISTINA DO NASCIMENTO

Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde e Epidemiologia do *Mycobacterium Tuberculosis* [Salvador] 2009.

xiii, 79p, 210 × 297mm (ISC/UFBa, Doutorado, Epidemiologia, 2009)

Tese de Doutorado – Universidade Federal da Bahia. Área de Concentração – Epidemiologia. Instituto de Saúde Coletiva.

Orientadores: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis e Prof. Dr. Eduardo Luiz Andrade Mota

1. Resíduos de Serviços de Saúde

2. *Mycobacterium tuberculosis*

3. Desinfecção

4. Epidemiologia

5. Biologia Molecular

I. ISC/UFBA

II. Título (série)

*Dedicatória*

**O ser humano descobre a si mesmo  
quando se defronta com os obstáculos.**

*(Saint-Exupéry)*

Dedico esta modesta obra aos meus avôs Reinaldo e Noêmia (em memória), pelo grande amor e dedicação, e que hoje ilumina os meus caminhos.

Aos meus pais Itanajara e Marlene, por todo amor, compreensão, carinho e apoio nesta caminhada de vida acadêmica.

Ao meu iluminado filho Endi Emanuel, por ser uma benção divina e a grande importância em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

*A Deus*, que me confia perseverança, coragem e determinação em superar minhas limitações e no desenvolvimento deste trabalho.

### ***Meus mestres...***

A Mitermayer Galvão dos Reis, pelo grande incentivo ao desenvolvimento do meu tema, orientação segura e democrática, como também por ter acreditado na minha capacidade.

A Ediná Alves Costa, pela confiança no tema, e que não negou esforços em colaborar no desenvolvimento deste trabalho, inclusive o fundamental apoio junto a ANVISA.

A Eduardo Luiz Andrade Mota, por ter sido mais que co-orientador, amigo de grande competência, grandes ensinamentos e palavras de entusiasmo e profissionalismo.

Aos professores do curso do ISC/UFBA - Maurício Barreto, Glória Teixeira, Maria Conceição, Maria Inês Dourado, Vilma Santana, Jorge Iriart, Carmen Teixeira, Jairnilson Paim, Susan Pereira, pelo convívio e conhecimentos transmitidos durante todo o período do curso; e do CPQGM/FIOCRUZ/BA - Professor Sérgio Arruda por sua grande experiência no diagnóstico laboratorial do *Mycobacterium tuberculosis*.

As Professoras Joice Neves e Lucilaine Ferrazoli, respectivamente, do CPqGM/FIOCRUZ/BA e Instituto Adolfo Lutz - IAL/SP, que ajudaram enormemente nas etapas metodológicas da técnica molecular e acreditaram no trabalho.

### ***A equipe do Centro Colaborador de Vigilância Sanitária...***

A todos os amigos de estudo e trabalho, em especial, Cláudio, Kelly, Rosa, Cristian, Ana Souto, Ana Oliveira, Augusto, Gustavo.

### ***As Minhas amigas pesquisadoras do ISC/UFBA...***

A Annelise Gonçalves, só uma grande amiga poderia abdicar de suas horas de lazer, ajudando a concretizar as idéias no papel, além do apoio, paciência e carinho nos momentos mais difíceis.

A Ana Moncayo, mais que um braço direito, uma amiga que mesmo com a língua estrangeira me ajudava na leitura crítica da análise exploratória dos dados e análises estatísticas, para que me superasse nas horas de cansaço e tensão.

À Julita Maria, Tatiana Frederico, Cristiane Costa, Hervânia Santana, Elsa Jacinto, amigas que sempre souberam dar uma palavra de incentivo, e disponibilizar os seus conhecimentos na área de epidemiologia durante o tempo convívio.

### ***Aos Funcionários do ISC/UFBA...***

Pelo apoio prestado e convivência os funcionários do ISC/UFBA Anunciação, Vilminha, Camila, Lane, Soninha, Ana, Néa, Cristina, Taís, Marlos pelo apoio prestado.

### ***Aos meus amigos pesquisadores do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz-FIOCRUZ/Bahia...***

A Theomira Mauadie de A.Carmo, pela amizade, palavras de incentivo e a riqueza da troca de experiências, o qual ampliou o meu conhecimento sobre métodos moleculares, a minha eterna gratidão nesta importante etapa da minha vida profissional.

A Fernanda, Luciano Kalabric, Gisele, Soraia, Eliana, Hildinha, Hermes, Paulo, Lúcio, Hondey, Zarife, Theolis Barbosa, Vânia (Bibliotecária), que com as diferentes experiências em pesquisa me ajudaram a tornar este trabalho muito especial.

### ***À colaboração do Hospital Especializado Octavio Mangabeira...***

A Coordenadora Hilma Guimarães e sua equipe do Laboratório de Micobactérias/ Hospital Especializado Octavio Mangabeira (HEOM/SESAB), que colaboraram significativamente na coleta de material biológico e realização da baciloscopia.

### ***À colaboração do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Bahia – LACEN/BA...***

A Diretora Dra. Rosane Will, pela aprovação do projeto junto a esta renomada instituição.

A Eliene Barreto, Coordenadora de Qualidade e Biossegurança, que favoreceu a articulação institucional, possibilitando a elaboração do projeto de tese, a minha gratidão na realização deste sonho.

A Coordenadora Cristiane Mota e sua equipe do Laboratório de Micobactérias, Bernadete, Elaine, Alysson, Zileide, Angélica, Pereira, Helenilda, Moisés, Wanda, Amilton, Antônio, Joselito, Dinalva, pela carinhosa receptividade, apoio técnico e troca de conhecimentos.

A Biomédica Joilda Nery, pela amizade, troca de conhecimentos, e grande colaboração na execução das etapas da metodologia de pesquisa (cultura e testes de identificação do *Mycobacterium tuberculosis* e a avaliação dos processos de desinfecção).

### ***Ao bibliotecário do Ministério da Saúde (Brasília - Distrito Federal)...***

A Eduardo Bonilha, que vem colaborando com presteza na aquisição de material bibliográfico especializado desde 2001.

### ***O órgão financiador...***

A ANVISA, por ter possibilitado a realização das etapas metodológicas desta pesquisa.

## SUMÁRIO

---

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>3</b>
---------------------------	----------

### **ARTIGO I**

#### **Regulamentação do Tratamento de Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde:**

<b>Uma Revisão da Literatura</b>	<b>5</b>
Resumo .....	6
Abstract .....	7
Introdução .....	8
Metodologia .....	9
Resultados .....	10
Discussão .....	19
Referências Bibliográficas .....	21

### **ARTIGO II**

#### **Desinfecção de Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Provenientes de Isolados**

<b>Clínicos de Indivíduos com Tuberculose</b>	<b>25</b>
Resumo .....	26
Abstract .....	27
Introdução .....	28
Metodologia .....	30
Resultados .....	33
Discussão .....	35
Referências Bibliográficas .....	38

### **ARTIGO III**

#### **Perfil de Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Isoladas de Pacientes Atendidos em Hospital de Referência na cidade de Salvador, Bahia**

	<b>42</b>
Resumo .....	43
Abstract .....	44
Introdução .....	45
Metodologia .....	47
Resultados .....	50
Discussão .....	55
Referências Bibliográficas .....	59
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO II

- FIGURA 1** Tubos de cultura submetidos ao Hipoclorito de Sódio 2% e mantidos em estufa a 37°C ..... 32
- FIGURA 2** Equipamento de Esterilização Térmica (Autoclave) utilizado para as culturas de *Mycobacterium tuberculosis* ..... 32
- FIGURA 3** Fluxograma do Delineamento do Experimento ..... 34

### ARTIGO III

- FIGURA 1** Dendograma representando os diferentes padrões de RFLP encontrados em isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de pacientes atendidos no HEOM, segundo número da amostra, data do isolamento, sexo, idade, residência e esquema de tratamento. .... 54

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

<b>TABELA 1</b> Resultados da Pesquisa Bibliográfica sobre Obrigatoriedade de Tratamento de Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde, no período de 1986 a 2008 .....	11
<b>TABELA 2</b> Temáticas mais abordadas nas dissertações e teses publicadas no Brasil, utilizando-se dos critérios de inclusão e descritores adotados neste trabalho, no período de 1992 a 2008 (catalogadas no portal da CAPES) ..	11
<b>TABELA 3</b> Cronologia da Regulamentação Nacional sobre Resíduos de Serviços de Saúde .....	12
<b>TABELA 4</b> Síntese das Alternativas de Tratamento dos Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde, de acordo com Marcos Legais Nacionais e Internacionais .....	17

### ARTIGO II

<b>TABELA 1</b> Comparação entre os processos de desinfecção por Hipoclorito de Sódio (2%) e o de esterilização por Autoclave .....	33
---	----

### ARTIGO III

<b>TABELA 1</b> Características dos indivíduos infectados com Tuberculose, de acordo com as variáveis preditoras. Salvador, Bahia, Brasil, 2008.....	52
<b>TABELA 2</b> Análise bivariada da associação entre as variáveis preditoras e o padrão RFLP ( <i>cluster</i> e não <i>cluster</i> ) dos isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de pacientes infectados com Tuberculose. Salvador, Bahia, Brasil, 2008 .....	53

## **APRESENTAÇÃO**

---

Trata o presente trabalho de revisar criticamente a legislação e as normas internacionais e nacionais relacionadas ao tratamento obrigatório dos resíduos infectantes de serviços de saúde; avaliar a inativação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de isolados clínicos submetidos ao processo de desinfecção química por Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2% e caracterizar o perfil molecular do *Mycobacterium tuberculosis* em isolados clínicos de indivíduos infectados de um hospital de referência para avaliar a sua dinâmica de transmissão.

O trabalho de conclusão ora apresentado tem o formato de coletânea de artigos organizado sobre o tema “regulamentação do tratamento de resíduos infectantes de serviços de saúde, a validação do processo de resistência do *Mycobacterium tuberculosis* aos processos de descontaminação (desinfecção e esterilização) e avaliação das cepas desse agente patogênico, com inferências sobre a sua dinâmica de transmissão entre indivíduos”.

No Artigo I, sistematizaram-se os resultados de trabalhos científicos, legislações e documentos técnicos publicados no período de 1986 a 2008 sobre a obrigatoriedade de tratamento dos resíduos infectantes gerados nos serviços de saúde. Do Artigo II verifica-se os resultados da investigação da capacidade de persistência do agente patogênico *Mycobacterium tuberculosis* nos isolados clínicos, provenientes de indivíduos com tuberculose, submetidos à desinfecção química com Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2%, comparativamente à esterilização por Autoclave. O Artigo III aborda a importância de identificar propriedades do *Mycobacterium tuberculosis* relacionadas com material biológico provenientes de pacientes com Tuberculose. Este artigo tem por objetivo a caracterização do perfil de cepas do *Mycobacterium tuberculosis* em isolados clínicos de pacientes acompanhados em um hospital de referência, na cidade de Salvador, Bahia - Brasil, através da técnica de tipagem molecular (RFLP) baseada na sequência IS6110 e da identificação de fatores associados à infecção por Tuberculose com cepas *cluster* por meio da análise exploratória de dados.

***REGULAMENTAÇÃO DO TRATAMENTO DE RESÍDUOS  
INFECTANTES DE SERVIÇOS DE SAÚDE: UMA REVISÃO DA  
LITERATURA***

***REGULATION FOR THE TREATMENT OF INFECTIOUS WASTE FROM  
THE HEALTH SERVICES: A REVIEW OF THE LITERATURE***

## RESUMO

Devido à existência de frações infectantes nos resíduos de serviços de saúde, recomenda-se, com base nas normas, a utilização de técnicas ou processos para alteração das características biológicas destes resíduos, garantindo o destino final adequado. O presente artigo apresenta uma descrição de trabalhos científicos, legislações, resoluções e documentos técnicos sobre a obrigatoriedade de tratamento dos resíduos infectantes gerados nos serviços de saúde, de forma a permitir a identificação dos critérios técnicos no controle de qualidade dos processos relativos à efetividade de redução da carga microbiana e a padronização para o descarte de material biológico, na ausência de tecnologias de tratamento. Os dados foram coletados entre 1986-2008, registrados nas seguintes bases de dados: BIREME, CAPES, *PubMed*, *Scielo*, CDC, OPAS, Ministério da Saúde, ANVISA, ABNT e CONAMA. Um total de 27 artigos, 131 dissertações de mestrado, 27 teses de doutorado, e 09 documentos técnicos sobre o tema. Na maior parte dos trabalhos científicos, legislações nacionais e internacionais, resoluções e documentos técnicos, há predomínio da recomendação do tratamento dos resíduos infectantes por Incineração e Autoclave para a efetiva inativação microbiana destes resíduos, adotada no gerenciamento pelos serviços de saúde. Foram identificadas combinações do uso de tecnologias de tratamento dos resíduos infectantes anteriores ao seu descarte final, destacando-se a existência de orientações normativas sobre o tratamento destes resíduos que tenham como propósito à definição das escolhas tecnológicas de menor custo e de fácil controle operacional.

**Palavras-chave:** resíduos infectantes, gerenciamento de resíduos, tratamento de resíduos, legislação sanitária, saúde pública

**ABSTRACT**

As healthcare associated waste often contains infectious material the regulations recommend that techniques or processes be used to alter the biological characteristics of this material for adequate disposal. This paper describes scientific studies, legislation, resolutions and technical documents on the compulsory treatment of infectious waste generated by the health services, in a manner that allows the identification of technical criteria in quality control of processes in relation to their effectiveness in reducing the bacterial load and the standardization of disposal of biological material in the absence of treatment technologies. The data were collected from 1986 to 2008 and were registered in the following databases: BIREME, CAPES, PubMed, Scielo, CDC, OPAS, Ministry of Health, ANVISA, ABNT and CONAMA. There were a total of 27 papers, 131 masters dissertations, 27 doctoral theses and nine technical documents on the theme. In the majority of the scientific studies, national and international legislation, resolutions and technical documents, it was recommended that waste treatment by incineration or autoclaving, for effective microbial inactivation of this material, be adopted by health service management. Combinations of treatment technologies for infectious waste prior to their final disposal were identified; emphasizing the existence of legislative guidelines on the treatment of this material with the aim of defining the choices of technologies with low cost and ease of use.

**Keywords:** infectious waste, waste management, waste treatment, health legislation, public health

## INTRODUÇÃO

Apesar da revisão recente das normas nacionais, com a padronização das orientações técnicas quanto à obrigatoriedade do tratamento prévio dos resíduos infectantes antes do seu descarte final<sup>1,13</sup>, o gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde (RSS), no Brasil, não é adotado integralmente nas suas etapas de execução pelos serviços de saúde e sistemas de gestão estaduais e municipais.

A regulamentação sobre o gerenciamento de RSS contempla as normas federais, estaduais e municipais específicas, e ainda dispositivos e resoluções de diferentes órgãos das esferas de governo. No nível federal, a normatização técnica que regulamenta estes resíduos é baseada nas determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que vem editando resoluções orientadoras para os serviços de saúde, em conformidade com as determinações do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) e da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

No contexto mais atual, a ANVISA publicou a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 306/2004<sup>1</sup>, que considera os serviços de saúde como os responsáveis pelo correto gerenciamento de todos os RSS por eles gerados, desde o momento de sua geração até a disposição final; e classifica estes resíduos em cinco grupos – Grupo A (resíduos com possível presença de agentes biológicos, e podem apresentar risco de infecção, denominados resíduos infectantes), Grupo B (resíduos contendo substâncias químicas), Grupo C (rejeitos radioativos ou contaminados com radionuclídeos), Grupo D (materiais equiparados aos resíduos domiciliares) e Grupo E (materiais perfurocortantes ou escarificantes).

Em função dos diferentes posicionamentos técnicos sobre a periculosidade e os riscos associados aos RSS, a RDC n.º 306/2004 já vêm determinando como diretriz obrigatória o tratamento prévio de resíduos ou materiais biológicos (Grupo A) gerados nos estabelecimentos de saúde, como culturas e estoques de microrganismos, antes de deixarem a unidade geradora, com o objetivo de reduzir ou eliminar a carga microbiana, e assim minimizar o risco de infecção associado a estes materiais. Esta Resolução determina, ainda, a elaboração de um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) pelo estabelecimento gerador; este plano deve obedecer a critérios pertinentes à legislação ambiental, aos serviços locais de limpeza urbana e outros critérios estabelecidos, a exemplo das rotinas e processos definidos pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH).

A Resolução CONAMA n.º 358/2005<sup>13</sup> dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos RSS, com a proposta de regulamentar o gerenciamento destes resíduos no Brasil com os órgãos federais, estaduais e municipais de meio ambiente, de saúde e de limpeza

urbana. Esta orientação normativa também classifica os RSS em cinco grupos, já anteriormente descritos, de acordo com a RDC n.º 306/2004, e ainda orienta quanto à obrigatoriedade de tratamento dos resíduos do grupo A antes de sua disposição final. Já a ABNT, por meio da NBR 12807/93<sup>2</sup>, define os RSS como aqueles gerados em serviços de saúde, que, por suas características de maior virulência, infectividade e concentração de patógenos, apresentam risco potencial à saúde pública.

