

Eficiência do Agar R2A na contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise

The efficiency of Reasoner'2 Agar for counting heterotrophic bacteria isolated from water for dialysis

RIALA6/1213

Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Tatiana Caldas PEREIRA, Adriana BUGNO*

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Controle de Esterilidade, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil
CEP 01246-902. e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Controle de Esterilidade

Recebido: 15.06.2009 – Aceito para publicação: 26.08.2009

RESUMO

Com o reconhecimento da má qualidade da água em causar potencial risco aos pacientes em tratamentos dialíticos, foram definidos os parâmetros de avaliação, entre os quais a contagem de bactérias heterotróficas. Considerando que a escolha dos meios de cultura e as condições de incubação utilizadas podem influenciar nos resultados da avaliação microbiológica da água tratada para diálise, este estudo realizou a análise da eficiência do ágar R2A para efetuar a contagem de bactérias heterotróficas. Foram analisadas 193 amostras de água tratada provenientes de clínicas de diálise do município de São Paulo e de Grande São Paulo, em que foram avaliadas diferentes temperaturas de incubação, bem como o desempenho analítico de ágar R2A em comparação ao teste realizado com ágar PCA. Não houve diferença significativa entre as contagens obtidas após a incubação por 96 horas a temperaturas de 23°C e 34°C. Entretanto, contagens significativamente maiores foram observadas em ágar R2A ($p < 0,02$), sendo este, portanto, mais adequado para a avaliação da qualidade de água tratada para diálise. Com a finalidade de minimizar os riscos ao paciente sob tratamento dialítico, recomenda-se o uso do teste em ágar R2A combinado com maior tempo de incubação, em função de sua maior sensibilidade, para a efetuar a contagem de bactérias heterotróficas em água tratada para diálise.

Palavras-chave. água para diálise, bactérias heterotróficas, ágar R2A, ágar PCA.

ABSTRACT

To detect the potential risk which may interfere on the quality of the water used for dialysis procedure, some assessment parameters have been established led to the definition of for its evaluation, such as the counting of heterotrophic bacteria. Considering that the chosen culture media and the incubation conditions may interfere on the results from microbiological analysis on water for dialysis, the present study evaluated the efficiency of R2A culture medium for performing the heterotrophic bacteria counting. A total of 193 samples of water collected from dialysis clinics located in the city of São Paulo and in other cities of the Grande São Paulo region were analyzed, and also the incubation temperature and the efficiency comparison on both R2A and PCA media were evaluated. No difference between bacteria counting on R2A medium after 96h-incubation at 24°C and 34°C was found. The highest bacteria counting was found on R2A medium ($p < 0.02$), which was considered to be mostly suitable for evaluating the water for dialysis. In order to minimize the risks to the patient under dialysis, the water for dialysis should be carried out by bacteria counting technique on R2A agar because of its high sensitivity, and incubating it for longer incubation times.

Key words. water for dialysis, heterotrophic bacteria, Reasoner'2 agar, Plate Count Agar.

INTRODUÇÃO

Hemodiálise consiste de procedimento terapêutico a pacientes portadores de insuficiência renal crônica, com objetivo de remover produtos de degradação metabólica e o excesso de água e sais minerais acumulados no organismo, em consequência de falência renal.

Pacientes portadores de doenças renais sob tratamento regular de hemodiálise são submetidos a três sessões semanais com duração de 3 a 4 horas. São expostos a aproximadamente 120L de água tratada a cada sessão¹⁻⁵, separados do sangue do paciente por membrana semipermeável, que pode permitir acesso direto de contaminantes eventualmente presentes na água^{4,6-9}. O monitoramento e a manutenção dos sistemas de tratamento da água são importantes para garantir a qualidade da água produzida e evitar riscos adicionais aos pacientes¹⁻¹², sendo que o reconhecimento do risco potencial resultou no estabelecimento de critérios e normas referentes aos parâmetros de especificação desta água por parte de vários órgãos e comissões internacionais, como a *European Pharmacopoeia* e a *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI)^{1,2,5,7,8,11,13,14} e, no Brasil, os critérios estabelecidos na Resolução RDC nº 154/2004¹⁵, os quais estabelecem que a contagem de bactérias heterotróficas deve ser menor que 200 UFC/mL.

Parâmetros microbiológicos de qualidade da água tratada foram definidos com intuito de prevenir a ocorrência de bacteremias e reações pirogênicas, considerando que a formação de biofilmes facilita a persistência microbiana no sistema e aumenta o risco de contaminação^{1-4,6-8,11-13,16}. Embora a membrana intacta do dialisador previna a contaminação do sangue com bactérias presentes no fluido de diálise, infecções podem ocorrer se houverem defeitos na integridade da membrana, se o nível de contaminação microbiana da água for elevado ou se ocorrer contaminação durante o processo de reuso dos dialisadores^{2,4,10,12,13,16}.

