
Segurança no uso do Colilert[®] para avaliação microbiológica da qualidade da água tratada para diálise

Fernando Pontes de Lima e SILVA¹, Maricélia Navarro Pinheiro FLORES², Ellen Gameiro HILINSKI¹, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR³

¹Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança – Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

²Núcleo de Ciências Biomédicas – Centro de Laboratório Regional X – Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto

³Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes – Instituto Adolfo Lutz – São Paulo

A presença de coliformes totais é um dos parâmetros exigidos para a avaliação da qualidade microbiológica da água tratada para diálise, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada N^o 11/2014¹. De acordo com o Quadro II, mencionado em seu Artigo 49, a água tratada pelo Sistema de Tratamento e Distribuição de Água para Hemodiálise deve apresentar ausência de coliformes totais em 10 mL como parte integrante do padrão de qualidade ideal para a sua aplicação nos serviços de diálise¹.

Para esta avaliação, emprega-se metodologia qualitativa, baseada na pesquisa de um organismo indicador e sua respectiva população, onde os resultados são expressos em termos de presença ou ausência de crescimento.

Uma das metodologias utilizadas para a comprovação da presença ou ausência de coliformes totais baseia-se na utilização de substratos cromogênicos, a qual detecta a existência de enzimas específicas na identificação de micro-organismos. Desta forma, meios de cultura líquidos contendo substratos cromogênicos são empregados para, de acordo com as atividades enzimáticas específicas para a detecção e diferenciação de micro-organismos, selecionar o micro-organismo alvo por meio da alteração de coloração da solução amostra

desencadeada pela metabolização dos indicadores presentes na composição do meio.

O substrato enzimático Colilert[®], cuja utilização é preconizada por compêndio oficial³, utiliza a metodologia do substrato definido para a detecção simultânea de coliformes totais e de *Escherichia coli*, com redução de 50 % do tempo de resposta frente à metodologia convencional. Os dois indicadores nutrientes, orto-nitro-fenil beta-d-galactopiranosideo (ONPG) e metilumbeliferil-beta-d-glicuronideo (MUG), são as principais fontes de carbono presentes no Colilert[®] e podem ser metabolizados pela enzima β -glucuronidase presente nas espécies de *E. coli*. À medida que os coliformes totais desenvolvem-se no Colilert[®], o ONPG presente no substrato é metabolizado pela β -galactosidase, resultando na alteração da coloração da solução amostra de incolor para amarela^{2,3}.

Como evidência de apropriada gestão do sistema da qualidade, os laboratórios devem atender aos requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025/2017⁴ para a seleção e desenvolvimento de métodos de ensaios, utilização de métodos não normalizados, bem como para a validação de métodos, a fim de garantir que os métodos de ensaio empregados conduzam à obtenção de resultados confiáveis e

adequados à qualidade pretendida. A implantação e utilização de métodos normalizados pelos laboratórios necessitam ser acompanhadas pela realização do estudo de verificação e neste caso, o laboratório deve demonstrar através de estudos experimentais que o método atende às exigências das aplicações analíticas e que possui, portanto, condições de executá-lo de maneira adequada dentro das condições específicas existentes em suas instalações⁵.

A utilização de métodos de ensaios normalizados para enumeração e detecção de micro-organismos em matrizes como alimentos, águas, cosméticos, saneantes, medicamentos e fármacos constitui importante ferramenta para determinação da qualidade microbiológica dos produtos sujeitos à regulação sanitária, sendo a confiabilidade dos resultados analíticos por eles obtidos assegurada através da avaliação do desempenho da metodologia utilizada, dentre outros procedimentos implantados para a garantia da qualidade. Para os métodos qualitativos, os parâmetros avaliados são especificidade, sensibilidade, precisão, taxa de falso-positivo e taxa de falso-negativo⁶.

Com o objetivo de realizar a verificação do método compendial preconizado por APHA (2017)³ para avaliação de amostras de água através do método do substrato cromogênico, os experimentos foram executados utilizando-se os micro-organismos “alvos”: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, representantes do grupo dos coliformes bem como *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, considerado neste estudo, como micro-organismo “não alvo”. Foram empregadas suspensões de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que correspondessem a uma variação entre 1 e 3 UFC/ μ L e suspensão de *Pseudomonas aeruginosa* que contivesse aproximadamente $1,0 \times 10^5$ UFC/100 μ L. Foram avaliados os parâmetros especificidade, robustez, precisão intermediária e limite de detecção.