Verifica-se que, mesmo com a existência de normas técnicas padronizadas sobre o tratamento de resíduos infectantes de serviços de saúde, ocorrem simplificações nos modelos de gerenciamento destes resíduos nos estados e municípios brasileiros. Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), realizada pela Fundação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/IBGE, no Brasil, 2.569 municípios depositam os RSS em valas sépticas (células de disposição final localizadas nos aterros de resíduos comuns), e apenas uma pequena percentagem de municípios utiliza alguma forma de tratamento térmico (incinerador, autoclave). Ainda com a problemática do sistema de gerenciamento de RSS no país, tem-se que 74% dos municípios brasileiros depositam “lixo hospitalar<sup>1</sup>” a céu aberto, 57% separam os dejetos nos hospitais e somente 14% das prefeituras tratam adequadamente os RSS<sup>20</sup>.

Neste sentido, dada a importância deste tema, buscou-se com este estudo fazer um levantamento da produção técnica e científica sobre a obrigatoriedade de tratamento dos resíduos infectantes gerados nos serviços de saúde, com o intuito de identificar os critérios técnicos no controle de qualidade dos processos relativos à efetividade de redução da carga microbiana e a padronização recomendada para o descarte de material biológico, na ausência de tecnologias de tratamento.

## METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão da literatura de trabalhos científicos, normas e documentos técnicos nacionais e internacionais sobre a obrigatoriedade de tratamento dos resíduos infectantes (Grupo A) gerados nos serviços de saúde.

A coleta de dados foi realizada através de busca bibliográfica na base de dados: BIREME, CAPES, *PubMed*, *Scielo (Scientific Electronic Library Online)*, CDC, OPAS, Ministério da Saúde, ANVISA, ABNT e CONAMA, optando-se por analisar estudos e

---

<sup>1</sup> Os resíduos de serviços de saúde são considerados geralmente como apenas aqueles provenientes de hospitais, clínicas médicas e outros grandes geradores; e muitas vezes denominados de “lixo hospitalar”.

documentos datados entre 1986-2008, para verificar as antigas experiências e temáticas mais recentes sobre RSS.

A estratégia de busca utilizada foi com base nos seguintes descritores, e no *link*, em inglês: regulamentação (*regulation*), legislação (*legislation*), gerenciamento (*management*), tratamento (*treatment*), descarte (*disposal*), resíduos hospitalares (*hospitals waste*), resíduos de serviços de saúde (*health-care waste*), resíduos sólidos infectantes (*infectious solid waste*), resíduos infectantes (*infectious waste*), resíduos clínicos (*clinical waste*). Outra forma de pesquisa utilizada na complementação de informações foi a citação de referências por outros autores como relatórios, teses, dissertações publicadas no Brasil e documentos eletrônicos divulgados na internet sobre o referido assunto.

Um dos critérios de inclusão foi à qualidade dos trabalhos, baseada na fonte de publicação e a interpretação dos resultados. Destaca-se que, foram excluídos trabalhos científicos e documentos técnicos publicados em idiomas diferente do português, inglês e espanhol.

Os trabalhos científicos, legislações e documentos técnicos têm como desfecho a descrição das alternativas tecnológicas mais recomendadas para o tratamento de resíduos infectantes adotadas no Brasil.

## **RESULTADOS**

Foram localizados 27 artigos, 158 trabalhos científicos (BIREME e CAPES), 26 trabalhos técnicos e 09 normas nacionais e internacionais sobre o tema em questão (Tabela 1), sendo que a maioria das referências define a utilização da esterilização térmica (Incineração e Autoclave) no tratamento dos resíduos infectantes. Dos 158 trabalhos científicos, 145 foram identificados no portal da CAPES (Teses de Doutorado e Dissertações de Mestrado), onde as escolhas dos resumos foram baseadas nos critérios de inclusão e descritores adotados nessa pesquisa, sendo excluídas as publicações científicas em duplicidade (Tabela 2).

Os resultados são apresentados em tópicos abordando inicialmente as principais regulamentações nacionais e internacionais sobre RSS (breve histórico normativo), uma visão geral dos modelos de gerenciamento dos resíduos infectantes adotados no Brasil, e, finalmente, o gerenciamento destes resíduos com os marcos regulatórios e as recomendações técnicas.

## PRINCIPAIS REGULAMENTAÇÕES SOBRE RSS

Dentre as orientações normativas nacionais sobre os RSS, adota-se a ABNT – NBR 12808<sup>3</sup>, e numa revisão recente tem-se a Resolução n.º 306 da ANVISA<sup>1</sup> e a Resolução n.º 358 do CONAMA<sup>13</sup>. E no que se refere às classificações internacionais são comumente citadas a da Organização Mundial da Saúde<sup>10,23,24,25,37</sup> e a da *Environmental Protection Agency* – EPA<sup>14</sup>.

De forma ilustrativa, a Tabela 3 apresenta a cronologia da regulamentação sobre RSS no Brasil, considerando as posturas relativas às questões ambientais e de saúde no gerenciamento destes resíduos.

Tabela 1

Resultados da Pesquisa Bibliográfica sobre Obrigatoriedade de Tratamento de Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde, no período de 1986 a 2008	
Tipos de Publicação	N.º de Artigos, Trabalhos Técnicos e Legislações
<b>Artigos científicos relevantes (conforme critério de inclusão)</b>	<b>27</b>
Artigos descrevendo a opinião de especialistas	2
Artigos sobre gerenciamento de RSS	25
<b>Trabalhos científicos (BIREME e CAPES)</b>	<b>158</b>
Teses de Doutorado	27
Dissertações de Mestrado	131
<b>Trabalhos técnicos</b>	<b>26</b>
Relatórios Técnicos (Autores diversos, OMS, OPS, WHO, EPA)	23
Apresentações em Seminários e Congressos	3
<b>Legislações</b>	<b>9</b>
Normas internacionais <sup>9,14,25,36,37</sup>	5
Normas nacionais <sup>1,2,4,13</sup>	4
<b>Total</b>	<b>220</b>

Tabela 2

Temáticas mais abordadas nas dissertações e teses publicadas no Brasil, utilizando-se dos critérios de inclusão e descritores adotados neste trabalho, no período de 1986 a 2008 (catalogadas no portal da CAPES)		
Categorias	Número de Publicações	Percentual
Regulamentação dos Resíduos de Serviços de Saúde	6	0,73
Legislação Sanitária sobre Resíduos de Serviços de Saúde	2	0,24
Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde	115	14,0
Resíduos Hospitalares	164	19,9
Resíduos de Serviços de Saúde	196	23,8
Resíduos Sólidos Infectantes	19	2,3
Resíduos Infectantes	40	4,9
Resíduos Clínicos	189	23,0
Tratamento de Resíduos de Serviços de Saúde	79	9,6
Descarte de Resíduos de Serviços de Saúde	13	1,6
<b>Total</b>	<b>823</b>	<b>100</b>

Tabela 3

## Cronologia da Regulamentação Nacional sobre Resíduos de Serviços de Saúde

<b>Ano da Publicação</b>	<b>Autor</b>	<b>Legislação</b>
1954	Ministério da Saúde	Lei n.º 2312/54, dispõe sobre a coleta, transporte e o destino final do lixo.
1976	Ministério do Interior	Portaria n.º 231, determina a responsabilidade dos municípios a instalação de incineradores para os resíduos gerados em serviços de saúde.
1977	Ministério da Saúde	Portaria n.º 400, recomenda posturas públicas municipais relativas ao tratamento de resíduos sólidos (uso de incineradores para frações sépticas).
1977	Ministério do Meio Ambiente	Lei n.º 6453, fixa a responsabilidade dos impactos causados pela deposição de resíduos perigosos de serviços de saúde no ambiente.
1979	Ministério do Interior	Portaria n.º 53, estabelece normas para o tratamento e disposição do resíduo sólido.
1980	Presidência da República	Lei Federal n.º 6803, estabelece normas e padrões sobre construção e instalação de serviços de saúde e prevê o tratamento de resíduos sólidos.
1981	Ministério do Meio Ambiente	Lei n.º 6938, estabelece também a imposição de penalidades legais aos serviços de saúde pelo manejo inadequado dos resíduos sólidos por prestadores de serviços terceirizados.
1985	Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)	CNEN n.º 19, determina a gerência de rejeitos radioativos em instalações radioativas.
1998	Presidência da República	Constituição Federal – Artigo 225, institucionalizou as ferramentas AIA e EIA-RIMA ao prever a necessidade de estudo de implantação de qualquer atividade passível de degradação do meio ambiente.
1993	Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)	Resolução CONAMA n.º 5, define os procedimentos de gerenciamento de resíduos sólidos provenientes de serviços de saúde, portos e aeroportos; desobriga a incineração ou qualquer outro tratamento de queima dos resíduos sólidos provenientes dos estabelecimentos de saúde.
1993	Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)	NBR 12807 - Resíduos de Serviços de Saúde: Conceito.
1993	Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)	NBR 12808 - Resíduos de Serviços de Saúde: Classificação.
2001	Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)	Resolução CONAMA n.º 283, dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos serviços de saúde.
2003	Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA	RDC n.º 33, dispõe sobre o gerenciamento dos resíduos sólidos gerados em serviços de saúde.
2004	Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA	RDC n.º 306, dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.
2005	Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)	Resolução CONAMA n.º 358, dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

Fonte: Adaptado de Carramenha (2005)<sup>8</sup>

## **MODELOS DE GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS INFECTANTES**

No Brasil, as propostas de gerenciamento dos RSS, em especial os resíduos infectantes, têm-se fundamentado em padrões estabelecidos em países como Estados Unidos (EUA), França e Japão. A adoção de uma política cautelosa e de alternativas de tratamento destes resíduos está diretamente associada às diferentes frações consideradas perigosas, patogênicas, entre outras denominações, e que exigem procedimentos especiais<sup>15</sup>. Verifica-se que o modelo de gerenciamento dos RSS, principalmente para as frações infectantes, tem como prioridade à adoção crescente de sistemas específicos de tratamento e disposição final, e não na concepção gerencial de **tecnologias ambientais** ou **tecnologias limpas**<sup>2</sup>.

A tomada de decisão nos EUA quanto à adoção de gerenciamento específico para os RSS considerados como perigosos, teve seu marco referencial, dada à ocorrência, no verão de 1988, de seringas, agulhas, bolsas de sangue usadas e material de curativos descartados nas suas regiões costeiras<sup>12, 17, 28</sup>. Embora não tenha sido encontrado nenhum agravo significativo à saúde pública devido aos RSS, os EUA decidiram regulamentar procedimentos para algumas frações específicas desses resíduos<sup>14</sup>.

Para alguns autores<sup>12, 16, 27</sup>, a adoção de gerenciamento diferenciado para os RSS gerados deve estar direcionada às frações específicas, particularmente os perfurocortantes, que estão associados à transmissão de infecção ou ferimentos. Contudo, há proposições de tecnologias de tratamentos diferenciadas para os RSS bastante difundidas nos países desenvolvidos, principalmente nos EUA, e que servem como modelo para o gerenciamento desses resíduos no Brasil<sup>22,23, 37</sup>.

Rutala e Weber<sup>28</sup> e Rutala e Mayhall<sup>29</sup> afirmam que a maioria das unidades hospitalares americanas adota comumente a incineração para os resíduos infectantes; a esterilização a vapor (Autoclave) para os resíduos microbiológicos é utilizada em quase um terço dos hospitais dos EUA, sendo que um quarto destes estabelecimentos adota o sistema de esgotos para os resíduos líquidos perigosos gerados (sangue de pacientes e outros fluídos corporais), e essas parcelas são tratadas, previamente, por procedimentos químicos. Simultaneamente, a maioria dos estados americanos, baseada em regulamentos restritivos para os resíduos hospitalares produzidos, aumenta o volume desses resíduos a serem obrigatoriamente tratados; e impõe restrições à disposição em aterros sem tratamento, dada a existência de microrganismos patogênicos.

---

<sup>2</sup> O Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente – PNUMA conceitua **tecnologias ambientais** ou **tecnologias limpas** como aplicação, de forma contínua, de uma estratégia ambiental aos processos e produtos, visando prevenir a geração de resíduos e minimizar o uso de matérias-primas e energia, a fim de reduzir riscos ao meio ambiente e ao ser humano.

De forma paradoxal, verifica-se que as leis rigorosas dos EUA que não permitem a disposição final de RSS no solo, permitem o uso da incineração, e há que se considerar com relevância as emissões perigosas de particulados na atmosfera na utilização desta alternativa de tratamento, que podem comprometer a saúde humana e ambiental.

A UNEP<sup>33</sup> salienta que a disposição, em aterros, desses resíduos não tratados, considerando também as frações com agentes patogênicos, deve ser realizada com critérios de engenharia e segurança adequados de forma a prevenir riscos à saúde dos trabalhadores.

No Brasil, o predomínio dos modelos de tratamento dos RSS implantados nos países desenvolvidos é encontrado em alguns municípios das grandes capitais (Brasília, São Paulo, Salvador) e centros urbanos, que utilizam as usinas de incineração para os resíduos de saúde gerados. Cabe destacar que o modelo importado dos países desenvolvidos, propõe, ainda, a separação e acondicionamento específico dos RSS na fonte geradora, a coleta diferenciada em veículos especiais e o tratamento e disposição final, preferencialmente (e em alguns países como a França, é um procedimento obrigatório) através da incineração dos resíduos<sup>15, 17, 27</sup>. A adoção de tal modelo de gerenciamento, no Brasil, sem levar em consideração as limitações de recursos financeiros para implantação de técnicas de tratamento, a reduzida capacitação técnica para operação dessas alternativas, e ainda, unidades de saúde que desconhecem a quantidade e a composição dos resíduos gerados, pode elevar a parcela de frações infectantes de RSS direcionadas ao tratamento e a destinação final, favorecendo questões reflexivas sobre a real situação dos riscos à saúde pública e ao ambiente. Observa-se também que, para alguns municípios, a possibilidade de negligenciar a destinação dos RSS não é remota, e certamente a falta ou o gerenciamento inadequado impliquem no descarte das frações perigosas desses resíduos diretamente no solo, dispostas conjuntamente com os resíduos comuns.

### **GERENCIAMENTO DOS RSS E SUAS FRAÇÕES INFECTANTES**

A regulamentação sobre o tratamento de RSS, e suas frações infectantes, está relacionada ao risco de patogenicidade e periculosidade dos resíduos gerados em estabelecimentos de saúde. Em função deste aspecto, as proposições de gerenciamento destes resíduos têm por objetivo a definição de tecnologias de tratamento que busquem a redução ou inativação da carga microbiana, de forma a proporcionar aos resíduos um encaminhamento seguro, do ponto de vista ambiental e de saúde.

Na revisão dos normativos nacionais<sup>1,4,13</sup> e internacionais<sup>9,14,25,36,37</sup> sobre as tecnologias de tratamento dos resíduos infectantes, apresentadas neste estudo, houve a identificação de aspectos conceituais, dos critérios recomendados para efetividade de redução da carga microbiana e da padronização recomendada na ausência da adoção das tecnologias de tratamento (Tabela 4).

TABELA 4. Síntese das Alternativas de Tratamento dos Resíduos Infectantes de Serviços de Saúde, de acordo com Marcos Regulatórios Nacionais e Internacionais

<b>Autor</b>	<b>Classificação dos RSS (Resíduos Infectantes)</b>	<b>Conceito</b>	<b>Tipo de Tratamento Recomendado</b>	<b>Crítérios Recomendados para Efetividade de Redução da Carga Microbiana</b>	<b>Padronização Recomendada na Ausência da Adoção das Tecnologias de Tratamento</b>
<b>Nacional</b>					
ANVISA (RDC n.º 306/2004) <sup>1</sup>	Grupo A (sub-grupo A1) (resíduos infectantes)	Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção	Processo de Autoclavação	Controles Químicos e Biológicos periódicos devidamente registrados	Estes resíduos não podem deixar a unidade geradora sem tratamento prévio
MINISTÉRIO DA SAÚDE <sup>4</sup>	Materiais Biológicos	Resíduos provenientes de manipulação de secreção respiratória	Descontaminação por Hipoclorito de Sódio 2% e posterior Esterilização em Autoclave	Controles Químicos e Biológicos periódicos	---
CONAMA (Resolução n.º. 358/2005) <sup>13</sup>	Grupo A (sub-grupo A1) (resíduos infectantes)	Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção	Processo de Autoclavação	Monitoramento de acordo com parâmetros e periodicidade definidos no licenciamento ambiental	Os resíduos devem ser submetidos a processos de tratamento em equipamento que promova redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação microbiana e devem ser encaminhados para aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de RSS

TABELA 4 – Continuação

Autor	Classificação dos RSS	Conceito	Tipo de Tratamento Recomendado	Critérios Recomendados para Efetividade de Redução da Carga Microbiana	Padronização Recomendada na Ausência da Adoção das de Tecnologias de Tratamento
<b>Internacional</b>					
WHO <sup>25, 36, 37</sup>	Resíduos Infectantes ou Patológicos	Resíduos com suspeita de conter agentes patogênicos	Incineração, Autoclave e Desinfecção química (Hipoclorito de Sódio 2-12%)	Monitoramento dos poluentes (incinerador), Adequação às propriedades físicas e químicas do produto (Hipoclorito de Sódio) e monitoramento dos parâmetros químicos e biológicos	Utilização de aterros com critérios técnicos adequados, dada à existência de microrganismos patogênicos
CDC <sup>9</sup>	Resíduos de Serviços de Saúde (Medical Waste)	Resíduos que representam potencial risco de infecção durante o manuseio e disposição.	Incineração e Autoclave (Mais recentemente tem sido utilizado materiais biológicos em imersão química – Hipoclorito de Sódio 5,25%-6,15%)	Monitoramento de acordo com parâmetros químicos e biológicos, de forma periódica	---
EPA <sup>14</sup>	Resíduos Patológicos	Resíduos que contém agentes patogênicos e, portanto, são perigosos a saúde humana	Incineração e Autoclave	Monitoramento de acordo com parâmetros químicos e biológicos, de forma periódica	Utilização de aterros com critérios técnicos adequados, dada à existência de microrganismos patogênicos

WHO – World Health Organization; CDC – Center of Disease Control; EPA – Environmental Protection Agency

## DISCUSSÃO

A análise da literatura recente sobre a obrigatoriedade de tratamento dos resíduos infectantes gerados nos serviços de saúde mostra uma visão do modelo de gerenciamento mais adotado, nos regulamentos técnicos nacionais e internacionais, bem como a identificação de algumas limitações na utilização das tecnologias de tratamento para estes resíduos.

