

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE DETECÇÃO E OCORRÊNCIA DE ESPOROS DE *Clostridium perfringens* EM ÁGUA

DÉBORAH A. CONTIN¹; VALÉRIA C. A. JUNQUEIRA²; NEUSELY DA SILVA³;
ROMEU CANTUSIO NETO⁴

Nº 12226

RESUMO

A determinação de esporos de *Clostridium perfringens* em água é uma importante avaliação indicativa de contaminação fecal, útil em situações onde outros indicadores de menor resistência, tais como a *Escherichia coli*, já não se encontrariam presentes. Em adição, o monitoramento de *C. perfringens* em água tratada pode fornecer subsídios para avaliar a eficiência na remoção de organismos patogênicos resistentes, tais como *Giardia* e o *Cryptosporidium*, protozoários intestinais formadores de cistos e oocistos. Os métodos preconizados para a determinação de *C. perfringens* em água carecem de estudos que permitam distinguir os de melhor eficiência e ampliar as opções disponíveis para análise laboratorial. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para um melhor monitoramento da qualidade da água de abastecimento público.

ABSTRACT

The determination of *Clostridium perfringens* spores from water is an important indicative evaluation of remote fecal contamination, useful in situations where other less resistant indicators such as *Escherichia coli* would not have survived. In addition, the monitoring of *C. perfringens* in treated water can supply information to evaluate the efficiency in the removal of resistant pathogenic organisms such as *Giardia* and *Cryptosporidium*, intestinal protozoa which form cysts and oocysts. The available methods to determine *C. perfringens* from water need studies which allow knowledge for the greatest efficiency and also increase the number of available options for

¹ Bolsista CNPq: Graduando em Biomedicina, METROCAMP, Campinas-SP, deborahluiza@live.com.

² Orientador: Pesquisador Científico, CCQA/ITAL, Campinas-SP.

³ Colaborador: Pesquisador Científico, CCQA/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador, Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S.A. – SANASA, Campinas, SP, Brasil.

laboratorial analysis. The results of this work will contribute to better monitor the quality of public water supply.

INTRODUÇÃO

Clostridium perfringens é uma bactéria anaeróbia em forma de bastonete, Gram positiva, esporogênica, sulfito redutora, amplamente distribuída na natureza e considerada como parte da microbiota intestinal normal do homem e de animais (Hatheway *et al.*, 1980). As células vegetativas de *C. perfringens* encontram no intestino condições adequadas para sua esporulação, o que não ocorre facilmente em meios de cultura utilizados para crescimento *in vitro* (Labbe, 1980). Os esporos são eliminados nas fezes e dessa forma chegam ao meio aquático onde apresentam excepcional longevidade, em função da grande resistência a condições ambientais desfavoráveis. Por esse motivo, são úteis na detecção de contaminação fecal, em situações nas quais outros indicadores, como a *Escherichia coli* e os estreptococos fecais, já não se encontrariam presentes. O uso dos esporos de *C. perfringens* como um indicador de qualidade da água tem sido objeto de vários estudos (Bisson & Cabelli, 1979; Hirata *et al.*, 1991; Payment & Franco, 1993; Medema *et al.*, 1997). De acordo com Medema *et al.* (1997), os esporos de *C. perfringens* sobrevivem mais tempo nas águas fluviais que os oocistos do protozoário *Cryptosporidium parvum*, podendo desta forma ser considerado um indicador útil da presença deste parasito, responsável por inúmeros surtos de doenças intestinais de origem hídrica e resistente ao tratamento convencional da água.

A exigência de controle de *C. perfringens* em água mineral está normatizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). O caldo Diferencial Reinforced Clostridial Medium (DRCM), proposto por Gibbs & Freame (1965) é o meio tradicionalmente utilizado pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB, 1993), para monitoramento de *C. perfringens* em águas brutas e tratadas no Estado de São Paulo e especificado pela ISO 6461-1 (1986), para detecção de esporos de anaeróbios sulfito-redutores (clostrídios) em água.