A especificidade representa a capacidade do método em promover uma resposta positiva em meio aos diferentes micro-organismos que podem estar presentes em uma amostra. Em se tratando de métodos microbiológicos seletivos, a demonstração da especificidade também envolve o desafio com

micro-organismos que não são de interesse para o método sob avaliação, e que devem resultar na obtenção de resultados negativos. Foram realizados 40 experimentos conduzidos por dois diferentes analistas, para comprovar a ausência de interferência entre o substrato enzimático, os micro-organismos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e a matriz água purificada estéril, demonstrada pela presença de coloração amarela (para coliformes totais, representado pela *Klebsiella pneumoniae* – 12 replicatas); presença de coloração amarela e de fluorescência azul para a pesquisa de coliformes termotolerantes, representado pela *Escherichia coli* (12 replicatas) e a ausência de coloração no frasco contendo o micro-organismo *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas), bem como nos frascos contendo somente água purificada (04 replicatas). As replicatas que continham a mistura dos micro-organismos alvos e não alvo demonstraram: presença de coloração amarela e fluorescência azul no frasco contendo a mistura dos micro-organismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas) e presença de coloração amarela e ausência de fluorescência nos frascos contendo *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (04 replicatas). Pode-se afirmar que, no presente estudo os comportamentos observados demonstraram que o substrato enzimático foi capaz de promover o crescimento dos micro-organismos alvos, mesmo em misturas com possíveis interferentes. Adicionalmente, nenhuma das réplicas ensaiadas para a matriz água resultou em alteração de coloração, evidenciando a especificidade em não promover resultados falsos positivos após o período de incubação.

Os resultados de precisão, obtidos a partir das 24 replicatas ensaiadas para os micro-organismos alvos *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, permitiram concluir que não foram obtidos resultados falso-negativos, visto que foi observada a presença de coloração amarela para ambos os micro-organismos considerados, além da fluorescência azul para a *Escherichia coli*. Foi evidenciada detecção positiva para os micro-organismos alvos presentes em mistura de suspensões microbianas contendo níveis elevados de *Pseudomonas aeruginosa*. Para

avaliação do parâmetro robustez, foram empregadas duas estufas bacteriológicas para incubação dos frascos inoculados com os diferentes micro-organismos bem como para os frascos contendo apenas a água purificada em contato com o substrato enzimático. Caracterizada pelo grau de reprodutibilidade dos resultados obtidos no teste por análise da mesma amostra com variações das condições normais de ensaio tais como instrumentos, lotes de reagentes e laboratórios, a robustez possibilita estabelecer a viabilidade da técnica face às variações deliberadas nos parâmetros operacionais. Foram executados 40 experimentos em dias distintos, considerando três analistas e dois equipamentos para incubação das amostras ensaiadas, não sendo evidenciada discordância entre os resultados analíticos obtidos. Desta forma, pode-se afirmar que o método avaliado não sofreu interferência estatisticamente significativa frente às condições de robustez avaliadas.

Por fim, o limite de detecção é o menor número de micro-organismos em uma amostra que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas. Para a determinação do limite de detecção do método, optou-se por preparar suspensões dos micro-organismos alvos próximas ao proposto pelo fabricante do substrato avaliado (1 UFC/100 mL). Experimentos laboratoriais indicaram que foi possível a preparação de suspensão dos micro-organismos alvos entre 1 e 3 UFC/ μ L. Desta forma, todos os experimentos foram conduzidos com suspensões dentro desta ordem de grandeza.

Os 32 experimentos realizados foram capazes de detectar a presença dos micro-organismos alvos, estando estes em mistura de suspensões microbianas ou puros. Ainda, quando em mistura com micro-organismo não alvo, mesmo em altas concentrações, foi possível evidenciar o bom desempenho do substrato avaliado. Assim, todos os frascos adicionados do micro-organismo *Klebsiella pneumoniae* demonstraram presença de coloração amarela, além de fluorescência azul, quando adicionados de suspensão individual de *Escherichia coli*, dentro da faixa de obtenção de micro-organismos entre 1 e 3 UFC/100 mL. Visto que o limite de detecção é caracterizado pelo menor número de micro-organismos em

uma amostra que pode ser detectado sob as condições experimentais estabelecidas, o limite de detecção do método foi definido como 3 UFC/100 mL.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método de substrato enzimático, apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados analíticos com a qualidade e a confiabilidade exigidas, sendo considerado adequado para o uso na rotina do Núcleo de Ensaio Biológicos e de Segurança para a avaliação da presença/ausência de coliformes totais em amostras de água tratada.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1 (50):40-2. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2867923/%284%29RDC_11_2014_COMP.pdf/beaf0fc13-a2d9-42d0-892b-60e0390c16e3
2. Bula do substrato enzimático “Kit de análise Colilert”, IDEXX Laboratories, Inc., One Drive, Westbrook, Maine 04092, USA. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em <https://www.idexx.com.br/files/colilert-procedure-en.pdf>
3. American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd edition. Washington, DC, 2017.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT, 3^a ed., 32 p; 2017.
5. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) – Coordenação Geral de Acreditação (CCGRE). Orientação sobre validação de métodos

analíticos. DOQ-CGCGRE-008, 9ª revisão, 30 p; 2020. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios.

6. Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO) – Coordenação Geral de

Acreditação (CCGRE). Orientação sobre avaliação de desempenho de métodos analíticos – microbiologia. DOQ-CGCGRE-089, 12 p; 2017. [acesso 2021 Mar 10]. Disponível em http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?torganismo=calibensaios.