De uma forma geral, observa-se o respeitável acervo da literatura científica sobre o tema dada a importância do gerenciamento de RSS no que se refere à contaminação ambiental e humana<sup>8, 11, 15, 22, 28, 31</sup>. Comparando os artigos e marcos regulatórios, verifica-se a recomendação significativa quanto ao uso de processos de esterilização térmica – Incineração e Autoclave, dado o amparo destas escolhas tecnológicas nas normas sobre RSS<sup>1, 9, 13, 24</sup>. No entanto, as referências nacionais<sup>15, 19, 22, 31</sup> apontam a dificuldade da maioria dos municípios brasileiros e estabelecimentos de saúde na adoção destas tecnologias de forma a cumprir as exigências legais, considerando, inclusive, o custo na implantação e manutenção destes sistemas de tratamento.

Um ponto importante a ser discutido refere-se aos critérios recomendados para efetividade de redução da carga microbiana pelas tecnologias de tratamento comumente adotadas. Os resultados indicam o predomínio dos indicadores de controle de qualidade dos processos de esterilização térmica anteriormente citados, sendo que não foi identificada, nas orientações normativas, a utilização de medidas ambientais indicadoras da presença de contaminação. Recomenda-se, assim, o desenvolvimento de estudos e pesquisas que possam dar respostas efetivas sobre os problemas ambientais no gerenciamento interno e externo de RSS. No Brasil, vem se destacando alguns estudos para caracterização microbiológica de RSS, com metodologias propositivas de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos patógenos presentes nestes resíduos<sup>31</sup>.

Cabe ressaltar ainda, a observação da existência de lacunas nas normas sobre RSS acerca dos procedimentos a serem adotados na ausência da adoção de tecnologias de tratamento para os resíduos infectantes gerados, por parte dos estabelecimentos de saúde e prestadores de serviços. Este aspecto tem a sua relevância, já que alguns estudos relatam ser evidente a precariedade do tratamento e disposição final dos RSS no Brasil, em que apenas pequena fração desses resíduos é depositada em aterros sanitários controlados, favorecendo o risco de contaminação ambiental<sup>15, 17, 19</sup>.

Além do exposto, outro aspecto merece destaque: a possível associação entre as frações infectantes de RSS e saúde ocupacional, onde alguns artigos evidenciam a existência de conflitos sobre estenexo epidemiológico<sup>7,18,26,38,39,40</sup>. Todavia, há que se destacar também a

existência de estudos limitados sobre esta temática no Brasil, onde a maior preocupação está relacionada à transmissão de doenças viróticas (Hepatite B) entre os trabalhadores que atuam na limpeza e remoção de RSS, pelo contato com materiais biológicos contaminados<sup>5,15</sup>.

Neste contexto, este estudo reafirma a necessidade de identificar padronizações mais simples para o gerenciamento interno dos resíduos infectantes de serviços de saúde a ser implantada pelos municípios brasileiros, e como propostas tem-se: i) normatizar a obrigatoriedade da segregação das frações infectantes de RSS, com o acondicionamento adequado destes resíduos em sacos apropriados, observando a aquisição de materiais que atendam às especificações das normas técnicas sobre coleta, acondicionamento e transporte de RSS; ii) utilização de processos simples de desinfecção química (como o Hipoclorito de Sódio 2-12%, usado rotineiramente nos serviços de saúde na inativação de microorganismos em superfícies contaminadas, e atualmente usado no tratamento de RSS<sup>6,25</sup>) na efetividade de redução microbiana dos resíduos infectantes gerados.

Alguns autores enfatizam também a necessidade de cuidados a serem observados com o gerenciamento final dos resíduos infectantes de serviços de saúde, considerando a importância das questões relacionadas à saúde, higiene e segurança ocupacional<sup>25,30,32</sup>, mesmo quando não houver o tratamento preliminar das frações infectantes destes resíduos pelas fontes geradoras, e até propõem a adoção de procedimentos operacionais, como a não compactação dos sacos de resíduos infectantes depositados nos aterros urbanos ou células especiais de RSS, de forma a evitar a exposição ao material biológico contaminado<sup>30</sup>.

Assim, ressalvadas as limitações desta pesquisa, os estudos e documentos analisados por esta revisão retratam a situação local de gerenciamento dos RSS e alguns trabalhos destacam a adequação dos serviços ou estabelecimentos de saúde às exigências legais para o efetivo gerenciamento destes resíduos, e, seguramente, representam importantes contribuições técnicas e científicas para o tema em questão. Sob um ponto de vista mais prático, enfatiza-se para o Brasil, a necessidade de orientações normativas sobre o tratamento de RSS que tenham como propósito à definição de escolhas tecnológicas de menor custo de implantação e de fácil controle operacional, e até exemplificadas anteriormente, mas que garantam o controle ambiental e de exposição humana no gerenciamento dos resíduos infectantes de serviços de saúde.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº. 306, de 07 de Dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 10 de dezembro de 2004.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 12807 - Resíduos de Serviços de Saúde: Conceito. ABNT, Rio de Janeiro, Brasil, 3p; 1993a.
3. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). (1993b). NBR 12808 - Resíduos de Serviços de Saúde: Classificação. ABNT, Rio de Janeiro, Brasil, 2p; 1993b.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT; 2002.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Projeto Reforço à Reorganização do Sistema Único de Saúde (REFORSUS). Gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Brasília (DF); 2001.120p.
6. Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. “Cultura – Capítulo 4“. *In*: Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Centro de Referência Professor Hélio Fraga - CRPHF/SBPT, Rio de Janeiro, 3ª edição: 59-74. 2005.
7. Canini SR, Gir E, Hayashida M, Machado AA. Acidentes perfuro-cortantes entre trabalhadores de enfermagem de um hospital universitário do interior paulista. *Revista Latino Americana de Enfermagem* 2002; 10:172-8.
8. Carramenha, MML. Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Serviços de Saúde: uma contribuição para a avaliação do desempenho ambiental. [Dissertação de Mestrado]. Salvador. Departamento de Engenharia Ambiental da Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia; 2005.
9. Center of Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health & Human Services USA. Medical Waste Management in the Bioterrorism Era. Clinician Outreach and Communication Activity Clinician Briefing; 2005.
10. *Centro Panamericano de Engenharia Sanitária e Ciências do Ambiente*. Guia para o manejo interno de resíduos sólidos em estabelecimentos de Saúde/Tradução de Carol Castillo Argüello. – Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde, 64p; 1997.

11. Coad, A. *Managing Medical Wastes in Developing Countries*. WHO - World Health Organization, Genebra, Suíça, 33p; 1992.
12. Collins, CH, Kenedy, DA. The Microbiological Hazards of Municipal and Clinical Wastes. *Journal of Applied Bacteriology* 1992, 73:1-6.
13. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o Tratamento e a Disposição Final dos Resíduos de Serviços de Saúde, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 04 maio de 2005.
14. Environmental Protection Agency (EPA). *Code of Federal Regulations. Standards for the Tracking and Management of Medical Waste*. The Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, Washington DC, EUA, 1989; 353-390.
15. Ferreira, JA. “Resíduos sólidos e lixo hospitalar: uma discussão ética”. *Cadernos de Saúde Pública* 1995; 11(2), 314-320.
16. Ferreira, JA. “Lixo domiciliar e hospitalar: semelhanças e diferenças”. *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Rio de Janeiro, Brasil. 1999.
17. Ferreira, JA. “Gerenciamento e destino final de resíduos de serviços de saúde”. *Anais do IX SILUBESA – Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Porto Seguro, Brasil. 2000.
18. Ferreira, JA, Anjos, LA Aspectos de saúde coletiva e ocupacional associados à gestão dos Resíduos sólidos municipais. *Cadernos de Saúde Pública* 2001; 17:689-96.
19. Garcia, LP, Zanetti-Ramos, BG. Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde: Uma Questão de Biossegurança. *Cadernos de Saúde Pública* 2004; 20(3): 744-752.
20. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/default.shtm> (acessado em 10/jan/2007).
21. Leite, VD, Lopes, WS. Avaliação dos Aspectos Sociais, Econômicos e Ambientais Causados pelo Lixão da Cidade de Campina Grande. *In: IX Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Anais, CD-ROM IV*. Porto Seguro, Bahia: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2000.
22. Machado, NL, Moraes, LRS. RSSS: Revisitando as Soluções Adotadas no Brasil para Tratamento e Destino Final. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental* 2004; 9(1): 55-64.
23. Navarro, AM, Rodríguez, RC, Pavía, FF, Ibáñez, PI. Tecnologías de tratamiento de residuos solidos de establecimientos *de salud*. Programa de Fortalecimiento de Servicios de Salud – PSF. Disponível em: <http://www.cepis.ops-oms.org> (acessado em 05/mar/2009).

24. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). *Guia para o Manejo Interno de Resíduos Sólidos em Estabelecimentos de Saúde*. OPAS, Brasil, 1997, 64p.
25. Prüss, A, Giroult, E, Rushbrook, P. Safe management of wastes from health-care activities. Geneva: WHO. 1999.
26. Robazzi, MLC, Moriya, TM, Fávero, M, Pinto, PHD. Algumas considerações sobre o trabalho dos coletores de lixo. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 1992; 20:34-40.
27. Rutala, W, Odette, RL, Sansa, PG. Management of infectious waste by US hospitals. *JAMA*, 1989; 262 (12): 635-1639.
28. Rutala, WA, Weber, DJ. “Infectious waste – mismatch between science and policy”. *The New England Journal of Medicine* 1991; 325(8), 578-581.
29. Rutala, WA, Mayhall, CG. “Medical waste”. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1992; 13(1), 38-48.
30. Silva, ACN. Indicadores de Contaminação Ambiental e Diretrizes Técnicas para Disposição Final de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde: uma abordagem multidisciplinar [Dissertação de Mestrado]. Brasília. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília, 2001.
31. Silva, ACN, Bernardes, RS, Moraes, LRS, Parente dos Reis, JA. Critérios adotados para seleção de indicadores de contaminação ambiental relacionados aos resíduos sólidos de serviços de saúde: uma proposta de avaliação. *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 18(5):1401-1409.
32. Souza A. Risco biológico e biossegurança no cotidiano de enfermeiros e auxiliares de enfermagem [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2000.
33. United Nations Environment Program (UNEP). *Technical Guideline on the Environmentally of Biomedical and Healthcare Waste*. Genebra, Suíça, 1999, 69p.
34. United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Environmental Protection Agency Guide for infectious waste management*. Report. Washington. 1986.
35. United States Environmental Protection Agency (USEPA). *Guides to pollution prevention: selected hospital waste streams*; Report. Cincinnati. 1990.
36. World Health Organization. *Management Waste from Hospital*, Bergin, 1983. Report Bergin, 28 jul.,1983 ( Euro Reports and Studies 1997).
37. Zabala, M. *Manual para el manejo de desechos en establecimientos de salud*. Fundacion Natura/ Comité Interinstitucional para el manejo de *desechos hospitalarios*. Disponível em:

<http://www.bvsde.paho.org/bvsair/e/repindex/rep162/guamane/manuma.html> (acessado em 18/dez/2007).

38. Zanon, U. “Infecções Hospitalares: mitos e fatos”. *Jornal Brasileiro de Medicina* 1989; 57 (2), 66-82.

39. Zanon, U. “Riscos infecciosos imputados ao lixo hospitalar: realidade epidemiológica ou ficção sanitária?”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1990; 23(3), 163-170.

40. Zepeda, F. *El Manejo de Residuos Solidos Municipales En America Latina y El Caribe*. Washington, DC: *Organización Panamericana de la Salud*. 1995.

*DESINFECÇÃO DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROVENIENTES DE ISOLADOS CLÍNICOS DE INDIVÍDUOS COM TUBERCULOSE*

*DISINFECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS ISOLATED FROM INDIVIDUALS WITH TUBERCULOSIS*

## RESUMO

O risco de infecção atribuído aos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) torna obrigatória a adoção do tratamento prévio dos materiais biológicos gerados, como forma de redução ou eliminação da carga microbiana. A presença de microorganismo patogênico nas frações infectantes dos RSS, depois dos processos de descontaminação biológica, amplia a importância das discussões técnico-científicas sobre o risco de infecção associado a estes materiais biológicos, dada à possibilidade de exposição humana e ambiental decorrente do descarte final e do seu gerenciamento por parte dos serviços de saúde. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a eficácia do processo de desinfecção química por Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2% na eliminação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de isolados clínicos de indivíduos com tuberculose, comparativamente ao método de esterilização clássico (Autoclave). A eficácia da desinfecção por NaClO foi avaliada segundo a inativação do microorganismo, que foi previamente cultivado e inoculado em meio *Loweinstein Jensen* durante o experimento. A concentração de cloro livre no desinfetante foi de 2%, estabelecendo-se os tempos de 30 minutos e 4 horas para contato das colônias de *M. tuberculosis* com o NaClO, e o quantitativo amostral de 65 isolados clínicos. Os resultados dos ensaios de desinfecção com NaClO 2% indicaram efetiva inativação do agente *Mycobacterium tuberculosis* nos isolados clínicos de indivíduos com baciloscopia positiva (+++), quando comparado à eficácia da esterilização por Autoclave.

**Palavras-chave:** Resíduos de Serviços de Saúde, *Mycobacterium tuberculosis*, Hipoclorito de Sódio, Autoclave, Desinfecção

## ABSTRACT

The risk of infection attributed to Healthcare Waste (HCW) has resulted in the compulsory adoption of pre-treatment of biological waste to reduce or eliminate its microbial load. The presence of pathogenic microorganisms in infectious material from HCW after biological decontamination highlights the importance of technical-scientific discussions, given the potential risk of exposure to humans and the environment following disposal and its management on the part of health services. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the chemical disinfection process using 2% sodium hypochlorite (NaOCl) in the elimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains from clinical isolates from individuals with tuberculosis, compared to the traditional sterilization method (autoclaving). The efficacy of disinfection by NaOCl was evaluated following the inactivation of the microorganism, which was previously cultured and inoculated in Lowenstein Jensen media during the experiment. The concentration of free chlorine in the disinfectant was 2%, exposure times of 30 minutes to 4 hours between NaClO and the *M. tuberculosis* colonies were chosen for 65 clinical isolates. The results of the disinfection assays using 2% NaOCl indicated there was effective inactivation of the *M. tuberculosis* agent in the clinical isolates from individuals positive for TB bacilli by microscopy (+++), when compared to the efficacy of sterilization by autoclaving.

**Keywords:** Healthcare Waste, *Mycobacterium tuberculosis*, sodium hypochlorite, autoclave, disinfection

## INTRODUÇÃO

Os resíduos gerados nos serviços de saúde (RSS), especificamente as suas frações infectantes devido à presença de agentes biológicos, apresentam risco potencial à saúde e ao meio ambiente por suas características de virulência, infectividade e concentração de patógenos<sup>2, 19, 32, 33</sup>.

Em função dos diferentes posicionamentos técnicos sobre a periculosidade e os riscos associados aos RSS, da ausência de evidências que comprovem que esses resíduos têm o potencial de infectar pessoas que desenvolvem atividades nos serviços de saúde<sup>14, 21, 31, 32, 41, 42,43</sup>, e da obrigatoriedade do gerenciamento de resíduos infectantes oriundos da assistência aos pacientes, vêm se adotando diretrizes obrigatórias para o tratamento prévio de resíduos ou materiais biológicos dos estabelecimentos de saúde, com o objetivo de reduzir ou eliminar a carga microbiana, e assim minimizar o risco de infecção associado a estes materiais<sup>1, 16, 17</sup>.

Quando se emprega o termo tratamento prévio, algumas definições são estabelecidas pelas normas nacionais e internacionais. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária<sup>1</sup> define como tratamento, o processo físico ou outros processos que vierem a ser validados para reduzir ou eliminar a carga microbiana em equipamento compatível com a inativação do agente, e ainda define como método tradicional a ser aplicado nos serviços de saúde, a esterilização a vapor - Autoclave.

Nos Estados Unidos da América, o Centro de Controle de Doenças (CDC/EUA)<sup>16</sup> destaca conceitos distintos associados aos termos “esterilização” e “desinfecção”. Quanto à definição do termo “esterilização” tem-se um processo que destrói ou elimina todas as formas de vida microbiana, utilizando-se de métodos físicos ou químicos fora da unidade geradora, e dentre os métodos tem-se o Autoclave; e, no que se refere à “desinfecção”, conceitua-se como um processo para eliminar a maioria ou todos os microorganismos patogênicos, exceto esporos bacterianos sobre objetos inanimados, e até recomenda-se a utilização de desinfetantes em soluções simples ou combinadas com outros agentes, entre os quais, tem-se a desinfecção química por Hipoclorito de Sódio (NaClO)(volume de solução entre 5,25%-6,15%).