O Meio de Leite e Ferro (IMM) proposto por St. John *et al.* (1982) e estudado por Abeyta *et al.* (1985) para diferenciação de *Clostridium perfringens* em relação a outros clostrídios em alimentos carece de avaliação em água. No IMM a fermentação da lactose pelas cepas de *C. perfringens* resulta na abundante formação de gás, que rompe e desloca o coágulo (fermentação tempestuosa). A incubação dos tubos a 45°C por apenas 18h restringe a ocorrência da reação típica a umas poucas cepas de

clostrídios sulfito redutores, diferenciados de *C. perfringens* pelas características de motilidade, redução do nitrato e hidrólise da gelatina. O IMM é preparado pela simples adição de limalha de ferro ao leite integral, seguido da esterilização a 116°C/10min. Sob esse ponto de vista, é a opção mais simples e econômica de meio de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem. Foram coletadas 8 amostras de água bruta nos pontos de captação dos rios Atibaia e Capivari, sendo que cada amostra foi subdividida em 5 porções iguais, totalizando 40 amostras. Adicionalmente, foram coletadas 16 amostras provenientes da rede de distribuição de água da cidade de Campinas –SP, cujos pontos de coleta foram os cavaletes dos hospitais e 62 amostras de água mineral natural envasada para comercialização, proveniente de fontes mineradoras da região do Circuito das Águas Paulista.

A coleta e a preservação das amostras foram feitas a partir de técnicas adequadas para que não houvesse comprometimento dos resultados, conforme descrito em Silva *et al.* (2010). No caso das amostras captadas nos rios, a coleta foi feita manualmente, utilizando-se luvas de cano longo destinadas exclusivamente para esta atividade. Para o acondicionamento da amostra foi utilizado frasco plástico estéril com tampa rosqueável. A amostra foi obtida a cerca de 15 cm de profundidade para evitar a introdução de contaminantes superficiais. Direcionou-se o frasco de modo que a boca ficasse em sentido contrário à correnteza, inclinando o frasco lentamente para cima a fim de permitir a saída do ar e completo enchimento do mesmo. Após a retirada do frasco do corpo de água, este foi fechado imediatamente e identificado. Este frasco contendo aproximadamente 200ml de amostra foi transportado em caixa isotérmica até o laboratório, sendo mantido sob temperatura inferior a 10°C até o momento da análise.

Procedimento para amostras de água bruta. Conforme esquematizado na Figura 1, 10ml de cada amostra foi transferido para bolsas estéreis contendo 90ml de água peptonada. Após homogeneização desta diluição 10^{-1} , foi aplicado um choque térmico de 75°C durante 15 minutos. Após resfriamento, 1ml foi inoculado em 5 tubos contendo 10ml de caldo DRCM e em 5 tubos contendo 10ml de IMM. Os tubos de DRCM e IMM inoculados foram incubados nas respectivas condições de temperatura e tempo de 37°C por 44h e 45°C por 18h. Posteriormente ao período de incubação observou-se reação positiva de escurecimento no meio DRCM e de fermentação tempestuosa em IMM. Alçada dos tubos com reação positiva foi estriada em placa de

Agar Tripticase Sulfito Cicloserina contendo gema de ovo (TSC-EY) para isolamento de colônias. As colônias isoladas foram transferidas para Meio de Tioglicolato (TGM). Deste caldo foram inoculados os meios de Lactose Gelatina (LG) e de Nitrato Motilidade (NM), sendo feita a confirmação bioquímica de *Clostridium perfringens* de acordo com a técnica descrita por Rhodhamel & Harmon (2001).