Os enfoques clássicos de enumeração de microorganismos em água incluem as técnicas de plaqueamento, filtração por membrana e determinação do número mais provável¹⁷. Como ocorre em qualquer técnica microbiológica, os resultados da enumeração de microorganismos são influenciados pelos meios de cultura empregados em combinação com as condições de incubação^{2,5,13-14,17-19}.

Existem dois tipos básicos de meios de cultura empregados em análises microbiológicas: aqueles que

apresentam alto conteúdo nutricional, como Agar caseína de soja (TSA) e Agar padrão para contagem (PCA), indicados para isolamento e enumeração de bactérias heterotróficas e bactérias isoladas de animais e humanos, e aqueles pouco nutrientes, como Agar Reasoner's 2A (R2A), que se destinam à detecção de bactérias oligotróficas de crescimento lento, além de bactérias heterotróficas com metabolismo adaptado a ambientes aquáticos e que requerem níveis baixos de nutrientes¹⁷⁻¹⁹. Técnicas analíticas que utilizam meios de cultura pouco nutrientes, associadas a períodos de incubação prolongados (5 a 7 dias) em temperaturas mais baixas (20 a 28 °C), demonstram ser mais sensíveis para determinar a contaminação microbiana em águas para consumo humano e em águas tratadas para diálise^{2,11,13-14,17,19-22}, embora meios de cultura mais nutrientes podem, eventualmente, melhorar sua capacidade de recuperação de micro-organismos quando utilizadas condições de incubação por períodos prolongados e temperaturas mais baixas¹⁹. As últimas edições da Farmacopeia Americana¹⁹ e da Farmacopeia Europeia recomendam a utilização de Agar R2A, com incubação a temperaturas entre 20 e 25 °C por 4 a 7 dias ou a temperaturas entre 30 a 35°C por 3 a 4 dias, para a enumeração de bactérias heterotróficas em água tratada.

Considerando a importância e a necessidade de avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada em centros de diálise, este estudo teve o objetivo de comparar a eficiência do Agar R2A em relação ao Agar PCA para a enumeração de bactérias heterotróficas em amostras de água tratada provenientes de diversas clínicas de diálise da cidade de São Paulo e em cidades da Grande São Paulo, coletadas no âmbito do Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade de Água Tratada para Diálise.

MATERIAL E MÉTODO

■ Desenho experimental

Neste estudo, foi realizada a comparação da enumeração de bactérias heterotróficas obtida em Agar R2A após incubação a temperaturas de 23°C e de 34°C (temperatura de referência), bem como a comparação da enumeração obtida entre os meios de cultura Agar R2A e Agar PCA (meio de cultura de referência).

■ Amostras

Foram avaliadas 193 amostras de água tratada coletadas em clínicas de diálise do município de São Paulo e cidades

da Grande São Paulo, durante o Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade da Água Tratada em Serviços de Diálise.

As amostras foram colhidas assepticamente após fluxo de dois a três minutos, conforme as orientações da instituição baseadas nas recomendações da *American Public Health Association* (APHA)²⁰, tendo sido transportadas em caixas isotérmicas ao laboratório, sem ultrapassar seis horas entre a coleta e o início das análises microbiológicas, executadas imediatamente após o recebimento das amostras.

■ Enumeração de bactérias heterotróficas

A técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*) foi executada conforme indicado em compêndios oficiais^{19,20}.

Para avaliar a eficiência do Agar R2A para enumerar bactérias heterotróficas nas amostras, após diferentes temperaturas de incubação, alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas, em quadruplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sendo adicionados 20,0 mL de Agar R2A fundido e resfriado a 45 °C às placas. Todas as placas foram homogeneizadas e, após solidificação do meio de cultura, duas placas foram incubadas a 34 ± 2°C e as outras duas a 23 ± 2°C, em posição invertida, por 96 horas. O mesmo procedimento foi executado com alíquotas de 0,1 mL de amostra.