Silva e Souza *et al.* (1998) destacam ainda que, usualmente no emprego do termo “descontaminação” se reporta apenas a primeira etapa de um processo de esterilização ou desinfecção, e como tal, denominado descontaminação prévia que além de tornar os materiais

médico-cirúrgicos seguros para o manuseio, reduz sensivelmente seu *bioburden*<sup>3</sup>, tornando a esterilização ou desinfecção com menor probabilidade de carrear material pirogênico.

Dentre as técnicas de tratamento de resíduos biológicos (Grupo A<sup>4</sup>) mais utilizadas nas práticas clínicas e laboratoriais, além do método de esterilização comum (Autoclave), tem-se a desinfecção química por adição de peróxido de hidrogênio, hipocloritos de sódio, ácidos, álcoois, compostos de amônio quaternário ou cetona e incineração, após a compactação ou trituração dos resíduos, se necessário<sup>3, 4, 11, 12, 13, 26, 30, 36, 37, 39, 40</sup>.

Há que se observar também que, na composição dos resíduos gerados em laboratório pode haver uma mistura de diferentes classes de resíduos: biológico, químico e radioativo; e, por isso, requer considerações especiais quanto aos métodos de tratamento a serem utilizados. O Comitê Nacional de Pesquisa Americano recomenda para o tratamento da mistura de resíduos biológicos e radioativos a esterilização térmica ou a vapor – Autoclave, considerando a avaliação do teste de eficiência do equipamento periodicamente, com observação da temperatura, quantidade de água, condições do material biológico e indicador biológico utilizado<sup>28, 29</sup>.

A descontaminação por NaClO de amostras biológicas e superfícies contaminadas, nas rotinas dos laboratórios clínicos e dos serviços de saúde, é também recomendado pelas normas nacional e internacional<sup>8, 9, 39</sup>, e alguns autores destacam a alta inativação de microorganismos pela desinfecção química por NaClO 2-12% comparado à esterilização por Autoclave<sup>39</sup>. Por outro lado, algumas pesquisas destacam a ineficiência do tratamento por Hipoclorito de Sódio 1% para materiais biológicos (seringas contaminadas com bactéria patogênica na presença de sangue)<sup>18</sup>, além das propriedades físicas e químicas do NaClO como a liberação de cloro gasoso quando entra em contato com algum tipo de ácido ou solução ácida, o seu uso por tempo limitado, e restrições quanto a sua reutilização por períodos longos<sup>5, 10</sup>.

Assim, considerando a necessidade de revisão das normas técnicas relativas ao tratamento de resíduos infectantes de *Mycobacterium tuberculosis* gerados nos serviços de saúde, o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do processo de desinfecção química por

---

<sup>3</sup> *Bioburden* – carga biológica, termo utilizado para designar a contaminação dos artigos médico-cirúrgicos durante o processo de fabricação ou após o uso (Silva e Souza *et al.*, 1998).

<sup>4</sup> Grupo A - resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração, podem apresentar risco de infecção (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 306/2004; e Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA, Resolução CONAMA n.º 358/2005).

Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2% na eliminação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de isolados clínicos de indivíduos com tuberculose, comparativamente à eficácia do método de esterilização clássico (Autoclave).

## METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental com dados e amostras biológicas de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos na rotina ambulatorial do Hospital Especializado Octavio Mangabeira - HEOM/SESAB, unidade de referência no tratamento de pneumopatias, como a Tuberculose, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Pesquisa em Pneumologia do Hospital Especializado Octavio Mangabeira (NUPEP/HEOM), do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia - LACEN/BA, e do Instituto de Saúde Coletiva/Universidade Federal da Bahia (ISC/UFBA).

### 1. Isolamento e identificação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Foram incluídas todas as amostras de escarro coletadas no Laboratório de Micobactérias do HEOM/SESAB, no período entre março e junho de 2008, provenientes de indivíduos com baciloscopia positiva (+++), totalizando 65 isolados clínicos. Nos meses de março a junho de 2008, foi realizado também o isolamento bacteriano referente ao diagnóstico diferencial para *M. tuberculosis* (cultura e identificação do agente patogênico) nos 65 isolados, no Setor de Micobacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia – LACEN/BA, referência na análise de amostras biológicas para investigação diagnóstica de doenças, obedecendo aos critérios padronizados de coleta e de manuseio, e as normas de segurança.

No Setor de Micobacteriologia do LACEN/BA, as amostras foram processadas pelo método Lauril Sulfato de Sódio, e concentradas por centrifugação<sup>8</sup>. Em seguida, um volume de 0,1 ml de cada sedimento foi inoculado em tubos com meio de cultura *Lowenstein Jensen* (LJ), que foram mantidos em estufa a 37°C por um período de até oito semanas, para acompanhamento do crescimento bacteriano. As cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram identificadas por meio de diluição das colônias em água destilada estéril na concentração 10<sup>-3</sup>, com posterior inoculação de 0,1 ml da diluição em meio de cultura LJ contendo as drogas ácido p-nitrobenzóico (PNB) e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), além da realização da análise morfológica das colônias e testes bioquímicos clássicos - produção de niacina e redução do nitrato<sup>9</sup>.

## 2. Desinfecção química com Hipoclorito de Sódio (NaOCl) 2% das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Para avaliação da desinfecção das cepas de *M. tuberculosis* foi utilizado o Hipoclorito de Sódio (NaClO), com controle interno de qualidade, conforme especificações do fabricante, e posterior validação por parte do LACEN-BA<sup>24</sup>.

Todas as etapas foram realizadas em câmara de fluxo laminar previamente higienizada, com garantia das condições assépticas pelo uso de material esterilizado, na lavagem das mãos, e no uso de equipamentos de proteção individual (EPI's).

A concentração de cloro livre aplicada no desinfetante químico NaClO foi de 2%, estabelecendo-se os tempos de 30 minutos e 4 horas para contato das colônias de *M. tuberculosis* com o NaClO, e o quantitativo amostral de 65 isolados clínicos.

Na primeira etapa do experimento, adicionou-se 3 ml de NaClO 2% em tubos de polipropileno estéreis de 15 ml, contendo pérolas de vidro. Em seguida, foi feita uma suspensão no NaClO 2%, com o maior número de colônias possíveis de *M. tuberculosis* crescidas em meio de cultura LJ.

Homogeneizou-se a suspensão bacteriana, e os tubos fechados ficaram em repouso nos tempos determinados para contato com o agente químico ( $t_1=30$  minutos e  $t_2=4$  horas).

Para o tempo estabelecido  $t_1=30$  minutos, inoculou-se 0,2 ml da suspensão bacteriana no meio de cultura LJ. Após a inoculação, as suspensões permaneceram em repouso de forma a completar às 4 horas. Destaca-se que, para o tempo estabelecido  $t_2=4$  horas, após 3 horas e 30 min de contato com o NaClO 2% adicionou-se uma alçada em cada tubo com colônias de *M. tuberculosis*, que permaneceram em contato por mais 30 minutos, para assim completar o tempo preconizado.

Após este período, centrifugou-se os tubos por 10 minutos a 3000 rpm, retirando-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se com 2 ml de água destilada estéril. Posteriormente, foi realizada a inoculação de 0,2 ml no meio de cultura LJ, sendo o inóculo distribuído por todo o meio e os tubos dispostos horizontalmente em bandejas por 48 horas em estufa a 37°C.

Na última etapa, os tubos foram organizados verticalmente e mantidos em estufa, e observados em até oito semanas para a verificação do crescimento de *M. tuberculosis* (com a leitura em unidades formadoras de colônias – UFC), e posteriormente foi avaliada a eficácia da desinfecção do NaClO 2% nos tempos determinados (Figura 1).

Figura 1

Tubos de cultura submetidos ao Hipoclorito de Sódio 2% e mantidos em estufa a 37°C (Tempos de Contato t1=30 minutos e t2=4 horas).



### 3. Esterilização em Autoclave de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Para avaliação da esterilização das cepas de *M. tuberculosis* foi utilizado o método referência – Equipamento Autoclave (AMC Horizontal, Ortossíntese, AC 127 L, Ano 2002), conforme as diretrizes da Central de Descontaminação do LACEN-BA <sup>(25)</sup>.

No que se refere ao desempenho do Autoclave foi definido a utilização de dois parâmetros: controle biológico (cepas de *Bacillus Stearothermophilus*), com monitoramento semanal, e o integrador químico, monitoramento diário.

Na fase de execução do experimento, foram utilizados o quantitativo total de 65 isolados clínicos, incluídos a partir das culturas de *M. tuberculosis* com crescimento confluyente de colônias, conforme descrito no delineamento do item 1 anteriormente apresentado.

Inicialmente, os tubos foram acondicionados em saco apropriado para Autoclavação, com volume total de 50 litros, tendo suas tampas levemente afrouxadas para permitir a entrada do vapor, e em seguida encaminhados ao processo de esterilização a 128°C (+/- 2°C) por 30 minutos (Figura 2). Destaca-se que o tempo definido de 30 minutos contemplou apenas a fase de esterilização, não abrangendo assim as fases de aquecimento, vácuo e de resfriamento do processo de Autoclavação.

Figura 2

Equipamento de Esterilização Térmica (Autoclave) utilizado para as culturas de *Mycobacterium tuberculosis*.



Finalmente, após a retirada do material submetido ao Autoclave, procedeu-se à realização de suspensão bacteriana em tubos de vidro contendo pérolas estéreis, com adição de 2 ml de água destilada estéril. Foi feita uma suspensão na água destilada com o maior número de colônias possíveis de *M. tuberculosis*.

Homogeneizou-se a suspensão bacteriana, e em seguida, um volume de 0,2 ml desta suspensão foi inoculado em tubos com meio de cultura LJ, que foram mantidas em estufa a 37°C por um período de até oito semanas, para acompanhamento do crescimento de *M. tuberculosis*.

O experimento com os processos de descontaminação (NaClO 2% e Autoclave) teve um delineamento seqüencial que constou de sete etapas (Figura 3), definidas com base na rotina laboratorial e ensaios realizados preliminarmente.

## RESULTADOS

Para a concentração de cloro livre aplicada no desinfetante químico NaClO de 2%, nos tempos determinados ( $t_1=30$  minutos e  $t_2=4$  horas), foi quantificado o número final de colônias de *M. tuberculosis*. No que se refere ao processo de esterilização por Autoclave buscou-se também avaliar a sua eficiência na inativação microbiana.

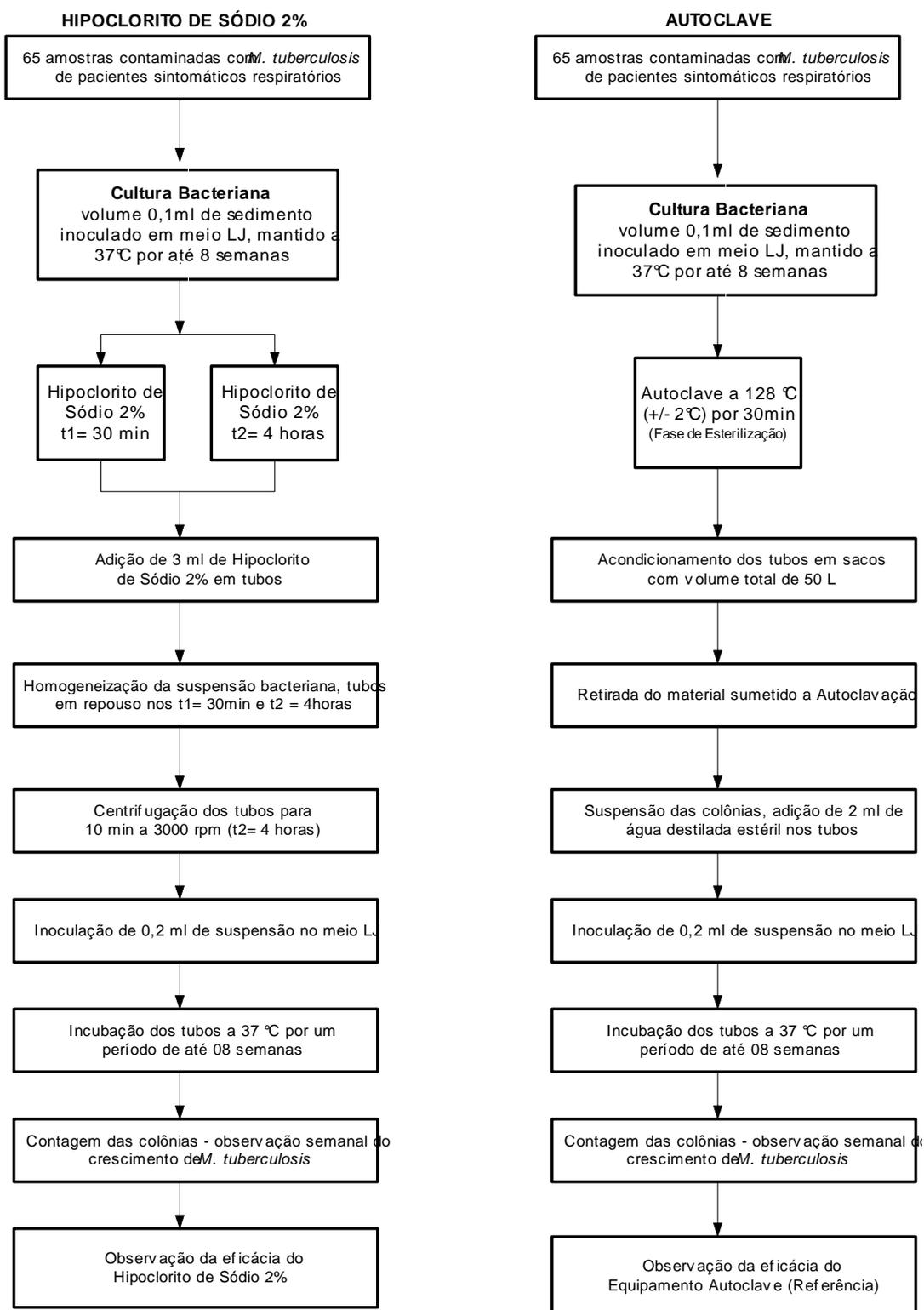
Os resultados demonstram a ausência de variabilidade quanto à inativação microbiana de *M. tuberculosis* entre os dois processos de descontaminação. Os 65 isolados clínicos quando submetidos ao contato com o desinfetante químico NaClO 2%, nos tempos anteriormente definidos, foi observada ausência de crescimento de *M. tuberculosis* em 100% dos meios de cultura. O mesmo quantitativo amostral foi submetido ao processo de esterilização por Autoclave, havendo também resultado negativo para a presença das cepas de *M. tuberculosis*.

Ao realizarmos a comparação entre a desinfecção por NaClO 2% e a esterilização por Autoclave (método referência), observou-se a alta capacidade de inativação do microorganismo *M. tuberculosis* com o desinfetante químico (NaClO 2%), com estes resultados obtidos experimentalmente (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre os processos de desinfecção por Hipoclorito de Sódio 2% e o de esterilização por Autoclave

		Hipoclorito de Sódio 2%		Total
		t1= 30 min	t2= 4 horas	
Autoclave (Método Referência)	65 isolados clínicos	65 isolados Clínicos	65 isolados Clínicos	100% inativação Microbiana
		100% inativação microbiana	100% inativação microbiana	

Figura 3. Fluxograma do delineamento do experimento.



## DISCUSSÃO

A utilização de métodos adequados de descontaminação (desinfecção e esterilização) tem sido preconizada por autores e normativos técnicos, pelo fato do risco de infecção associados ao ambiente e as rotinas de trabalho dos profissionais de saúde, a obrigatoriedade do tratamento prévio de resíduos infectantes dos serviços de saúde, e da resistência dos agentes microbianos aos processos de desinfecção, considerando inclusive a potencialidade dos patógenos na aquisição e disseminação de genes de resistência<sup>1, 16, 38,39</sup>.

As agências de saúde pública no Brasil e EUA e em outros países têm definido para a eliminação da carga microbiana de resíduos infectantes a esterilização por Autoclave, sendo amplamente utilizada dada a sua eficácia comprovada<sup>1, 15, 16, 18</sup>. A utilização do Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2% como desinfetante químico na rotina laboratorial e dos serviços de saúde, tem a sua recomendação também com base nas normas nacionais e internacionais<sup>6, 7, 8, 39</sup>, com o volume de solução deste agente químico entre 2-12%. Assim, na comparação entre os dois processos de descontaminação biológica, observou-se uma eficácia de 100% na inativação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de isolados clínicos no uso do desinfetante NaClO 2%. Este resultado reveste-se de importância para os serviços de saúde, para a descontaminação de amostras biológicas com *M. tuberculosis*, em função do caráter inovador na definição de uma alternativa mais simples e igualmente eficaz no tratamento prévio de resíduos infectantes a ser adotada no gerenciamento final pelos estabelecimentos de saúde.

A eliminação ou inativação microbiana dos resíduos infectantes gerados na assistência à saúde e no diagnóstico de doenças, dada à variedade de microrganismos patogênicos nesses materiais biológicos, tem favorecido a adoção de alternativas tecnológicas de tratamento, garantindo-se os critérios de confiabilidade e de eficácia. Em estudo realizado nos EUA, foi verificada a eficácia do Hipoclorito de Sódio na eliminação de microrganismos como *Escherichia coli* O157:H7 e *Helicobacter Pylori*<sup>38</sup>, demonstrando-se a atividade deste desinfetante químico na eliminação de diferentes agentes patogênicos.