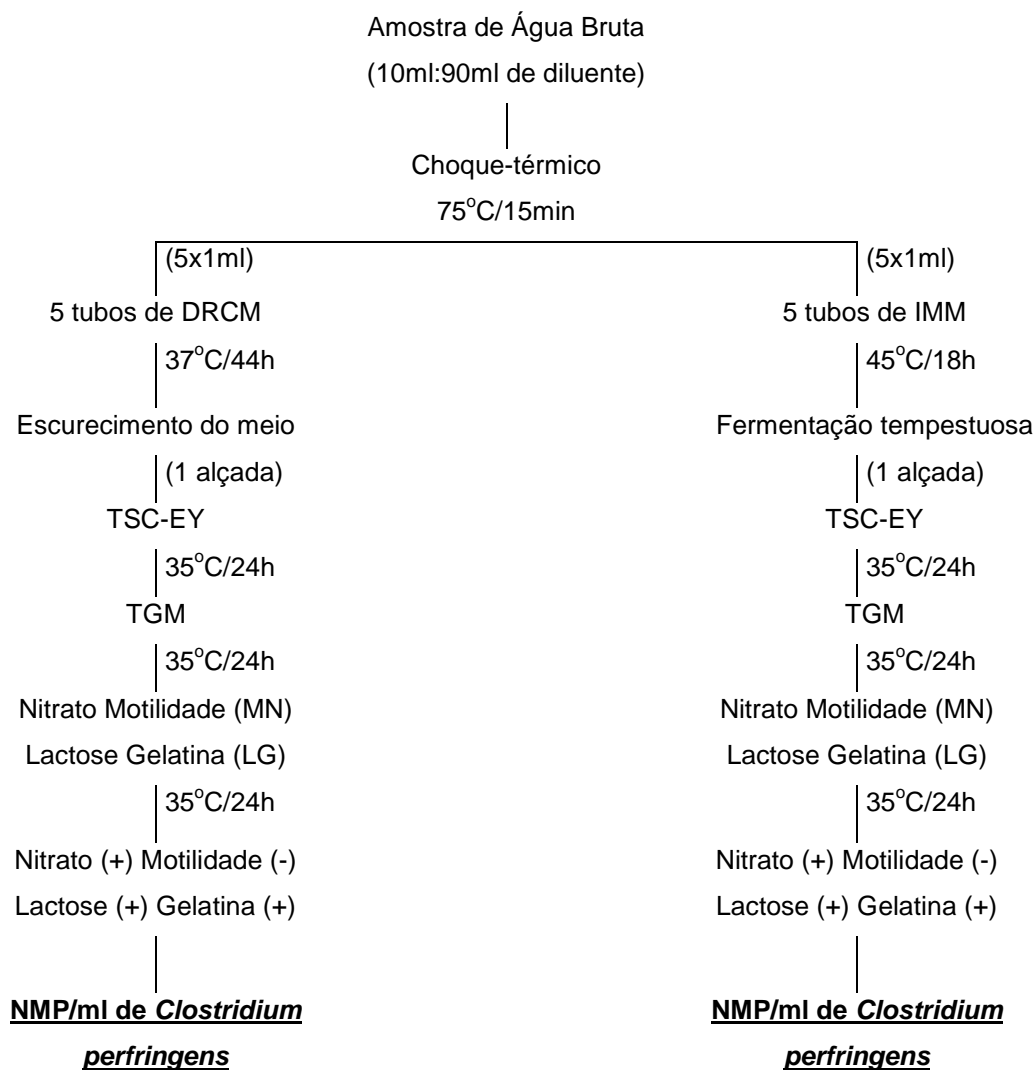


FIGURA 1. Esquema do procedimento para contagem de *Clostridium perfringens* em água bruta.

DRCM = Differential Reinforced Clostridial Medium, preparado de acordo com a ISO 6461-1 (1986)

IMM = Iron Milk Medium, preparado de acordo com St. John et al. (1982)

TSC-EY=Tryptose Sulfite Cycloserine Agar com Gema de Ovo para isolamento de colônias (lecitinase positiva ou negativa), de acordo com Rhodhamel & Harmon (2001)

TGM = Fluid Thioglycollate Medium para subculturas isoladas

NMP= Número Mais Provável

Procedimento para amostras de água de consumo humano (mineral ou da rede de abastecimento público.) Unidades analíticas de 100ml de cada amostra foram analisadas em 5 porções de 20ml, utilizando-se a técnica de Número Mais Provável (NMP/100ml), conforme descrito na ISO 6461-1 (1986).

Análise Estatística. Foi realizada de acordo com a ISO 17994 (2004), que define os critérios para estabelecer equivalência entre os métodos para análise microbiológica de água. Apenas as amostras de água bruta positivas para *C. perfringens* em um ou nos dois métodos foram submetidas à análise estatística para comparação dos métodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 78 amostras de água de consumo humano (mineral ou da rede de abastecimento público. Em nenhuma foi detectada presença de *Clostridium perfringens* em 100ml, equivalendo quantitativamente a um Número Mais Provável (NMP) menor que 1,1NMP/100ml.

Foram analisadas 40 amostras de água bruta usando o método do DRCM e do IMM em paralelo, para comparação. Dessas, 34 apresentaram resultado positivo em um ou nos dois métodos, sendo usadas na análise estatística (Tabela 1).

TABELA 1. Contagens (em NMP = Número Mais Provável) obtidas entre os métodos utilizando o Meio Diferencial Reforçado para Clostrídios (DRCM) e o Meio de Leite e Ferro (IMM) e cálculo da diferença relativa.