Adicionalmente, alíquotas de 1,0 mL de amostra foram transferidas, em quadruplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sendo adicionados 20,0 mL de Agar R2A fundido e resfriado a 45 °C sobre duas placas e 20,0 mL de Agar PCA fundido e resfriado a 45 °C sobre outras duas placas. O mesmo procedimento foi executado com alíquotas de 0,1 mL de amostra. As placas foram homogeneizadas e após solidificação do meio de cultura, foram incubadas em posição invertida a 34 ± 2°C por 96 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias das contagens de bactérias heterotróficas/mL obtidas em cada tipo de meio de cultura avaliado e em cada temperatura de incubação foram calculadas para as amostras. Na avaliação estatística não foram consideradas as amostras que não apresentaram contagem bacteriana, que corresponderam a 17,56% das amostras incubadas a 24°C, 17,02% das incubadas a 34°C, 17,10% das amostras analisadas em Agar PCA e 6,22% em Agar R2A. Todos os

demais valores válidos para contagem bacteriana foram convertidos em escala logarítmica para que assumissem distribuição normal e cálculos estatísticos foram executados com o uso do software *SPSS 15.0 for Windows*, com intervalo de confiança de 95%.

Com o objetivo de comparar a eficiência para enumeração de bactérias heterotróficas nas amostras, foi realizado estudo de regressão linear, considerando as temperaturas de incubação utilizadas (Figura 1) e os meios de cultura avaliados (Figura 2).

Micro-organismos que podem se desenvolver em ambientes com condições extremas apresentam melhores resultados de cultivo em laboratório quando são incubados em condições que simulem tais ambientes, sendo que por esta razão, bactérias associadas à água tratada para diálise apresentam melhor desenvolvimento em meios

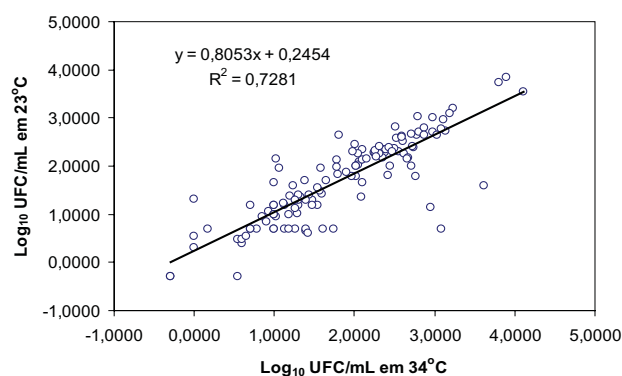


Figura 1. Representação gráfica de correlação entre as contagens de bactérias heterotróficas ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) obtidas para as temperaturas de incubação de 23°C e 34°C.

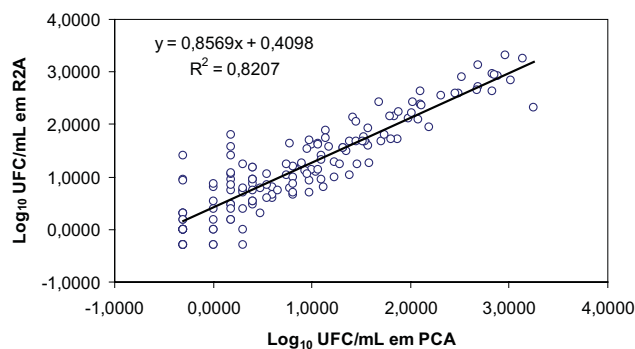


Figura 2. Representação gráfica de correlação entre as contagens de bactérias heterotróficas ($\text{Log}_{10}\text{UFC/mL}$) obtidas para os meios Agar R2A e Agar PCA, após 96 horas de incubação a 34°C.

de cultura pouco nutrientes, como Agar R2A, quando utilizado tempo de incubação superior às 48 horas e temperatura próxima a 25°C^{2, 7, 14, 17-19, 21-22}. Os resultados obtidos neste estudo indicaram alta correlação entre os logarítmicos das contagens obtidas após 96 horas de incubação a diferentes temperaturas ($r = 0,8558$, $p < 0,01$) e não haver diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas (t-Student $< 1,966$, $p = 0,746$), expressas em Log_{10} UFC/mL: 1,4718 ($\pm 1,1790$) para incubação a 23°C e 1,4366 ($\pm 1,0299$) para incubação a 34°C.

Considerando a avaliação da eficiência dos meios de cultura empregados, as médias obtidas na enumeração de bactérias heterotróficas, expressas em Log_{10} UFC/mL, foram 1,0421 ($\pm 0,8894$) em Agar R2A e 0,8349 ($\pm 0,9384$) em Agar PCA, sendo verificada diferença significativa entre as médias (t-Student $< 1,649$; $p = 0,018$), além de alta correlação entre os logarítmicos das contagens nos meios avaliados ($r = 0,9056$, $p < 0,01$). Em 81% das amostras analisadas, verificaram-se contagens de bactérias heterotróficas significativamente maiores em Agar R2A em relação às obtidas em Agar PCA.