Cabe destacar que, a escolha do NaClO fundamenta-se pelos gastos na sua aquisição, tendo custo inferior ao processo de esterilização por Autoclave, mas deve-se considerar a adoção de cuidados na compra deste agente químico e restrições no seu manuseio<sup>6, 11</sup>. Algumas recomendações técnicas também são direcionadas à melhor eficácia da desinfecção química (NaClO) de produtos e superfícies, onde fatores como o acúmulo de matéria orgânica e a luminosidade podem alterar a composição do produto devido à quebra de suas moléculas, limitando a ação do Hipoclorito de Sódio<sup>7, 8, 16, 34</sup>.

As cepas de *M. tuberculosis* provenientes de isolados clínicos em contato com a solução NaClO 2% (nos tempos estabelecidos durante o experimento) apresentaram ausência de crescimento bacteriano, demonstrando o elevado poder de eliminação deste desinfetante químico na eliminação do agente patogênico em todas as amostras com baciloscopia positiva (+++), destacando ainda o seu baixo custo de investimento e reduzida complexidade requerida para sua execução, devendo-se considerar durante o experimento o atendimento de critérios importantes, como o controle de qualidade do material, e especificamente, a concentração do cloro ativo, e a validação destes critérios pelo LACEN-BA.

Embora a literatura aponte para a eficiência do NaClO na eliminação de fungos e bactérias<sup>7, 20, 22, 27</sup>, tendo como principal vantagem a sua redução no tempo de eliminação dos agentes (10 minutos de contato com NaClO, após imersão em álcool 70%), além da adequada indicação deste produto para a desinfecção de nível médio de artigos e a descontaminação de superfícies<sup>23</sup>; o NaClO 2% é recomendado pelo Ministério da Saúde, e adotado nos laboratórios de saúde pública que manuseiam amostras biológicas, como processo de desinfecção<sup>6, 7</sup>, e ainda orienta-se a posterior esterilização por Autoclave de todo material biológico para o descarte adequado por parte dos serviços de saúde.

No presente estudo, os dados obtidos corroboram mais uma vez a eficácia da esterilização por Autoclave. No entanto, apesar da eficácia do processo desinfecção por NaClO 2% na eliminação das cepas de *M. tuberculosis*, comparada à esterilização por Autoclave, cabe destacar a existência de limitações no estudo, como, a utilização de uma pequena parcela das frações infectantes dos RSS (foi utilizado amostras de escarro), e o pequeno número de amostras, e ainda considerar à adequação de procedimentos da rotina laboratorial do LACEN/BA para a realização do experimento, conforme o Manual de Bacteriologia da Tuberculose<sup>8</sup>. Além do que, embora os resultados apresentem como vantagens, a rápida e simples intervenção do NaClO 2% na inativação do *M. tuberculosis*; há necessidade da realização de outros estudos para a comprovação da eficácia do desinfetante na presença de maior quantidade de matéria orgânica e de maior tamanho amostral, considerando inclusive a utilização de métodos de referência para testar a eficácia de desinfetantes químicos como o NaClO.

Com as limitações apresentadas, este estudo aponta para um desempenho favorável na utilização do desinfetante químico NaClO 2% na eliminação das cepas de *M. tuberculosis* presentes em materiais biológicos. Mas há que se considerar que, os resultados destacam também a responsabilidade dos gestores de serviços de saúde na definição de escolhas tecnológicas para o tratamento de resíduos infectantes, considerando a garantia da qualidade

dos processos de descontaminação (esterilização ou desinfecção) capazes de eliminar ou reduzir microrganismos patogênicos.

### **AGRADECIMENTOS**

Às equipes técnicas do Laboratório de Micobactérias do Hospital Especializado Octavio Mangabeira/Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (HEOM/SESAB) e do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia (LACEN-BA), que colaboraram significativamente nas etapas metodológicas desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada n.º 306, de 07 de Dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 10 de dezembro de 2004.
2. Associação Brasileira de Normas Técnicas(ABNT). NBR 12807 – Resíduos de Serviços de Saúde: Conceito. ABNT, Rio de Janeiro, Brasil, 3p, 1993.
3. Block, SS. Disinfection, sterilization, and preservation. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p.167-81. Peroxygen compounds. In: Silva e Souza, AC, Pereira, M S., Rodrigues, MAV. Descontaminação Prévia de Materiais Médico-Cirúrgicos: Estudo da Eficácia de Desinfetantes Químicos e Água e Sabão. Revista Latino-Americana de Enfermagem 1998; 6(3): 95-105.
4. Boatrigh, DT, Edwards, AJ, Shaver, KA. A comprehensive biomedical survey. *J Environ Health* 1993; 35(6): 19-26.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde. Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. 2ª. Edição: 17-23. 1994.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT. 2002.
7. Brasil. Ministério da Saúde. “Seção VII – Seção VIIA – Agentes Bacterianos“. In: Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília - DF, 3ª edição: 101-126. 2004.
8. Brasil. Ministério da Saúde//Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. “Cultura – Capítulo 4“. In: Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Centro de Referência Professor Hélio Fraga - CRPHF/SBPT, Rio de Janeiro, 3ª edição: 59-74. 2005.
9. Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. “Identificação das Espécies – Capítulo 5“. In: Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Centro de Referência Professor Hélio Fraga - CRPHF/SBPT, Rio de Janeiro, 3ª edição: 83-93. 2005.
10. Brasil, Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. [www.saude.gov.br/svs/tuberculose](http://www.saude.gov.br/svs/tuberculose) (acessado em 21/nov/2007).
11. Brasil. Secretária de Saúde do Distrito Federal. Desinfecção. In: Central de Material e

- Esterilização – Manual Técnico. Fundação Hospitalar do Distrito Federal: 23-26. 2000.
12. Bush OM, Kovaliczn RA, Santi V. Lixo hospitalar: normas de manuseio. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa. 1991.
  13. Byrns, G, Burke, T. Medical waste management implications for small medical facilities. *J Environ Health* 1992; 33(3): 11-9.
  14. Canini SR, Gir E, Hayashida M, Machado AA. Acidentes pérfuro-cortantes entre trabalhadores de enfermagem de um hospital universitário do interior paulista. *Revista Latino Americana de Enfermagem* 2002; 10:172-8.
  15. Cardoso, HV. Desinfecção de Gazes Contaminadas com Bactérias e Fungo pelo Forno Doméstico de Microondas. [Dissertação de Mestrado]. Criciúma - Santa Catarina: Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2008.
  16. Center of Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health & Human Services USA. Medical Waste Management in the Bioterrorism Era. Clinician Outreach and Communication Activity Clinician Briefing. 2005.
  17. Center of Disease Control and Prevention (CDC), Department of Health & Human Services USA. 2008. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities. [www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection\\_Nov\\_2008.pdf](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf) (acessado em 13/dez/2007).
  18. Chitnis, V, Chitnis, DS, Patil, S, Chitnis, S. Hypochlorite (1%) is inefficient in decontaminating blood containing hypodermic needles. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2002; 20(4): 215-218.
  19. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o Tratamento e a Disposição Final dos Resíduos de Serviços de Saúde. Diário Oficial da União, 01 outubro de 2001. 2005.
  20. De Souza, JB, Daniel, LA. Comparação entre Hipoclorito de Sódio e Ácido Peracético na Inativação de *E. Coli*, Colifagos e *C. Perfringens* em Água com elevada concentração de matéria orgânica. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental* 2005; 10(2): 111-117.
  21. Ferreira, JA, Anjos, LA Aspectos de saúde coletiva e ocupacional associados à gestão dos Resíduos sólidos municipais. *Cadernos de Saúde Pública* 2001; 17:689-96.
  22. Franco, C, Zeneta, DMT. Tuberculose em profissionais de saúde: medidas institucionais de prevenção e controle. *Arq Ciência Saúde* 2004; 11(4): 244-52.
  23. Freitas, VMC, Roriz, VC, Chiavini, PCR, Young, AAA, Bozzo, RO, Telles, EZ. Desinfecção e Esterilização em Ortodontia. *Revista Gaúcha de Odontologia – RGO* 2005; 53(4): 335-338.

24. Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Bahia – LACEN/BA. Procedimento Operacional Padrão para Determinação do Teor de Cloro Livre em Saneantes. 1ª Revisão: 2007, 4p.
25. Laboratório Central de Saúde Pública do Estado da Bahia– LACEN/BA. Procedimento Operacional Padrão para Autoclaves Automática Horizontal. 3ª Revisão: 2008, 64p.
26. Marchese, JM. Medical waste disposal. In: Hansen DJ, editor *The work environment: healthcare, laboratories and biosafety*. Boca Raton: Lewis Publishers 1993; v. 2, p. 151-68.
27. Martins-Corder, MP, Borges Júnior, CN. Desinfestação e Quebra de Dormência de Sementes de *Acacia mearnsii* DE WILD. *Ciência Florestal* 1999; 9(2): 1-7.
28. National Research Council (NRC). Committee on Environmental Epidemiology. *Environmental epidemiology: public health and hazardous waste*. Washington (DC): National Academy Press; 1991. In: Pedrozo, MFM. *Disposição de Resíduos Gerados em Laboratório: avaliação dos procedimentos adotados por três instituições públicas*. [Tese de Doutorado], Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Ambiental, São Paulo, SP, 293p; 2000.
29. National Research Council (NRC). Committee on Hazardous Substance in the Laboratory. *Prudent practices in the laboratory: handling and disposal of chemicals*. Washington (DC): National Academy Press; 1995. In: Pedrozo, MFM. *Disposição de Resíduos Gerados em Laboratório: avaliação dos procedimentos adotados por três instituições públicas*. [Tese de Doutorado], Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Ambiental, São Paulo, SP, 293p; 2000.
30. Pedrozo, MFM. *Disposição de Resíduos Gerados em Laboratório: avaliação dos procedimentos adotados por três instituições públicas*. [Tese de Doutorado], Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Ambiental, São Paulo, SP, 293p; 2000.
31. Robazzi, MLC, Moriya, TM, Fávero, M, Pinto, PHD. Algumas considerações sobre o trabalho dos coletores de lixo. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 1992; 20:34-40.
32. Silva, ACN. *Indicadores de Contaminação Ambiental e Diretrizes Técnicas para Disposição Final de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde: Uma Abordagem Multidisciplinar*. [Dissertação de Mestrado], Brasília: Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília; 2001.
33. Silva, ACN, Bernardes, RS, Moraes, LRS, Reis, JDP. *Critérios Adotados para Seleção de Indicadores de Contaminação Ambiental Relacionados aos Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde: Uma Proposta de Avaliação*. *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 18(5): 1401 – 1409.

34. Silva, LAF, Coelho, KL, Damasceno, AD, Nicolau, ES, Andrade, MA, Fioravanti, MCS, et al. Avaliação da concentração e do efeito sanitizante do hipoclorito de sódio em pedilúvio para bovinos. *Semina: Ciências Agrárias* 2007; 28(1): 89-96.
35. Silva e Souza, AC, Pereira, MS, Rodrigues, MAV. Descontaminação Prévia de Materiais Médico-Cirúrgicos: Estudo da Eficácia de Desinfetantes Químicos e Água e Sabão. *Revista Latino-Americana de Enfermagem* 1998; 6(3): 95-105.
36. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Environmental Protection Agency Guide for infectious waste management. Report. Washington. 1986.
37. United States Environmental Protection Agency (USEPA). Environmental Protection Agency. Guides to pollution prevention: selected hospital waste streams; Report. Cincinnati. 1990.
38. Weber, DJ, Rutala, WA. The emerging nosocomial pathogens *Cryptosporidium*, *Escherichia Coli* O157:H7, *Helicobacter Pylori*, and hepatitis C: epidemiology, environmental survival, efficacy of disinfection, and control measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22(5): 306-315.
39. World Health Organization, 1999. Safe management of wastes from health-care activities. Edited by Prüss, A, Giroult, E, Rushbrook, P. Geneva, 1999, 226p.
40. World Health Organization, 2004(Internet)  
<http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/index.asp?strSelectedCountry=BRA>  
(acessado em 02/abril/2007).
41. Zanon, U. “Infecções Hospitalares: mitos e fatos”. *Jornal Brasileiro de Medicina* 1989; 57 (2), 66-82.
42. Zanon, U. “Riscos infecciosos imputados ao lixo hospitalar: realidade epidemiológica ou ficção sanitária?”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1990; 23(3), 163-170.
43. Zepeda, F. *El Manejo de Residuos Solidos Municipales En America Latina y El Caribe*. Washington, DC: *Organización Panamericana de la Salud*. 1995.

***PERFIL DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ISOLADAS DE PACIENTES ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NA CIDADE DE SALVADOR, BAHIA***

***PROFILE OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS ATTENDING A REFERENCE HOSPITAL IN THE CITY OF SALVADOR, BAHIA***

## RESUMO

A caracterização microbiológica dos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) comprova a presença de microorganismos de interesse à saúde pública, como o *Mycobacterium tuberculosis*, e a importância de identificar propriedades deste agente patogênico (a infecção e a dinâmica de sua transmissão) relacionadas com materiais biológicos provenientes de pacientes com Tuberculose. O objetivo deste estudo foi identificar os fatores de risco para infecção por Tuberculose associados às cepas *cluster* do *M. tuberculosis* em isolados clínicos de indivíduos infectados de um hospital de referência, na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, através da técnica de tipagem molecular baseada na sequência *IS 6110* e análise exploratória dos dados. Durante o período de março a junho de 2008, foi realizada identificação de casos confirmados de tuberculose em 56 pacientes do hospital, com baciloscopia de escarro (++++) e cultura positiva de *M. tuberculosis*, posterior teste de identificação do agente e análise do perfil genético de todas as cepas pelo método *Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP-IS 6110*. Foi realizada análise bivariada com as variáveis independentes sexo, idade, etnicidade auto-referida, escolaridade, residência, esquema de tratamento, com a utilização do programa *STATA* versão 10.0., empregando-se modelo de regressão logística. Os isolados de *M. tuberculosis* foram classificados em cepas *cluster* e não *cluster*. Entre os 56 pacientes analisados, foram observados 39 isolados (69,64%) com padrão único e 17 isolados (30,36%) apresentaram padrões agrupáveis e formaram 7 *clusters*. A tipagem molecular de *M. tuberculosis* combinada com a análise exploratória dos dados permitiu caracterizar o perfil epidemiológico associado às cepas do agente, a partir dos isolados clínicos de pacientes infectados pelo bacilo, e verificar os possíveis fatores que mais influenciam a transmissão recente da doença.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, Tipagem Molecular, Epidemiologia, Transmissão, Saúde Pública

### ABSTRACT

The microbiological characterization of Healthcare Waste (HCW) has demonstrated the presence of microorganisms relevant to public health, such as *Mycobacterium tuberculosis* and the importance to identify the properties of this pathogenic agent (the infection and its transmission dynamics), related to biological material derived from patients with tuberculosis. The objective of this study was to identify risk factors for tuberculosis infection associated with the strains of *M. tuberculosis* in clinical isolates from infected individuals in a reference hospital in the city of Salvador, Bahia, Brazil, using molecular typing, based on the IS6110 sequence and an exploratory analysis of the data. During the period from March to June 2008 56 patients were identified and confirmed as tuberculosis cases, sputum positive for bacilli by microscopy and *M. tuberculosis* culture positive, followed by identification of the agent and analysis of the genetic profile of the strains by restriction length fragment polymorphism - RFLP/IS6110. Bivariate analysis using independent variables sex, age, self-declared ethnicity, education level, housing, treatment scheme, was carried out using STATA v10.0 and the logistic regression model. The *M. tuberculosis* isolates were classified into cluster or non-cluster strains. Among the 56 patients analysed, 39 (69.6%) isolates had a unique pattern and 17 (30.4%) isolates were grouped into 7 clusters. The molecular typing of *M. tuberculosis* combined with an exploratory analysis of the data allowed us to characterize the epidemiological profile associated with strains of the agent, from clinical isolates of patients infected with the bacillus, and to verify the possible factors that most influence the recent transmission of the disease.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, molecular typing, epidemiology, transmission, public health

## INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), doença infecto-contagiosa causada pelo agente *Mycobacterium tuberculosis*, voltou a ser considerada como problema de saúde pública. Em 2007<sup>49</sup>, a TB ainda se manteve com altas taxas de incidência, estimada em 9,27 milhões de casos novos no mundo, e com a mortalidade de 1,3 milhões de habitantes, ressaltando-se a necessidade da adoção de estratégias eficazes pelos serviços de saúde no seu diagnóstico, controle, e na epidemiologia desta doença.

A Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>49</sup> recomenda, dentre as estratégias para a redução da carga de TB, a ampliação de conhecimentos sobre a identificação da resistência de *M. tuberculosis* aos fármacos, da relação pobreza e populações vulneráveis à doença, e o incentivo à realização de pesquisas. No Brasil, registra-se 100 mil casos novos de TB por ano, ocupando a 18ª posição entre os países observados com 80% dos casos bacilíferos, sendo priorizado com ações de controle pela OMS dado o seu enquadramento entre os 22 países com maior carga de tuberculose no mundo<sup>29, 30, 49</sup>, e vem se observando também um crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)<sup>30,35,48</sup>. Em 2006, foram registrados 6,5 mil casos de tuberculose no estado da Bahia, e em m Salvador, 2,3 mil, onde a Bahia ocupa a 3ª posição em número absoluto de casos de TB<sup>8</sup>.

