

# Eficácia de meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral

## Cetrimide and M-PA-C agar media efficiency for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from mineral water samples

RIALA6/1100

Beatriz PISANI<sup>1\*</sup>, Marise SIMÕES<sup>1</sup>, Maria Angela Garnica PRANDI<sup>1</sup>, Maria Helena MARTINI<sup>1</sup>, Paulo Flávio Teixeira CHIARINI<sup>1</sup>, Edson Zangiacomini MARTINEZ<sup>2</sup>.

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas. Rua São Carlos, 720. CEP 13035-420, Campinas/SP – E-mail: mhmartini@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Recebido: 20/02/2006 – Aceito para publicação: 02/05/2007

### RESUMO

Estudou-se a eficácia dos meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, em diferentes temperaturas de incubação. Foram comparadas as taxas de recuperação de *P. aeruginosa* e a seletividade dos dois meios. Utilizou-se o modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários na análise estatística e o modelo Bayesiano de Poisson na comparação da seletividade dos meios e quanto à recuperação de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos revelaram diferença significativa na seletividade dos meios, em que o meio ágar M-PA-C apresentou maiores valores médios de contagem. Para a recuperação de células de *P. aeruginosa*, os resultados foram equivalentes. As médias nas três contagens realizadas em ágar M-PA-C a 42°C foi de 208 UFC e em Cetrimide a 35°C de 231 UFC na diluição de 10<sup>-6</sup>. Com relação às amostras de água mineral, não houve evidência de diferentes taxas de frequência de *P. aeruginosa* entre os cultivos nos dois meios seletivos em diferentes temperaturas.

**Palavras-chave.** *Pseudomonas aeruginosa*, água mineral, ágar M-PA-C e ágar Cetrimide.

### ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of two selective media, M-PA-C agar and Cetrimide agar, for isolating *P. aeruginosa* cells at different incubation temperatures. *P. aeruginosa* recovery rates, as well as the selectivity of both media were compared. A random effects Bayesian model for binary data was used for performing statistical analysis, and a Poisson Bayesian model was applied to compare the potential of both media selectivity and *P. aeruginosa* recovery. A discernible difference on the media selectivity was evidenced, and M-PA-C medium presented a higher mean counting rate. *P. aeruginosa* recovery was similar in both media, and no significant difference was noted in three counts on M-PA-C at 42°C (208 CFU), and on Cetrimide Agar at 35°C (231 CFU), at 10<sup>-6</sup> dilution. With regards to analyzed mineral water samples, no evidence of distinct occurrence rates of *P. aeruginosa* on either media, at different temperatures, was noted.

**Key words.** *Pseudomonas aeruginosa*, mineral water, M-PA-C agar and Cetrimide agar.

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* estão amplamente distribuído na natureza (solo, água, esgotos, intestino de mamíferos e plantas)<sup>1</sup>. Estudos revelaram a presença de *P. aeruginosa* em água mineral, no Brasil, Canadá, França, Alemanha, Espanha e Estados Unidos, entre outros países<sup>2</sup>. Esta bactéria pode estar presente também em águas tratadas destinadas a diferentes utilizações como diálise, preparação de medicamentos e reagentes<sup>3,4,5</sup>.

Além de serem patógenos oportunistas, espécies de *Pseudomonas* adquirem resistência a antibióticos, alteram aromas e aparência de águas<sup>6</sup>.

A eficiência dos meios de cultura, seletivos ou não, depende de fatores intrínsecos (composição dos nutrientes, potencial de óxi - redução, pH, atividade de água, tipo e atividade dos impedientes), fatores extrínsecos (condições de incubação) e fatores implícitos (exigência nutricional do microrganismo, antagonismo e sinérgismo da microbiota da água)<sup>7</sup>.

A Resolução RDC nº 275 de 2005, da ANVISA/MS, dispõe sobre o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural. Dentre os microrganismos a serem pesquisados, de acordo com esta resolução, está a *P. aeruginosa*<sup>8</sup>.

A American Public Health Association<sup>9</sup> (APHA) recomenda, na pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em água pela técnica de filtração por membrana o uso do Agar M-PA-C com incubação a 42°C, enquanto que os laboratórios da rede Estadual de Saúde Pública de São Paulo, entre outros, utilizam o Agar Cetrimide, também seletivo para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em água, incubado a 35°C. Entre os impedientes que compõe estes meios de cultura, inclui-se canamicina e ácido nalidíxico no Agar M-PA-C e brometo cetiltrimetilamônia no Agar Cetrimide<sup>10,11</sup>.

Legnani et al.<sup>4</sup> avaliaram a presença de *P. aeruginosa* em água mineral envasada por inoculação direta da amostra em Agar Cetrimide e por inoculação em Agar Cetrimide após pré-incubação por 1 hora em Agar tripticaseína de soja; os autores não observaram diferenças significativas na enumeração microbiana entre os procedimentos, demonstrando que o Agar Cetrimide pode ser empregado para análise de água.