Amostra	DRCM	IMM	DRCM	IMM	Diferença relativa (DR)
	NMP/100ml	NMP/100ml	Ln NMP/100ml	Ln NMP/100ml	
1544-2	223	223	5,41	5,41	0,00
1545-1	1	223	0,00	5,41	5,41
1545-2	511	223	6,24	5,41	-0,83
1545-3	916	1	6,82	0,00	-6,82
1545-4	223	1	5,41	0,00	-5,41
1545-5	511	1	6,24	0,00	-6,24
2139-1	1	223	0,00	5,41	5,41
2139-2	511	223	6,24	5,41	-0,83
2139-5	223	1	5,41	0,00	-5,41
2140-1	511	511	6,24	6,24	0,00
2140-2	1	1610	0,00	7,38	7,38
2140-3	916	916	6,82	6,82	0,00
2140-4	916	511	6,82	6,24	-0,58

TABELA 1. (Continuação).

Amostra	DRCM	IMM	DRCM	IMM	Diferença relativa (DR)
	NMP/100ml	NMP/100ml	Ln NMP/100ml	Ln NMP/100ml	
2140-5	223	916	5,41	6,82	1,41
3170-1	511	511	6,24	6,24	0,00
3170-2	1	223	0,00	5,41	5,41
3170-3	1	916	0,00	6,82	6,82
3170-4	223	223	5,41	5,41	0,00
3170-5	511	223	6,24	5,41	-0,83
3171-1	1	916	0,00	6,82	6,82
3171-2	1	511	0,00	6,24	6,24
3171-3	511	223	6,24	5,41	-0,83
3171-4	1	511	0,00	6,24	6,24
3171-5	1	223	0,00	5,41	5,41
3858-1	1	511	0,00	6,24	6,24
3858-2	511	916	6,24	6,82	0,58
3858-3	1	511	0,00	6,24	6,24
3858-4	1	511	0,00	6,24	6,24
3858-5	1	223	0,00	5,41	5,41
3859-1	1	511	0,00	6,24	6,24
3859-2	223	511	5,41	6,24	0,83
3859-3	1	511	0,00	6,24	6,24
3859-4	223	916	5,41	6,82	1,41
3859-5	1	1610	0,00	7,38	7,38
Número de amostras (n=34)					
Média das diferenças relativas (\bar{X})					75,57
Desvio padrão (s)					4,2801514
Incerteza ($s_{\bar{X}} = s/\sqrt{n}$)					0,7340399
Incerteza expandida ($U = 2s_{\bar{X}}$)					1,4680798
Limite de inferior do intervalo de confiança ($X_L = \bar{X} - U$)					74,10
Limite superior do intervalo de confiança ($X_H = \bar{X} + U$)					77,03

Cálculo da diferença relativa entre as contagens (DR). O resultado obtido em cada contagem foi transformado em logaritmo natural (Ln). Para as amostras com contagem igual a zero em um dos métodos (mas não no outro), o valor “um” foi somado à contagem dos dois métodos, antes de transformar em Ln. O número de amostras nessa situação não deve ultrapassar 25% do total de amostras usadas nos cálculos.

Para determinar a DR para cada par de contagens, subtrair do valor obtido pelo método teste, o valor obtido pelo método de referência e multiplicar por 100.

$$DR = (x_A - x_B) \times 100$$

x_A = Ln da contagem obtida pelo método teste

x_B = Ln da contagem obtida pelo método referência

Cálculo da diferença relativa média (\bar{x}). A média aritmética foi calculada através das diferenças relativas obtidas para o total de amostras (as diferenças relativas de todas as amostras consideradas no cálculo foram somadas posteriormente divididas pelo número de amostras consideradas no cálculo).

Cálculo do desvio padrão (s). O cálculo do desvio padrão das DR foi determinado através do software Excel da Microsoft (desvpad).

Cálculo da incerteza padrão da média ($s_{\bar{x}}$). A incerteza padrão da média foi obtida pelo valor do desvio padrão dividido pela raiz quadrada do número de amostras usadas nos cálculos.

Cálculo da incerteza expandida (U). A incerteza expandida é igual a duas vezes a incerteza padrão da média. O valor dois multiplicando a incerteza padrão da média é o fator k. Na ISO 17994 (2004) k é igual a dois, porque não se espera que a distribuição das diferenças relativas seja normal.