Sabe-se que, fatores sócio-econômicos (classe social, escolaridade, renda familiar, idade, raça) e etiológicos (resistência do agente aos medicamentos) estão relacionados ao desenvolvimento da TB. E destacadamente, estudos relatam uma forte associação negativa entre características socioeconômicas e a doença<sup>27,44</sup>; e outros demonstram ainda que, o aumento da pobreza, o número de desabrigados, a urbanização, a má nutrição e a perda da qualidade dos programas de controle da TB, vêm contribuindo para a alta incidência da doença<sup>31</sup>.

Por outro lado, cabe enfatizar a importância da identificação de fatores ambientais do *M. tuberculosis* determinantes da sua morbidade, e os Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) constituem-se como um problema sanitário, tendo a principal discussão centrada na possibilidade potencial de patogenicidade de suas frações infectantes. Dos estudos de caracterização microbiológica dos RSS, realizados no Brasil<sup>2,12,36</sup>, já foram comprovadas a presença de microorganismos de interesse à saúde pública, tendo no grupo das bactérias, *Escherichia coli*, *Salmonella typhosa*, *Pseudomonas aeruginosa* e *M. tuberculosis*, vírus – Hepatite A e B, e fungos – *Candida albicans*, destacando a importância destes resíduos na possível transmissão de doenças infecciosas.

Para as evidências microbiológicas nas frações infectantes dos RSS, outros estudos<sup>1,13,33,34,40,45</sup> têm também avaliado o risco de infecção pelo contato de profissionais (trabalhadores que manuseiam rejeitos, empregadores de limpeza, profissionais da assistência à saúde) com material biológico contaminado. Além do que, pesquisas<sup>21,34,41</sup> demonstram o tempo de residência ambiental de alguns microorganismos nos resíduos infectantes de serviços de saúde, como vírus da Hepatite B, C e o *M. tuberculosis*, favorecendo, inclusive, à avaliação de possíveis vias de transmissão de doenças infecciosas a partir do contato com estes resíduos.

Ressalta-se que, a presença do *M. tuberculosis* na massa dos RSS, evidencia ainda a importância de identificar propriedades deste agente patogênico, como a infecção e a dinâmica de sua transmissão, relacionadas com materiais biológicos provenientes de pacientes com TB. Estudos realizados no Brasil<sup>38</sup> abordam a escassez de conhecimento da caracterização microbiológica dos RSS, com metodologia de identificação de microrganismos indicadores de contaminação e do risco de infecção associado a estes resíduos.

Alguns autores argumentam que, as mudanças ocorridas nos padrões de transmissão do *M. tuberculosis* atribuem-se à prevalência da TB resistente às drogas associada com as baixas condições socioeconômicas dos indivíduos e a deficiência dos sistemas públicos de saúde, e, assume-se que a maioria dos casos de TB é resultante de reativação<sup>9, 39</sup>. Portanto, cabe destacar que a doença TB pode ter a manifestação tanto da forma primária da doença (primo-infecção) quanto da reativação de uma infecção latente adquirida no passado<sup>18, 22, 25</sup>.

Considerando-se ainda que, a TB ainda é uma das principais causas de morte em adultos por um agente infeccioso<sup>31</sup>, a preocupação em alguns países tem induzido à reformulação dos programas antituberculose com aplicação de medidas, como, o tratamento supervisionado, o investimento na descoberta de novas técnicas para acelerar o diagnóstico, e o uso da epidemiologia molecular em estudos de transmissão<sup>24, 39</sup>. Quanto à definição dos objetivos da epidemiologia molecular, alguns autores<sup>23, 28</sup> destacam desde a identificação de microrganismos responsáveis por doenças infecciosas, a sua rota de transmissão, até o uso de marcadores moleculares para descrever a distribuição de cepas em populações e verificar os fatores de risco de hospedeiros e parasitas, na dispersão da doença.

Diante da necessidade de melhor compreensão sobre a transmissão de TB, e a identificação de focos de contaminação dentro da população, tem sido amplo o uso combinado de técnicas de tipagem molecular de cepas de *M. tuberculosis* e a investigação epidemiológica convencional<sup>10, 17, 18, 31,39</sup>. O método padronizado para tipagem de espécies mais comumente aplicado é o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) que utiliza

o elemento de inserção IS6110 para análise de polimorfismo, e tem sido útil para diferenciação de cepas do agente, e no conhecimento da dinâmica de transmissão da TB, com a realização de diferentes tipos de estudos epidemiológicos<sup>10, 25, 39, 46</sup>.

Assim, dada à carência de conhecimento sobre a dinâmica de transmissão da TB em grupos de risco e o perfil epidemiológico associado às cepas de *M. tuberculosis*, na cidade de Salvador, Bahia, o presente estudo busca identificar os fatores de risco para infecção por Tuberculose associados às cepas *cluster* do agente em isolados clínicos de indivíduos infectados do Hospital Especializado Octavio Mangabeira, localizado na capital baiana.

## METODOLOGIA

### Pacientes e Isolados Clínicos

Trata-se de um estudo transversal, com amostragem de conveniência, sendo a população de estudo limitada aos casos confirmados de TB por meio da baciloscopia de escarro e cultura bacteriana, e da identificação do *M. tuberculosis*, realizadas em duas instituições de referência na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.

No Laboratório de Micobactérias do Hospital Especializado Octávio Mangabeira – HEOM/SESAB, unidade de referência no tratamento de pneumopatias, como a TB, foram coletadas 56 amostras de escarro de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, com resultados de baciloscopia positiva (+++), no período de março a junho de 2008. O diagnóstico diferencial para *M. tuberculosis* (cultura e identificação do agente patogênico), utilizando-se as 56 amostras dos pacientes anteriormente descritos, foi realizado no Setor de Micobacteriologia do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia – LACEN/BA, referência na análise de amostras biológicas para investigação diagnóstica de doenças, no mesmo período anteriormente descrito.

Os dados clínico-demográficos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos por meio da revisão dos prontuários médicos do HEOM/SESAB (Setor de Tisiologia, Setor de Triagem, Setor de Contas Médicas, Serviço de Arquivo Médico e Estatística – SAME e Programa de Controle de Tuberculose – PCT) e as Fichas de Notificação e Investigação de Casos de Tuberculose (Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN/MS) disponibilizadas pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia (DIVEP/SESAB).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Pesquisa em Pneumologia do Hospital Especializado Octavio Mangabeira (NUPEP/HEOM),

do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia - LACEN/BA, do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM)/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-BA), e do Instituto de Saúde Coletiva/Universidade Federal da Bahia (ISC/UFBA).

### Testes Laboratoriais

O isolamento bacteriano e o teste de identificação das 56 cepas de *M. tuberculosis* foram realizados no Setor de Micobacteriologia do LACEN/BA, obedecendo aos critérios padronizados de coleta e de manuseio do Ministério da Saúde, e o cumprimento das normas de segurança.

As amostras de escarro foram analisadas pelo método Lauril Sulfato de Sódio, e concentradas por centrifugação<sup>6</sup>. Posteriormente, um volume de 0,1 ml de cada sedimento foi inoculado em tubos com meio de cultura *Lowenstein Jensen* (LJ), que foram mantidos em estufa a 37°C por um período de até oito semanas, para acompanhamento do crescimento do *M. tuberculosis*.

As cepas de *M. tuberculosis* foram identificadas por meio de diluição das colônias em água destilada estéril na concentração  $10^{-3}$ , com posterior inoculação de 0,1 ml da diluição em meio de cultura LJ contendo as drogas ácido p-nitrobenzóico (PNB) e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH), além da realização de análise morfológica das colônias e testes bioquímicos clássicos - produção de niacina e redução do nitrato<sup>7</sup>.

### Análise de RFLP e Definições

A análise da tipagem molecular das cepas de *M. tuberculosis* foi realizada no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/Nível de Biossegurança III (NB3) do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM)/FIOCRUZ/BA.

Os 56 isolados clínicos de *M. tuberculosis* foram tipados pela técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), conforme o protocolo padronizado por *van Embden et al.*<sup>46</sup> baseado na sequência de inserção 6110, que permite a diferenciação de cepas do agente etiológico. Esta metodologia consiste na extração do DNA cromossomal de *M. Tuberculosis*, e posterior digestão com enzima de restrição *PvuII* e hibridização com uma sonda de 245pb da sequência *IS6110*. O perfil genético de cada cepa foi comparado e visualizado com o auxílio do programa *Gel Compar II* versão 4.0 para Windows (*Applied Maths*, Kortrijk, Bélgica). Houve a comparação visual entre os isolados e a cepa de referência *M. tuberculosis* 14323.

Todas as cepas com um coeficiente de similaridade maior do que 90% foram consideradas ser parte de uma “família”<sup>43</sup>. No sistema de tipagem molecular foi definido como premissa que, as cepas *cluster* são aquelas que apresentam o mesmo padrão de RFLP (número de bandas e posição do fragmento) em dois ou mais isolados de *M. tuberculosis*. Isolados cujo padrão RFLP foram distintamente diferentes de qualquer dos outros padrões identificados, foram considerados como único ou não *cluster*<sup>16</sup>.

Considera-se ainda que, a distinção das cepas de *M. tuberculosis* de acordo com o número de cópias e posição no cromossomo do elemento repetitivo *IS6110* fornece possível caracterização do tempo de infecção<sup>32</sup>, definiu-se assim que um isolado padrão *cluster* representa uma infecção adquirida recentemente, e um isolado padrão não *cluster* caracteriza-se por representar reativação de uma infecção adquirida no passado<sup>17, 46</sup>.

### **Análise dos Dados e Descrição das Variáveis**

Foi utilizada na análise epidemiológica, a abordagem exploratória dos dados para identificação de características sócio-econômicas e de tratamento da tuberculose de indivíduos infectados e a relação com os padrões de cepas do agente, com a utilização do programa *STATA* (*Statistics Data Analysis, College Station, Estados Unidos*) versão 7.0. A análise descritiva das variáveis categóricas consistiu de tabelas de frequência simples. Na análise bivariada foram calculadas Razões de Prevalência (RP) e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, empregando-se o Método de *Mantel-Haenszel*. O nível de significância (p-valor) estabelecido no modelo foi de 5 %.

As características sócio-econômicas e de tratamento dos pacientes foram analisadas com base nas variáveis independentes ou de exposição, assim descritas, definidas pelos fatores de risco conhecidos à ocorrência da TB e disponibilidade dos dados na pesquisa: sexo (1 – Masculino; 0 – Feminino), idade (1 – 30+; 0 – 18-29), etnicidade auto-referida (1 – Não Branca; 0 – Branca); escolaridade (1 – Analfabeto/Primário incompleto; 0 – Ginásio incompleto ou completo/ Colegial incompleto ou completo), residência em Salvador (1 – Não; 0 – Sim), esquema de tratamento (1 – Esquema III, tratamento das falências terapêuticas; 0 – Esquema I, tratamento dos casos novos) e os seus isolados de *M. tuberculosis* classificados em cepas *cluster* (1) e não *cluster* (0), como variáveis dependentes ou desfecho.

## RESULTADOS

Foram avaliados 56 pacientes com cultura confirmada de TB no período de março a junho de 2008, cujas cepas foram isoladas e identificadas como *M. tuberculosis*, e todos os isolados clínicos submetidos à análise de RFLP-IS 6110 entre os meses de fevereiro e março de 2009.

### Características dos Pacientes

As características sócio-econômicas e de tratamento dos pacientes foram descritas com base nas variáveis preditoras ou independentes e suas respectivas frequência simples (Tabela 1). Observa-se, dentre os 56 pacientes, a maioria do sexo masculino (71,43 %), idade acima de 30 anos (68,75%), etnicidade auto-referida - raça não branca (80,00%), nível educacional - analfabeto e primário incompleto (63,89%), 25% não residentes em Salvador e 23,40% realizaram esquema de tratamento tipo III.

A idade dos pacientes variou de 18 a 82 anos, e a média da idade foi de 42.94 ( $\pm 18.53$ ). A média da idade para o sexo masculino (42,5 anos) foi menor do que a do sexo feminino (44,25) anos (dados não apresentados).

### Análise dos Fatores Associados

A Tabela 2 apresenta a análise estatística de potenciais fatores de risco associados à transmissão recente de TB (cepas *cluster*) em pacientes infectados. Verifica-se que, há maior distribuição percentual dos indivíduos pertencentes às cepas não *cluster* (69,64%), sugerindo o desenvolvimento de TB proveniente de reativação de uma infecção latente. As proporções de cepas *cluster* e não *cluster* diferem significativamente entre as variáveis preditoras, devido a existência de dados ignorados.

A média de idade dos pacientes que desenvolveram TB devido à transmissão recente (cepas *cluster*) foi de 52 anos ( $\pm 22,21$ ), e por reativação (cepas não *cluster*), 40,24 anos ( $\pm 16,70$ ). Não houve diferença significativa entre as médias de idade dos pacientes entre os grupos *cluster* e não *cluster* (dados não apresentados).

Note-se ainda que, na Tabela 2 há associação positiva entre todas as variáveis preditoras com a recente transmissão da doença (cepas *cluster*), onde a probabilidade de cepas pertencerem a *cluster* foi três vezes maior no grupo de etnicidade não branca (RP = 3,00, 95% IC 0,46-19,35), e de duas vezes maior no grupo do sexo masculino (RP = 1,87, 95% IC 0,62-5,63), com idade acima de 30 anos (RP = 1,66, 95% IC 0,54-5,11), nível educacional – analfabeto/primário incompleto (RP = 1,70, 95% IC 0,55-5,17) e também por não residir em

Salvador (RP = 1,67, 95% IC 0,69-4,00), embora não tenha sido identificada associação estatisticamente significativa entre as características sócio-econômicas e de tratamento com os isolados em *cluster*.

### **Genotipagem**

Dos 56 pacientes analisados, houve a identificação de 46 padrões de bandas distintos, sendo 39 isolados (69,64%) com padrão único e 17 isolados (30,36%) apresentaram padrões agrupáveis. No total, todos os isolados apresentaram 2 a 16 cópias de *IS 6110*, sendo que somente 10,7% tiveram 6 ou menos cópias deste elemento repetitivo, do total de amostras analisadas. A média e a moda foram de, respectivamente, 10,82 e 10 cópias de *IS 6110* por isolado.

Foram consideradas cepas *cluster*, os isolados que apresentaram um coeficiente de similaridade maior do que 90%. Dos 56 isolados de *M. tuberculosis* analisados, 17 isolados formaram 7 *cluster* distintos, denominados CL I, CL II, CL III, CL IV, CL V, CL VI e CL VII. Cada um dos *cluster* foi composto por 02 isolados, exceto o CL4 constituído de 05 isolados (Figura 1). Entre os pacientes estudados, pode-se observar a distribuição geográfica dos casos de infecção recente e reativação da TB em diferentes bairros da capital, região metropolitana de Salvador e cidades do interior do estado da Bahia.

Tabela 1

Características dos indivíduos infectados com Tuberculose, de acordo com as variáveis preditoras. Salvador, Bahia, Brasil, 2008 (N<sup>a</sup> = 56).

<b>Variáveis Preditoras<sup>b</sup></b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
1 – Masculino	40	71,43
0 – Feminino	16	28,57
<b>Idade</b>		
1 – 30 +	33	68,75
0 – 18-29	15	31,25
<b>Etnicidade Auto-Referida</b>		
1 – Não branca	28	80,00
0 – Branca	7	20,00
<b>Nível Educacional<sup>c</sup></b>		
1 – Analfabeto/Primário incompleto	23	63,89
0 – Ginásio incompleto ou completo/ Colegial incompleto ou completo	13	36,11
<b>Residência em Salvador</b>		
1 – Não	12	25,00
0 – Sim	36	75,00
<b>Esquema de Tratamento</b>		
1 – Esquema III (tratamento das falências terapêuticas)	11	23,40
0 – Esquema I (casos novos de TB)	36	76,60

<sup>a</sup>Total varia conforme a disponibilidade dos dados

<sup>b</sup> Dados ignorados: Idade (8 dados ignorados); Etnicidade Auto-Referida (21 dados ignorados); Nível educacional (20 dados ignorados); Residência em Salvador (8 dados ignorados); Esquema de tratamento (9 dados ignorados).

<sup>c</sup> Classificação adotada nas Fichas de Notificação e Investigação de Casos de Tuberculose (SINAN/MS).

Tabela 2

Análise bivariada da associação entre as variáveis preditoras e o padrão RFLP (*cluster* e não *cluster*) dos isolados de *M. tuberculosis* de pacientes infectados com Tuberculose. Salvador, Bahia, Brasil, 2008 (N = 56).