Prandi et al.<sup>12</sup> utilizaram Agar Cetrimide na análise de 894 amostras de água mineral e verificaram a presença de *P. aeruginosa* em 77 amostras (8,61%) enquanto que em Agar M-PA-C detectaram a presença deste microrganismo em 40 (5,56%) das 719 amostras avaliadas. A diferença de 3% entre os resultados foi significativa ( $p < 0,05$ ), motivando a realização deste estudo.

Este trabalho teve o objetivo de comparar a seletividade e o desempenho dos meios M-PA-C (indicado pela APHA) e Cetrimide na recuperação de *P. aeruginosa*, incubados a 42°C/72 horas e 35°C e 42°C/48 horas, respectivamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

A1-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, A2-*Proteus mirabilis* CDC 305, A3-*Escherichia coli* ATCC 25922, A4-*Aeromonas hydrophila* IAL 570 e A5-*Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

### Cultivo dos microrganismos

Os microrganismos foram cedidos pela Seção de Coleção de Culturas Bacterianas do Instituto Adolfo Lutz.

A cepa de *P. aeruginosa* foi reativada em 5mL de caldo infusão de cérebro e coração, BHI (Brain Heart Infusion Broth), e incubada a 35°C/18 horas. Alíquota de 1,0mL foi transferida para 9mL de solução salina a 0,85% e submetida a diluição decimal até 10<sup>-8</sup>. Posteriormente, transferiu-se 1 mL de cada diluição para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando-se o meio "Plate Count agar" – Difco (PCA) incubado a 35°C por 24h. Utilizou-se o mesmo procedimento para a reativação dos demais microrganismos.

A) Preparação da suspensão da mistura dos microrganismos

Das 5 culturas, em caldo BHI na fase estacionária, foram retiradas alíquotas de 0,2mL de cada uma, e transferidas para 9 mL de solução salina a 0,85%. A partir desta suspensão 10<sup>-1</sup> foram realizadas as diluições decimais até 10<sup>-8</sup>, sendo que cada diluição foi submetida à contagem de UFC, pelo método de plaqueamento em profundidade, em meio PCA (35°C/24h), M-PA-C (42°C/72h) e Cetrimide (35°C e 42°C/48h).

B) Preparação da suspensão de uma espécie bacteriana

A cultura de cada espécie foi diluída a 10<sup>-1</sup> e determinaram-se as respectivas UFC em cada meio de cultura conforme descrito anteriormente. Esta avaliação foi realizada três vezes.

### Análise microbiológica das amostras de água mineral

Foram analisadas 15 amostras de água mineral envasadas utilizando-se o método de filtração por membrana, recomendado pela APHA, para a pesquisa de *P. aeruginosa*<sup>9</sup>. As condições de cultivo empregadas foram M-PA-C, com incubação a 42°C/72h, e Cetrimide, com incubação a 35°C e 42°C/48h. Estas análises foram realizadas em duplicata.

### Análise estatística

A análise estatística utilizou modelos Bayesianos de regressão<sup>13</sup>. Dado que as contagens de UFC para a mistura de microrganismos nos meios de cultura constituem uma variável de natureza discreta, estes dados foram modelados segundo uma distribuição de Poisson com média dependente do meio, da temperatura e da diluição. Este modelo permitiu

comparações da seletividade dos meios e da recuperação de *P. aeruginosa*. Um modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários correlacionados (relativos às duplicatas) foi utilizado na análise estatística das 15 amostras de água mineral envasada.

Dentro de uma abordagem Bayesiana, medidas de interesse foram estimadas por métodos MCMC (Monte Carlo em cadeia de Markov), utilizando o algoritmo de estimadores de Gibbs<sup>14</sup>. Foi utilizado com este propósito o programa computacional *WinBugs*<sup>15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na enumeração microbiana (UFC/mL) na avaliação da seletividade dos meios M-PA-C, incubado a 42°C, e Cetrimide incubado a 35°C e 42°C.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com a recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* obtida com os mesmos meios e condições de incubação. As médias das contagens de UFC/mL, apresentadas nas Tabelas 1 e 2, com seus respectivos intervalos de confiança, foram estimadas pelo modelo Bayesiano de Poisson utilizando distribuições a priori não informativas. O intervalo de confiança, utilizado nos modelos Bayesianos, é análogo ao usual

intervalo de confiança utilizado pelos métodos frequentistas, com uma interpretação diferente. Por exemplo, da Tabela 1, inferimos que, ao generalizarmos os nossos resultados a uma população de microrganismos mais ampla, a probabilidade de encontrarmos uma contagem média de UFC/mL entre 43,82 e 60,13 UFC/mL com a mistura de microrganismos no meio Cetrimide incubado a 42°C é de 95%.