Em adição à comparação da eficiência de enumeração, verificou-se o impacto da utilização dos meios de cultura na avaliação da qualidade de 193 amostras analisadas neste estudo, considerando-se o limite máximo preconizado na Resolução RDC 154/2004¹⁵, 200 UFC/mL. Contagens de bactérias heterotróficas superiores a 200 UFC/mL foram obtidas em 7,77% das amostras em Agar PCA e em 10,36% em Agar R2A. Seis amostras analisadas apresentaram contagens inferiores a 200 UFC/mL em Agar PCA mas superiores ao limite máximo quando utilizado o Agar R2A; somente uma amostra apresentou contagem superior ao limite máximo em Agar PCA e inferior a 200 UFC/mL em Agar R2A. Estes dados sugerem que o Agar PCA subestimou a contaminação bacteriana presente nas amostras e poderia erroneamente indicar o atendimento aos parâmetros microbiológicos definidos na legislação.

CONCLUSÃO

Para a avaliação da contaminação bacteriana em água tratada para diálise, meio de cultura pobre em nutrientes, como Agar R2A, ofereceu melhores resultados em relação ao Agar PCA, quando incubado a temperaturas de cerca de 34°C, por 96 horas. Para minimizar o risco ao paciente sob tratamento dialítico, recomendamos o uso do Agar

R2A combinado com períodos de incubação de 96 horas, para enumeração de bactérias heterotróficas em água para diálise, pois esse meio de cultura apresentou-se mais sensível.

REFERÊNCIAS

1. Arvanitidou M, Spaia S, Katsinas C, Pangidis P, Constantinidis T, Katsouyannopoulos V et al. Microbiological quality of water and dialysate in all haemodialysis centres of Greece. *Nephrol Dial Transplant*. 1988; 13: 949-54.
2. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 (suppl 7): vii21-5.
3. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão-Junior JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol*. 1996; 18 (2): 180-8.
4. Varo SD, Martins CHG, Cardoso MJO, Sartori FG, Montanari LB, Pires-Gonçalves RH. Isolamentos e fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Rev Soc Bras Med Tropical*. 2007; 40: 326-31.
5. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 666-75.
6. Brunet P, Berland Y. Water quality and complications of haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 578-80.
7. Gomila M, Gascó J, Busquets A, Gil J, Bernabeu R, Buades JM, et al. Identification of culturable bacteria present in haemodialysis water and fluid. *FEMS Microbiol Ecology*. 2005; 52: 101-14.
8. Hoenicke NA, Levin R. The implications of water quality in hemodialysis. *Semin Dial*. 2003; 16 (6): 492-7.
9. Hoenicke NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*. 2006; 24: 11-8.
10. Oie S, Kamiya A, Yoneda I, Uchiyama K, Tsuchida M, Takai K, et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J Hosp Infect*. 2003; 54: 115-9.
11. Pérez-García R, Rodríguez-Benitez POC. Why and how to monitor bacterial contamination of dialysate? *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15: 760-4.
12. Bugno A, Almodóvar, AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007; 66 (2): 172-5.
13. Lonnemann G. Assessment of the quality of dialysate. *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13 (suppl 5): 17-20.
14. van der Linde K, Lim BT, Rondeel JMM, Antonissen LPMT, de Jong GMT. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14, 2433-7.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº154, de 15 de jun. 2004 (versão republicada em 31 de mai. 2006). Estabelece o Regulamento Técnico para funcionamento dos Serviços de Diálise. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 31 mai. 2006. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22875&word>.

16. Archibald LK, Khoi NN, Jarvis WR, Reller LB, Cam PD, Thu TA, et al. Pyrogenic reactions in hemodialysis patients, Hanoi, Vietnam. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006; 27 (4): 424-6.
17. Reasoner DJ. Heterotrophic plate count methodology in the United States. *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 307-15.
18. Allen MJ, Edberg SC, Reasoner DJ. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 265-74.
19. United States Pharmacopeia (US). The United States Pharmacopeia. 31 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2008.
20. American Public Health Association (US). Standard Methods for the examination of Water and Wasterwater. Baltimore: United Book Press, Inc; 1998.
21. Carter JT, Rice EW, Buchberger SG, Lee Y. Relationships between levels of heterotrophic bacteria and water quality parameters in a drinking water distribution system. *Water Research*. 2000; 34 (5): 1495-502.
22. Uhl W, Schaule G. Establishment of HPC(R2A) for regrowth control in non-chlorinated distribution systems. *Int J Food Microbiol*. 2004; 92: 317-25.