<b>Variáveis Preditoras</b>	<b>Cluster</b> (%) (N = 17)	<b>Não Cluster</b> (%) (N = 39)	<b>Total (%)</b> <b>N = 56</b>	<b>RP<sup>a</sup></b>	<b>95% IC<sup>a</sup></b>
<b>Sexo</b>					
1 – Masculino	14 (35,00)	26 (65,00)	40 (71,43)	1,87	0,62-5,63
0 – Feminino	3 (18,75)	13 (81,25)	16 (28,57)	1,00	
<b>Idade</b>					
1 – 30 +	11 (33,33)	22 (66,67)	33 (68,75)	1,67	0,54-5,11
0 – 18-29	3 (20,00)	12 (80,00)	15 (31,25)	1,00	
<b>Etnicidade Auto-Referida</b>					
1 – Não branca	12 (42,86)	16 (57,14)	28 (80,00)	3,00	0,46-19,35
0 – Branca	1 (14,29)	6 (85,71)	7 (20,00)	1,00	
<b>Nível Educacional<sup>c</sup></b>					
1 – Analfabeto/ Primário incompleto	9 (39,13)	14 (60,87)	23 (63,89)	1,70	0,56-5,17
0 – Ginásio incompleto ou completo/ Colegial incompleto ou completo	3 (23,08)	10 (76,92)	13 (36,11)	1,00	
<b>Residência em Salvador</b>					
1 – Não	5 (41,67)	7 (58,33)	12 (25,00)	1,67	0,69-4,00
0 – Sim	9 (25,00)	27 (75,00)	36 (75,00)	1,00	
<b>Esquema de Tratamento</b>					
1 – Esquema III (falências terapêuticas)	4 (36,36)	7 (63,64)	11 (23,40)	1,31	0,51-3,36
0 – Esquema I (casos novos de TB)	10 (27,78)	26 (72,22)	36 (76,60)	1,00	

RP, razão de prevalência; IC, intervalo de confiança

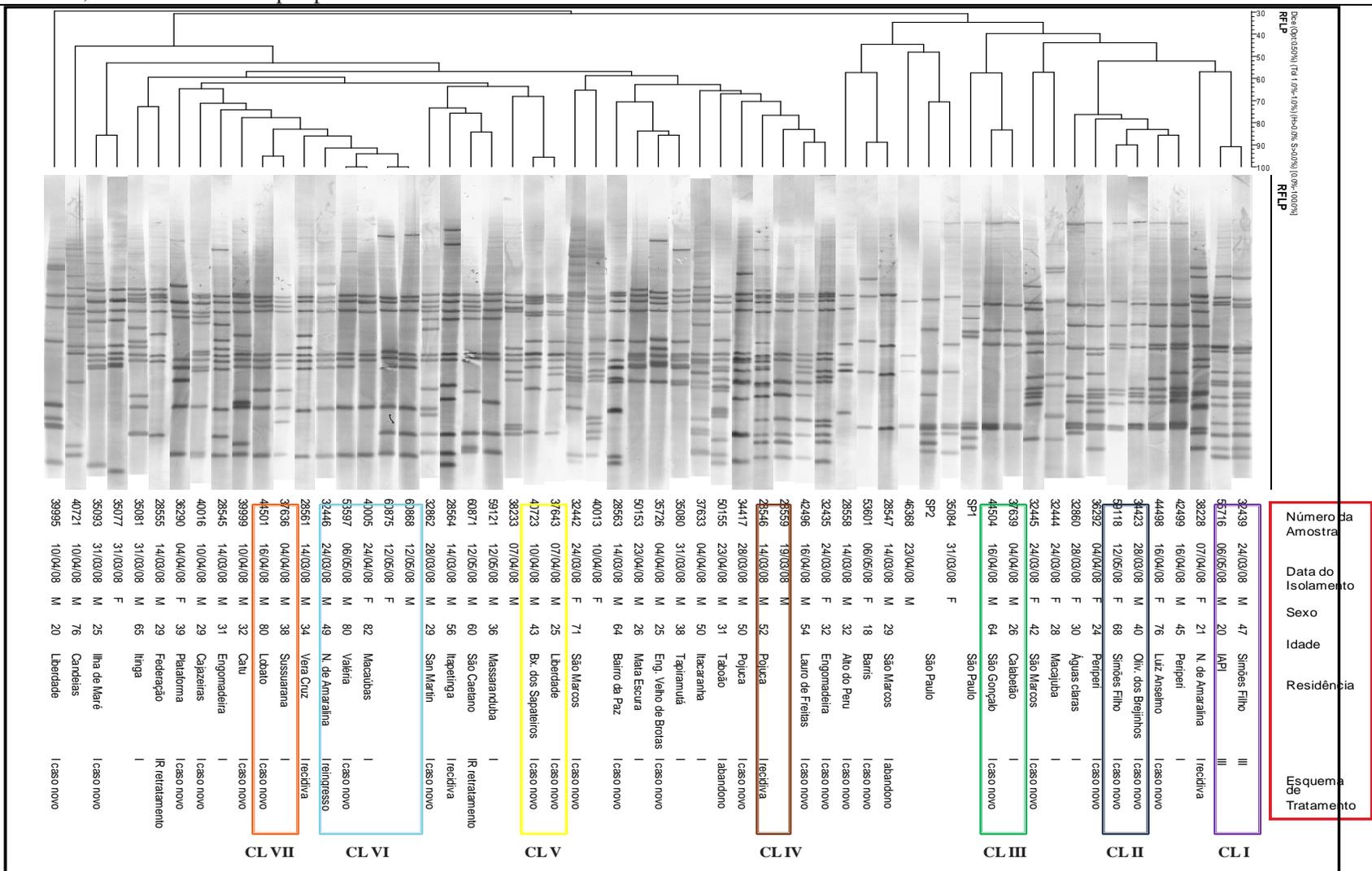
<sup>a</sup> RP e IC foram calculados excluindo os dados ignorados.

<sup>b</sup> Dados ignorados: Idade (8 dados ignorados); Etnicidade Auto-Referida (21 dados ignorados); Nível educacional (20 dados ignorados); Residência em Salvador (8 dados ignorados); Esquema de tratamento (9 dados ignorados).

<sup>c</sup> Classificação adotada nas Fichas de Notificação e Investigação de Casos de Tuberculose (SINAN/MS).

Figura 1

Dendograma representando os diferentes padrões de RFLP encontrados em isolados de *M. tuberculosis* de pacientes atendidos no HEOM, segundo número da amostra, data do isolamento, sexo, idade, residência e esquema de tratamento. Os *cluster* foram denominados CL I, CL II, CL III, CL IV, CL V, CL VI, CL VII. SP1, SP2: Padrões de cepas pertencentes à família A encontrada em SP1<sup>12</sup>



## DISCUSSÃO

A literatura apresenta a existência de estudos sobre a caracterização microbiológica dos RSS<sup>1,2,3,12,33,34,36,37</sup> abordando a possibilidade de agravos à saúde humana e ambiental, associados a importantes patógenos (primários e secundários) nestes resíduos. Os resultados destes trabalhos indicam ainda que, diferentes microrganismos patogênicos (como as Hepatites B e C, e *Mycobacterium tuberculosis*) apresentam capacidade de persistência ambiental nas frações infectantes dos RSS, ressaltando os diferentes níveis de riscos à exposição biológica e do potencial de patogenicidade, quando prevalece o gerenciamento inadequado destes resíduos, no caráter intra e extra serviços de saúde.

Os dados apresentados nesta pesquisa, que podem ser descritos como um estudo inicial na caracterização do perfil epidemiológico das cepas de *M. tuberculosis* em isolados clínicos de pacientes infectados do Hospital Especializado Octavio Mangabeira, localizado na capital baiana, demonstram a importância dos métodos de tipagem nas investigações epidemiológicas. Cabe destacar que, estudos realizados em países desenvolvidos e em desenvolvimento apontam a relevância do uso combinado entre a tipagem molecular e a epidemiologia na dinâmica da transmissão de TB, com a identificação de subgrupos de risco, rastreamento geográfico da distribuição de clones de *M. tuberculosis* de importância para a saúde pública, favorecendo inclusive à definição de ações no controle da TB em áreas urbanas<sup>10, 15, 17, 31, 32, 39, 42</sup>.

Através da análise de tipagem molecular por RFLP- *IS6110* dos isolados de *M. tuberculosis*, este estudo encontrou uma proporção de *cluster* (possibilidade de infecção recente) de 30,36%, semelhante aos estudos realizados com isolados no Rio de Janeiro, Porto Alegre, Diferentes Regiões Geográficas do Brasil e São Paulo<sup>4, 11, 17, 42</sup>, que foram de 22%, 29,1%, 32% e 33%, respectivamente. Salientando que, a proporção de cepas *cluster* deste estudo pode ter sido subestimada devido ao tamanho da amostra e ao período de estudo relativamente curto.

E inclusive, alguns autores destacam que, a proporção do padrão *cluster* pode ser influenciada não só pela incidência como também a heterogeneidade da população, e a inclusão de hospitais e de pacientes no estudo, e contribuir assim na obtenção de uma estimativa mais acurada da infecção recente em uma dada comunidade<sup>15</sup>. Outras abordagens demonstram ainda que, a estimativa de *clusters* sempre será baseada na

amostragem de todos os casos de TB numa comunidade; e indicam ainda que, o aumento da fração amostral numa dada comunidade, a proporção “média” de ser encontrada como *clusters* também aumenta, considerando a existência de cuidados na interpretação dos resultados e de critérios, como, a forma de inclusão dos pacientes, o tempo de diagnóstico, e a fração amostral estudada<sup>19</sup>. Em função destas abordagens, verifica-se que os dados da estimativa de *cluster*, encontrados nesta pesquisa, sugerem a importância da continuidade deste trabalho, com a organização do banco de dados dos pacientes com TB pulmonar do Hospital de referência, submetendo-se todas as cepas isoladas à aplicação da técnica RFLP/IS6110, favorecendo a uma estimativa mais precisa da proporção de cepas *cluster* da cidade de Salvador.

Neste estudo, apesar da ausência de ligação epidemiológica entre os pacientes com cepas *cluster*, pois não foi possível realizar entrevistas com os pacientes na identificação de fontes comuns entre os indivíduos, como compartilhamento da mesma residência ou local de internação, e até a relação de parentesco; pôde-se verificar que a proporção de cepas não *cluster* foi de 69,64%, sugerindo a necessidade de esforços para o controle da TB direcionado ao conhecimento sobre a carga epidemiológica e com ações preventivas quanto a sua reativação. No Brasil, estudos recentes de epidemiologia molecular com o uso da técnica RFLP-IS6110<sup>14,17,26</sup>, apontam nos seus resultados agrupamentos genéticos similares associados a cepas *cluster* e adoecimentos originados de reinfecção exógena, sendo a maioria dos casos provenientes de antigos infectados representando em torno de 70% (cepas não *cluster*), demonstrando que no país a ocorrência de casos novos origina-se predominantemente de reativação endógena. Cabendo destacar que, os resultados descritos de outras regiões do país<sup>14,17,26</sup> foram bastante semelhantes aos observados neste estudo.

Verificou-se também que, os pacientes infectados com TB concentraram-se de forma heterogênea na capital, região metropolitana de Salvador e interior do estado da Bahia, dificultando inclusive a análise de ligação epidemiológica entre as cepas *cluster*, mas demonstrando a importância do conhecimento das localidades onde residem grupos populacionais com maior risco de apresentar a doença, seja por infecção recente ou reativação, mesmo considerando a população deste estudo limitada a um hospital de referência. Ressalte-se que, o método de tipagem baseada na sequência de inserção IS6110 possibilitou também uma descrição inicial da distribuição geográfica de cepas do *M.*

*tuberculosis* na população analisada, e até sinaliza a necessidade da realização de outros estudos que busquem a identificação de linhagens do agente patogênico de importância para a saúde pública, com propriedades particulares, como alta infectividade, virulência e resistência a drogas, na capital baiana.

Outro aspecto inerente às limitações do estudo refere-se a não ter sido encontrada associação estatisticamente significativa entre as variáveis preditoras (sexo, idade, etnicidade auto-referida, escolaridade, residência, esquema de tratamento) e a recente transmissão da doença, depois da análise bivariada. E algumas explicações para esta limitação, podem ser pelo fato do pequeno número de pacientes no estudo ou viés de seleção, além da presença de dados ignorados nas fichas de notificação e investigação de casos de TB, e a existência de lacuna de informações junto aos setores do hospital. Contudo, com base nesses resultados pode-se fazer algumas inferências, onde foi evidenciado que ser do sexo masculino, quase 72% dos pacientes, teve 1,87 vezes mais risco de desenvolver TB originado de infecção recente quando comparado ao sexo feminino; e alguns estudos têm reportado estes resultados<sup>20, 39</sup>. Os dados indicam ainda que, pacientes com idade acima de 30 anos, nível educacional (analfabeto/primário incompleto) e não residindo na cidade de Salvador têm duas vezes a possibilidade de pertencerem a cepas *cluster* (possibilidade de infecção recente).

Estudos conduzidos na América do Norte e Europa têm identificado múltiplos fatores associados com a TB, devido à infecção recente, incluindo idade jovem, integrantes de minorias étnicas, uso de drogas, alcoolismo e não possuem residência (moradores de rua)<sup>17, 39</sup>. E os resultados evidenciam a importância da análise de tipagem molecular de *M. tuberculosis* combinada com a epidemiologia para aprimorar o conhecimento da transmissão de TB, favorecendo inclusive a eficiência do programa de controle de doença na identificação de subgrupos de riscos da população, com transmissão de algumas cepas do agente<sup>39</sup>.

Apesar das limitações apresentadas neste estudo, foi observada grande diversidade entre as cepas de *M. tuberculosis* analisadas em indivíduos infectados de um hospital de referência, na cidade de Salvador. A abordagem utilizada pode apoiar as políticas de saúde pública na definição de ações preventivas e de controle no programa de TB pelos serviços

de saúde, quanto à dinâmica de transmissão da doença em subgrupos de risco, mesmo quando realizado a nível institucional.

### **AGRADECIMENTOS**

Às equipes técnicas do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Especializado Octavio Mangabeira/Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (HEOM/SESAB), do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz do Estado da Bahia (LACEN-BA), da Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Estado da Bahia/Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (DIVEP)/SESAB, e do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP)/Nível de Biossegurança III (NB3) do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz (CPqGM)/FIOCRUZ/BA, que muito colaboraram com as etapas metodológicas desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barros IP, Tipple AFV, Souza ACS, Pereira MS. Resíduos biológicos nos Institutos de Medicina Legal de Goiás: implicações para os trabalhadores. *Revista Eletrônica de Enfermagem* 2006; 8(3):317-25.
2. Bidonne, FRA, Souza, LF, Machado, RM. Microorganismos de interesse em saúde pública pesquisados em percolado de aterro sanitário de codisposição de resíduos sólidos de serviços de saúde com resíduos sólidos urbanos. *Anais do XXVII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, 2000, Porto Alegre, Brasil.
3. Bond, WW, Favero, MS, Petersen, NJ, Gravelle, CR, Ebert, JW, Maynard, JE. Survival of hepatitis B virus after drying and storage for one week. *Lancet* 1981; 1:550-551.
4. Borges, M, Cafrune, PI, Possuelo, LG, Valim, ARM, Ribeiro, MO, Rossetti, MLR. Análise molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de um centro de saúde ambulatorial em Porto Alegre. *J Bras Pneumol* 2004; 30(4): 448-54.
5. Braden, CR, Morlock, GP, Woodley, CL, Johnson, KR, Colombel, AC, Cave, MD. Simultaneous infection with multiple strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Infectious Disease* 2001; 33: 42-47.
6. Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. “Cultura – Capítulo 4“. *In: Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Centro de Referência Professor Hélio Fraga - CRPHF/SBPT, Rio de Janeiro, 3ª edição: 59-74. 2005.
7. Brasil. Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Centro de Referência Prof. Hélio Fraga/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. 2005. “Identificação das Espécies – Capítulo 5“. *In: Manual de Bacteriologia da Tuberculose*. Centro de Referência Professor Hélio Fraga - CRPHF/SBPT, Rio de Janeiro, 3ª edição: 83-93. 2005.
8. Brasil, Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde. 2006. [www.saude.gov.br/svs/tuberculose](http://www.saude.gov.br/svs/tuberculose) (acessado em 21/nov/2007).

9. Brudney, K, Dobkin, J. Resurgent tuberculosis in New York City: human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144:745-749.
10. Cafrune, PI, Riley, LW, Possuelo, LG, Valim, ARM, Borges, M, Ribeiro, MO, Rosseti, MLR, Zaha, A. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. *Journal of Infection* 2006; 53: 370-6.
11. Calusni, ALR, Roscani, GN, Villares, MC, Soini, H, Graviss, E, Ramos, MC. Restriction Fragment Polymorphism of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil; Evidence of International Distribution of Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:655-8.
12. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Resíduos hospitalares. *Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 1983; 176-202, Santa Catarina, Brasil.
13. Collins, CH, Kennedy, DA. Microbiological hazards of occupational needlestick and sharps injuries. *Journal of Applied Bacteriology* 1987; 62, 385-402.
14. Costa, HCG, Malaspina, AC, Mello, FAF, Leite, CQF. Ocorrência de tuberculose em um hospital psiquiátrico do interior de Goiás. *J Bras Pneumol* 2006; 32(6): 566-72.
15. Fandinho, FCO, Kritski, AL, Hofer, C, Conde Jr., H, Ferreira, RMC et al. RFLP patterns and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; 94: 271-275.
16. Farer, LS, Lowell, LM, Meador, MP. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *American Journal of Epidemiology* 1979; 109: 205-217.
17. Ferrazoli, L, Palaci, M, Marques, LRM, Jamal, LF, Afiune, JB, Chimara, E et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000, 4(1): 18-25.
18. Foxman, B, Riley, L. Molecular epidemiology: focus on infection. *American Journal Epidemiology* 2001; 153:1135-41.
19. Glynn, JR, Vynnycky, E, Fine, PEM. Influence of Sampling on Estimates of Clustering and Recent Transmission of Mycobacterium tuberculosis Derived from DNA Fingerprinting Techniques. *American Journal of Epidemiology* 1999; 149(4):366-371.