A Tabela 3 apresenta comparações entre as contagens médias de UFC/mL apresentadas nas Tabela 1 e 2. Quando comparadas, por exemplo, as contagens médias de UFC/mL entre os meios de cultura Cetrimide incubado a 42°C e a 35°C com a mistura de microrganismos e na diluição 10<sup>-6</sup> a diferença entre as médias é estimada em 22,33 UFC/mL. O respectivo intervalo de credibilidade informa que, quando projetados estes resultados a uma população de microrganismos mais ampla, existe a chance de 95% de que esta diferença das médias encontre-se entre 12,23 e 32,60 UFC/mL. Dado que este intervalo não contém o valor zero, que evidenciaria a possibilidade de não haver diferença entre os dois grupos, conclui-se que há uma significativa diferença entre as médias de contagens quando contemplada esta comparação.

**Tabela 1.** Contagens de UFC de *P. aeruginosa* nas diluições 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, nos meios Cetrimide e M-PA-C, para a mistura de microrganismos, nas temperaturas de 35°C e 42°C.

	Meio de Cultura	Diluição	Contagens UFC/ml			Média estimadas contagens <sup>(a)</sup> UFC/mL	Intervalo de credibilidade 95%
Mistura de Microrganismos	Cetrimide 42°C	10 <sup>-6</sup>	120	4	31	51,66	(43,82 60,13)
		10 <sup>-7</sup>	0	0	3	0,9998	(0,208 2,4)
	Cetrimide 35°C	10 <sup>-6</sup>	23	24	41	29,32	(23,52 35,78)
		10 <sup>-7</sup>	0	1	3	1,333	(0,364 2,912)
	MPAC 42°C	10 <sup>-6</sup>	152	121	91	121,30	(109,20 134,1)
		10 <sup>-7</sup>	28	18	17	21,0	(16,14 26,49)

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson.

**Tabela 2.** Contagens de UFC da cepa *P. aeruginosa*, ATCC 10145, obtidas das diluições 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, a 35°C e 42°C.

	Meio de Cultura	Diluição	Contagens UFC/ml			Média estimadas contagens <sup>(a)</sup> UFC/mL	Intervalo de credibilidade 95%
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	Cetrimide 42°C	10 <sup>-6</sup>	300	120	118	179,3	(164,4 194,7)
		10 <sup>-7</sup>	52	9	4	21,65	(16,71 27,2)
	Cetrimide 35°C	10 <sup>-6</sup>	300	206	188	231,3	(214,4 248,8)
		10 <sup>-7</sup>	64	24	4	30,66	(24,71 37,21)
	MPAC 42°C	10 <sup>-6</sup>	300	115	208	207,7	(191,7 224,3)
		10 <sup>-7</sup>	27	58	47	43,97	(36,83 51,78)

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson.

**Tabela 3.** Médias das contagens de UFC obtidas nos meios Cetrimide e M-PA-C na mistura de microrganismos e na cultura de *P. aeruginosa*, ATCC 10145, a 35°C e 42°C.

	Diluição	Meio de Cultura	Diferença estimada entre as médias <sup>(a)</sup> UFC	Intervalo de credibilidade 95%	(b)
Mistura de Microrganismos	10 <sup>-6</sup>	Cetrimide 42°C versus 35°C	22,33	(12,23 32,60)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	69,66	(54,90 84,66)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	91,99	(78,31 106,0)	*
	10 <sup>-7</sup>	Cetrimide 42°C versus 35°C	-0,33	(-2,15 1,40)	ns
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	19,99	(19,89 25,58)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	19,66	(14,60 25,28)	*
<i>P. aeruginosa</i>	10 <sup>-6</sup>	Cetrimide 42°C versus 35°C	-51,96	(-75,03 -29,13)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	-23,61	(-47,3 0,09)	ns
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	28,35	(5,98 50,64)	*
	10 <sup>-7</sup>	Cetrimide 42°C versus 35°C	-9,01	(-17,25 -0,85)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	13,32	(3,63 23,17)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	22,23	(13,26 31,57)	*

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson; (b) interferência estatística à 95% de confiança.

\*= diferenças significativas entre as médias das contagens.

ns= diferenças não significativas entre as médias das contagens.

De acordo com a Tabela 3 os resultados comparativos das médias obtidas evidenciam que, para o teste de seletividade com a mistura de microrganismos, há diferença significativa entre os meios M-PA-C e Cetrimide nas duas diluições utilizadas, sendo o meio M-PA-C aquele que apresentou maiores valores para a média.

Os resultados para a recuperação de células de *P. aeruginosa*, foram semelhantes, não havendo diferença significativa entre M-PAC e Cetrimide a 35°C na diluição 10<sup>-6</sup>.