20. Gutiérrez, MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *Journal Clinical Microbiology* 1998; 36:486-92.
21. Johnson, RK, Braden, CR, Cairns, KL, Field, KW, Colombel, AC, Yang, Z, Woodley, CL, Morlock, GP, Weber, AM, Boudreau, AY, Bell, TA, Onorato, IM, Valway, SE, Stehr-Green, PA. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from medical waste. *JAMA* 2000; 284:1683-1688.
22. Leite, OHM. Tuberculose. *In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes* (A.W. Ferreira & S.L.M. Ávila), pp. 221-229, São Paulo: Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição. 2001.
23. Levin, BR, Lipsitch, M, Bonhoeffer M. Population biology, evolution, and infectious disease; convergence and synthesis. *Science* 1999; 283:806-9.
24. Lima, MM, Belluomini, M., Almeida, MMB, Arantes, GR. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. *Revista de Saúde Pública* 1997; 31(3): 217-220.
25. Martins, FAF. Epidemiologia Molecular das Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Isoladas de Pacientes que Frequentam o Ambulatório de Tisiologia do Hospital das Clínicas de Vitória – ES. [Dissertação de Mestrado], Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2002.
26. Mendes, JM, Machado, SMA, Lourenço, MC, Ferreira, RMC, Fonseca, LS, Saad, MHF. Diversidade molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* em uma região de favela da cidade do Rio de Janeiro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 2008; 34(12): 1063-1068.
27. Menezes, AMB, Da Costa, JD, Gonçalves, H, Morris, S. Incidência e fatores de risco para tuberculose em Pelotas, uma cidade do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 1998; 1(1): 50-60.
28. Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *American Journal Epidemiology* 2002; 155(6):565-71.
29. Natal, S, Valente, JG, Sanchez, AR, Penna, MLR. Resistência a isoniazida e rifampicina e história de tratamento anterior para tuberculose. *Cadernos de Saúde Pública* 2003; 19 (5):1277-1281.

30. Organização Mundial de Saúde. *Global Tuberculosis Control. WHO Report 2002* (on-line). Disponível na Internet na URL <http://www.who.int/gtb/publications/index.htm> [Links ] (acessado em 02/dez/2007).
31. Pandolfi, JR, Malaspina, AC, Santos, ACB, Suffys, P.N, Oellemann, MAC, Valentini, SR, Leite, CQF. *Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia*. Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada 2007; 28(3): 251 – 257.
32. Parissa-Farnier, Masjedi, MR, Varahram, M, Mirsaeidi, M, Ahmadi, M, Khazampour, M, Tabarsi et al. 2008. *The Recent-Transmission of Mycobacterium tuberculosis Strains among Iranian and Afghan Relapse Cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping*. BMC Infectious Diseases 2008; 109: 1-8.
33. Phillips, G. Microbiological aspects of clinical waste. *Journal of Hospital Infection* 1999; 41, 1-6.
34. Prüss, A, Giroult, E, Rushbrook, P. *Safe management of wastes from health-care activities*. Geneva: WHO. 1999.
35. Rozman, LM, Santo, AH, Rozman, MA. Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* às drogas em pacientes HIV+ em cinco municípios da Baixada Santista, São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 2007; 23(5): 1051-1059.
36. Silva, LTCV. *Caracterização do Resíduo Hospitalar: Uma Inferência a Patogenicidade*. [Dissertação de Mestrado], Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas; 1993.
37. Silva, ACN. *Indicadores de Contaminação Ambiental e Diretrizes Técnicas para Disposição Final de Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde: uma abordagem multidisciplinar* [Dissertação de Mestrado]. Brasília. Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Faculdade de Tecnologia da Universidade de Brasília, 2001.
38. Silva, ACN, Bernardes, RS, Moraes, LRS, Reis, JDP. *Critérios Adotados para Seleção de Indicadores de Contaminação Ambiental Relacionados aos Resíduos Sólidos de Serviços de Saúde: Uma Proposta de Avaliação*. *Cadernos de Saúde Pública* 2002; 18(5): 1401 – 1409.
39. Small, PM, Hopewell, PC, Singh, SP, Parsonnet, J, Ruston, DC, Schechter, GF et al. *The Epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using*

conventional and molecular methods. *The New England Journal Medicine* 1994; 330:1703-1709.

40. Souza A. Risco biológico e biossegurança no cotidiano de enfermeiros e auxiliares de enfermagem [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2000.

41. Suberkeropp, KF , Klug, MJ. 1974. *Microbial Ecology*. In: Rodrigues, E.A.C., Mendonça, J.S., Amarante, J.M.B., Alves Filho, M.B., Grinbaum, R.S. e Richtmann, R. (eds.) *Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle*. Sarvier, São Paulo, Brasil, 519-534.

42. Suffys, PN, Ivens De Araújo, ME, Rossetti, ML, Zaha, A, Barroso, EW, Barreto, AMW et al. Usefulness of IS6110- restriction fragment length polymorphism typing of Brazilian strains of *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with an international fingerprint database. *Res Microbiol* 2000; 151:343-51.

43. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 1997; 18(6), 426-39.

44. Tignor, MM. Socioeconomic factors in tuberculosis. *New England Journal Medicine* 1981; 304 – 431.

45. Turnberg, WL, Frost, F. Survey of occupational exposure of waste industry workers to infectious waste in Washington State. *American Journal of Public Health* 1990; 80(10).

46. Van Embden, JD, Cave, MD, Crawford, JT, Dale, JW, Eisenach, KD, Gicquel, B et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31 (2):406-9.

47. Van Soolingen, D, De Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PMA, Van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *M. tuberculosis*. *Journal Clinical Microbiology* 1993; 31:1987-1995.

48. World Health Organization, 2004  
<http://www.who.int/globalatlas/predefinedreports/tb/index.asp?strSelectedCountry=BRA>  
(acessado em 02/dez/2007).

49. World Health Organization. "Epidemiology" *In*: Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO report 2009. pp: 6-32.

## CONCLUSÕES

Propôs-se avaliar, no âmbito deste estudo, a importância do descarte final de resíduos infectantes por parte das unidades de saúde, dada a possibilidade de exposição humana e ambiental e do desenvolvimento de doenças entre os profissionais de saúde. Como objetivos, têm-se a revisão crítica da legislação e das normas internacionais e nacionais relacionadas ao tratamento obrigatório dos resíduos infectantes de serviços de saúde, a avaliação da inativação das cepas de *M. tuberculosis* de isolados clínicos submetidos ao processo de desinfecção química, e a contribuição das características socioeconômicas e de tratamento da tuberculose de indivíduos infectados no perfil de cepas isoladas.

No Artigo I, com a metodologia baseada na revisão crítica da literatura nacional e internacional relacionada ao tratamento obrigatório dos resíduos infectantes de serviços de saúde, foi possível avaliar os seguintes pontos:

- a significativa recomendação quanto ao uso de processos de esterilização térmica – Incineração e Autoclave, amparados em bases legais e normativas sobre RSS;
- o predomínio dos indicadores de controle de qualidade dos processos de esterilização térmica anteriormente citados, sendo que não foi identificada, nas orientações normativas, a utilização de outras medidas ambientais indicadoras da presença de contaminação ambiental;
- a observação da existência de limites normativos e técnicos para os estabelecimentos de saúde e prestadores de serviços acerca dos procedimentos a serem adotados na falta da definição de alternativas tecnológicas de tratamento para os resíduos infectantes gerados;
- a existência de estudos limitados sobre a possível associação entre as frações infectantes de RSS e saúde ocupacional, no Brasil;
- a necessidade da identificação de padronizações mais simples para o gerenciamento interno dos resíduos infectantes de serviços de saúde a ser implantada pelos municípios brasileiros;
- a necessidade de orientações normativas e legais sobre o tratamento de RSS que tenham como propósito a definição de escolhas tecnológicas de menor custo de implantação e de fácil controle operacional;

A partir dos resultados apresentados no Artigo II, conclui-se que na comparação entre os dois processos de descontaminação biológica – esterilização por Autoclave (referência) e a desinfecção química com Hipoclorito de Sódio (NaClO) 2% – observou-se uma alta eficácia na inativação das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* no uso do desinfetante NaClO 2%. Analisando os resultados, de forma geral, reveste-se de importância para os serviços de saúde, a eficácia do desinfetante químico NaClO 2% na eliminação das cepas de *M. tuberculosis* presentes em materiais biológicos, em função do caráter inovador na definição de uma alternativa mais simples e igualmente eficaz no tratamento prévio de resíduos infectantes a ser adotada no gerenciamento final pelos estabelecimentos de saúde. Contudo, há que se considerar a adoção de critérios adequados na sua aquisição e posterior uso pelos serviços de saúde.

Quanto aos resultados apresentados no Artigo III, apresenta-se uma visão geral da tuberculose na capital, região metropolitana de Salvador e interior do estado da Bahia, utilizando dados de epidemiologia e biologia molecular, permitindo a caracterização do perfil epidemiológico das cepas de *M. tuberculosis* em isolados clínicos de pacientes atendidos em um hospital de referência.

A partir da análise de tipagem molecular por RFLP- *IS6110* dos isolados de *M. tuberculosis* foi possível estimar a proporção de *cluster* (transmissão recente), com os resultados deste estudo semelhantes aos realizados com isolados no Rio de Janeiro, Porto Alegre, Diferentes Regiões Geográficas do Brasil e São Paulo.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre as variáveis preditoras analisadas (sexo, idade, etnicidade auto-referida, escolaridade, residência, esquema de tratamento) e a recente transmissão da doença (cepas *cluster*). Entretanto, pôde-se verificar que a proporção de cepas não *cluster* foi de 69,64%, sugerindo a necessidade de esforços para o controle da tuberculose direcionado ao conhecimento sobre a carga epidemiológica e com ações preventivas quanto a sua reativação.

Assim, os resultados apresentados nos artigos podem contribuir com a revisão do normativo técnico referente ao tratamento de resíduos infectantes de serviços de saúde, e apoiar na revisão de políticas públicas na definição de ações preventivas e de controle no programa de tuberculose pelos serviços de saúde.

**ANEXOS**

## ANÁLISE BIVARIADA – ARTIGO III

```
log: C:\Documents and Settings\Administrador\Desktop\bancoarti3.doc
log type: text
opened on: 18 Jun 2009, 23:47:16
```

```
. do "C:\DOCUME~1\ADMINI~1\CONFIG~1\Temp\STD01000000.tmp"
```

cluster1	Freq.	Percent	Cum.
nao/cluster	39	69.64	69.64
cluster	17	30.36	100.00
Total	56	100.00	

```
. **Analise bivariada
.
. tab sexo cluster1, row col chi exact
```

```
+-----+
| Key   |
|-----|
|       |
| frequency |
| row percentage |
| column percentage |
|-----+
+-----+
```

sexo	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
feminino	13	3	16
	81.25	18.75	100.00
	33.33	17.65	28.57
masculino	26	14	40
	65.00	35.00	100.00
	66.67	82.35	71.43
Total	39	17	56
	69.64	30.36	100.00
	100.00	100.00	100.00

```
Pearson chi2(1) = 1.4275 Pr = 0.232
Fisher's exact = 0.339
1-sided Fisher's exact = 0.193
```

```
. tab idade1 cluster1, row col chi exact
```

```
+-----+
```

```

| Key
|-----|
| frequency
| row percentage
| column percentage
|-----+

```

idade1	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
18-29	12	3	15
	80.00	20.00	100.00
	35.29	21.43	31.25
30-82	22	11	33
	66.67	33.33	100.00
	64.71	78.57	68.75
Total	34	14	48
	70.83	29.17	100.00
	100.00	100.00	100.00

```

Pearson chi2(1) = 0.8874 Pr = 0.346
Fisher's exact = 0.498
1-sided Fisher's exact = 0.279

```

```
. tab raça cluster1, row col chi exact
```

```

+-----+
| Key
|-----|
| frequency
| row percentage
| column percentage
|-----+

```

raça	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
naonegra	6	1	7
	85.71	14.29	100.00
	27.27	7.69	20.00
negra	16	12	28
	57.14	42.86	100.00
	72.73	92.31	80.00
Total	22	13	35
	62.86	37.14	100.00
	100.00	100.00	100.00

```

Pearson chi2(1) = 1.9580 Pr = 0.162
Fisher's exact = 0.220
1-sided Fisher's exact = 0.170

```

```
. tab escolaridadel cluster1, row col chi exact
```

```

+-----+
| Key   |
+-----+
|       |
| frequency |
| row percentage |
| column percentage |
+-----+

```

escolaridade1	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
3-4-5-6	10	3	13
	76.92	23.08	100.00
	41.67	25.00	36.11
anal/primarioincomp	14	9	23
	60.87	39.13	100.00
	58.33	75.00	63.89
Total	24	12	36
	66.67	33.33	100.00
	100.00	100.00	100.00

```

Pearson chi2(1) = 0.9632 Pr = 0.326
Fisher's exact = 0.468
1-sided Fisher's exact = 0.273

```

```
. tab tratamento1 cluster1, row col chi exact
```

```

+-----+
| Key   |
+-----+
|       |
| frequency |
| row percentage |
| column percentage |
+-----+

```

tratamento1	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
c.novo	26	10	36
	72.22	27.78	100.00
	78.79	71.43	76.60
rec/aban/fal	7	4	11
	63.64	36.36	100.00
	21.21	28.57	23.40
Total	33	14	47
	70.21	29.79	100.00
	100.00	100.00	100.00

```

Pearson chi2(1) = 0.2970 Pr = 0.586
Fisher's exact = 0.710
1-sided Fisher's exact = 0.423

```

```
. tab residencial cluster1, row col chi exact
```

Key
frequency
row percentage
column percentage

residencial	cluster1		Total
	nao/clust	cluster	
capital	27	9	36
	75.00	25.00	100.00
	79.41	64.29	75.00
interior/RMS	7	5	12
	58.33	41.67	100.00
	20.59	35.71	25.00
Total	34	14	48
	70.83	29.17	100.00
	100.00	100.00	100.00

Pearson chi2(1) = 1.2101 Pr = 0.271  
 Fisher's exact = 0.294  
 1-sided Fisher's exact = 0.228

.  
 . \*\*Analise bivariada com RP  
 .  
 . cs cluster1 sexo

	sexo		Total
	Exposed	Unexposed	
Cases	14	3	17
Noncases	26	13	39
Total	40	16	56
Risk	.35	.1875	.3035714
	Point estimate		[95% Conf. Interval]
Risk difference	.1625		-.079212 .404212
Risk ratio	1.866667		.6188978 5.630081
Attr. frac. ex.	.4642857		-.6157757 .8223826
Attr. frac. pop	.3823529		

chi2(1) = 1.43 Pr>chi2 = 0.2322

. cs cluster1 idade1

	idade1		Total
	Exposed	Unexposed	

	Cases	3	14
Noncases	22	12	34
Total	33	15	48
Risk	.3333333	.2	.2916667
	Point estimate		[95% Conf. Interval]
Risk difference	.1333333		-.1252087 .3918753
Risk ratio	1.666667		.5431196 5.114487
Attr. frac. ex.	.4		-.8412152 .804477
Attr. frac. pop	.3142857		
+-----+-----+-----+-----+			
	chi2(1) =		0.89 Pr>chi2 = 0.3462

. cs cluster1 raça

	raça		Total
	Exposed	Unexposed	
Cases	12	1	13
Noncases	16	6	22
Total	28	7	35
Risk	.4285714	.1428571	.3714286
	Point estimate		[95% Conf. Interval]
Risk difference	.2857143		-.03177 .6031986
Risk ratio	3		.4650151 19.35421
Attr. frac. ex.	.6666667		-1.150468 .9483317
Attr. frac. pop	.6153846		
+-----+-----+-----+-----+			
	chi2(1) =		1.96 Pr>chi2 = 0.1617

. cs cluster1 escolaridadel

	escolaridadel		Total
	Exposed	Unexposed	
Cases	9	3	12
Noncases	14	10	24
Total	23	13	36
Risk	.3913043	.2307692	.3333333
	Point estimate		[95% Conf. Interval]
Risk difference	.1605351		-.1431699 .4642402
Risk ratio	1.695652		.5556382 5.174655
Attr. frac. ex.	.4102564		-.7997321 .8067504
Attr. frac. pop	.3076923		
+-----+-----+-----+-----+			
	chi2(1) =		0.96 Pr>chi2 = 0.3264

```
. cs cluster1 tratamiento1
```

	tratamiento1		Total	
	Exposed	Unexposed		
Cases	4	10	14	
Noncases	7	26	33	
Total	11	36	47	
Risk	.3636364	.2777778	.2978723	
	Point estimate		[95% Conf. Interval]	
Risk difference	.0858586		-.233859	.4055762
Risk ratio	1.309091		.5100165	3.360125
Attr. frac. ex.	.2361111		-.9607209	.702392
Attr. frac. pop	.0674603			

```
chi2(1) = 0.30 Pr>chi2 = 0.5858
```

```
. cs cluster1 residencial
```

	residencial		Total	
	Exposed	Unexposed		
Cases	5	9	14	
Noncases	7	27	34	
Total	12	36	48	
Risk	.4166667	.25	.2916667	
	Point estimate		[95% Conf. Interval]	
Risk difference	.1666667		-.1460871	.4794204
Risk ratio	1.666667		.693713	4.004217
Attr. frac. ex.	.4		-.4415183	.7502633
Attr. frac. pop	.1428571			

```
chi2(1) = 1.21 Pr>chi2 = 0.2713
```

```
. log close
```

```
log: C:\Documents and
Settings\Administrador\Desktop\bancoarti3.doc
log type: text
closed on: 18 Jun 2009, 23:49:13
```