A Tabela 4 mostra a pesquisa de *P. aeruginosa* nas 15 amostras de água mineral, realizada em duplicata (1° e 2° testes), utilizando-se os meios Cetrimide e M-PA-C. Estes resultados foram delineados por um modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários correlacionados, utilizando-se distribuições a priori não informativas. Com base neste modelo, verificou-se que não há evidências de que a frequência de *P. aeruginosa* seja diferente entre os dois meios nas diferentes temperaturas.

**Tabela 4.** Isolamento de *P. aeruginosa* realizada em duplicata de 15 amostras de água mineral, utilizando-se os meios Cetrimide e M-PA-C a 35°C e 42°C.

Amostra de Água Mineral	Meio de cultura					
	Cetrimide 35°C		Cetrimide 42°C		M-PA-C 42°C	
	1º Teste	2º Teste	1º Teste	2º Teste	1º Teste	2º Teste
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

Observou-se que a recuperação de microrganismos testados na mistura, no meio PCA a 35°C por 24 horas, ocorreu até a diluição 10<sup>-7</sup> (o que significou que a quantidade de microrganismos utilizada como interferentes foi semelhante). Quanto à análise da seletividade dos dois meios, utilizando-se a diluição 10<sup>-1</sup> de cada microrganismo interferente, verificou-se que somente o *Proteus mirabilis* cresceu no meio Cetrimide (>300 UFC nos três testes).

Durante a contagem de *P. aeruginosa* observou-se que algumas espécies infiltraram-se nas malhas das membranas de 0,45µm de porosidade, prejudicando o crescimento de colônias isoladas e a determinação de UFC. Hasegawa et al.<sup>16</sup>, recomendam para a pesquisa de *P. aeruginosa* a utilização de membranas com porosidade de 0,22µm devido a capacidade do microrganismo transpor as malhas da membrana de 0,45µm.

### CONCLUSÕES

Os meios Agar M-PA-C e Agar Cetrimide apresentaram desempenho semelhante na recuperação da *P. aeruginosa*, tanto nos testes para a cepa ATCC quanto para a mistura com outros microrganismos.

O meio Agar M-PA-C demonstrou ser mais seletivo do que o Agar Cetrimide.

O presente estudo confirma que os meios Agar Cetrimide e Agar M-PA-C são adequados e equivalentes para a pesquisa de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral.

### REFERÊNCIAS

1. Lennette EH, Balows A, Hausler Jr WJ, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 4<sup>th</sup>. Washington DC., 1985.
2. Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs PA. Modified Pseudomonas agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. J Microbiol Methods 2002; 49: 69-74.
3. Simões M, Chiarini PFT, Pires MFC. *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias heterotróficas e leveduras em água utilizada para hemodiálise. Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62 (supl 1): 3.
4. Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5- year study. Intern J Food Microbiol 1999; 53 (2-3):153-8.
5. Pisani B, Simões M, Prandi MA, Rocha MMM, Gonçalves CR, Vaz TMI, Irino K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na Unidade de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil, Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59(1/2): 51-6.
6. Jayasekara NY, Heard GM, Cox JM, Fleet GH. Populations of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. Food Microbiol 1998; 15:167-76.
7. Gelli DS, Ristori CA, Buzzo AA. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62 (3):159-64.
8. Resolução RDC – N° 154 de 15 de junho de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde, que estabelece os parâmetros da água utilizada para diálise. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 19 jun.2000.
9. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Part 9000 Microbiological Examination 19<sup>th</sup> ed. Washington DC, (APHA) 1995.
10. Difco Laboratories, Maryland, Section II, Culture Media and Ingredients, Dehydrated, Difco Manual 11<sup>th</sup> ed. Maryland, 1998.
11. Sant'Ana AS, Silva SCFL, Farani IO Jr, Amaral CHR, Macedo VF. Qualidade microbiológica de águas minerais. Cienc Tecnol Aliment 2003; 23 (supl): 190-4.
12. Prandi MAG, Martini MH, Pisani B, Simões M, Chiarini PFT. Águas minerais: avaliação da qualidade microbiológica em amostras envasadas. Rev Inst Adolfo Lutz 2005; 64 (supl.2): 35
13. Spiegelhalter DJ, Abrams KR, Myles JP. Bayesian approaches to clinical trials and health-care evaluation. Chichester: John Wiley & Sons; 2004.
14. Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ. Markov Chain Monte Carlo in Practice. London: Chapman & Hall; 1996
15. Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best N, Gilks W. BUGS (Bayesian Inference Using Gibbs Sampling) Version 0.50. Cambridge: MRC Biostatistics Unit; 1995.
16. Hasegawa H, Naganuma K, Nakagawa Y, Matsuyama T. Membrane Filter (pore size, 0,22 – 0,45 µm; thickness, 150 µm) passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. FEMS Microbiology Letters 2003; 223: 41-6.