TABELA 2. Resumo dos resultados obtidos nos métodos avaliados e conclusão

Avaliação bilateral*	Avaliação unilateral**	Conclusão
x_L entre $-D$ e 0 e x_H entre 0 e $+D$	x_L entre $-D$ e 0 e x_H maior 0	Métodos não diferentes
x_L maior 0 e x_H menor 0	x_L maior 0 – o método teste é melhor	Métodos diferentes
	x_H menor 0 – o método teste é pior	
x_L menor $-D$ e x_H maior 0 ou x_L menor 0 e x_H maior $+D$	x_L menor $-D$ e x_H maior 0	Resultado inconclusivo
x_L maior $-D$ e x_H menor 0 ou x_L maior 0 e x_H menor $+D$	x_L maior $-D$ e x_H menor 0	Resultado indiferente

*Na avaliação bilateral, independente de um dos métodos ser considerado de referência ou não, equivalência é entendida como a situação em que nenhum dos métodos dá resultados significativamente maiores ou menores do que o outro.

**Na avaliação unilateral, equivalência é entendida como a situação em que o método teste dá resultados equivalentes ou significativamente maiores do que o método de referência.

Definições: X_L = Limite inferior do intervalo de confiança ($X_L = \bar{x} - U$)
 X_H = Limite superior do intervalo de confiança ($X_H = \bar{x} + U$)
D= Diferença relativa média recomendada= 10%

Cálculo do intervalo de confiança da diferença relativa ao nível de 95%. Os dois extremos (X_L e X_H) do intervalo de confiança (intervalo em que se encontra a diferença relativa média, com 95% de probabilidade) foram calculados somando-se e subtraindo-se a incerteza expandida à média.

Interpretação dos resultados e conclusão. Na interpretação dos resultados, resumidos na Tabela 2, a diferença relativa média (valor D) máxima recomendada é de 10%, para comparação de métodos de análise de água destinada ao consumo humano.

O método testado utilizando o IMM, pela análise estatística segundo a ISO 17994 (2004), foi avaliado como sendo diferente do método de referência utilizando o DRCM, com resultados melhores para detecção de *C. perfringens* em água. De acordo com St. John *et al.* (1982), o método do IMM é muito simples e rápido, porque não exige confirmação. Em seu estudo e no presente estudo, todas as culturas com fermentação tempestuosa do leite, nas condições do ensaio, foram confirmadas como *C. perfringens*. Além disso, é muito mais barato e menos trabalhoso, porque o meio de cultura é apenas leite integral esterilizado.

CONCLUSÃO

Com relação a água bruta, o método que utiliza o Meio de Leite e Ferro apresentou resultados melhores para determinação de *Clostridium perfringens* que o método de referência utilizando o Caldo Diferencial Reforçado para Clostrídios seguido dos testes bioquímicos para a confirmação desta bactéria. Das amostras de água de consumo humano analisadas (mineral e da rede de abastecimento público) nenhuma apresentou resultado presuntivo positivo para *C. perfringens*, nem mesmo no grupo dos clostrídios sulfito redutores. Esses dados indicam que o tratamento da água de abastecimento no município de Campinas, tem sido eficiente para a remoção dos esporos de *C. perfringens* presentes na água bruta de seus mananciais e que as fontes de água mineral natural da região do Circuito das Águas Paulista, de onde são captadas, estão adequadamente preservadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYTA JR.; C., MICHALOVISKIS, A.; WEKELL, M. M. Differentiation of *Clostridium perfringens* from related *Clostridia* in iron milk medium. **Journal of Food Protection**, Des Moines, IA, USA, v. 48, n. 2, p. 130-134, 1985.

ANVISA. Resolução RDC Nº 275 de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde (Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Água Mineral e Água Natural).

BISSON, J. W.; CABELLI, V. J. Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 37, p. 55-66, 1979.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Determinação do Número Mais Provável de Clostrídios Sulfito-Redutores (*Clostridium perfringens*): Método de Ensaio. CETESB: São Paulo, 1993. 28p. (Norma técnica L5.213).

GIBBS, B. M.; FREAME, B. Methods for the recovery of *Clostridia* from foods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, England, v. 28, p. 95-111, 1965.

HIRATA, T.; KAWAMURA, K.; SONOKI, S.; HIRATA, K.; KANEKO, K.; TAGUCHI, K. *Clostridium perfringens*, as an indicator microorganism for the evaluation of the effect of wastewater and sludge treatment systems, **Water Science and Technology**, Kidlington, Oxford, England, v. 24, n. 2, p. 367-372, 1991.

HATHEWAY, C. L.; WHALEY, D. N.; DOWELL JR., V. R. Epidemiological aspects of *Clostridium perfringens* foodborne illness. **Food Technology**, Chicago, v. 34, n. 4, p. 77-79, 1980.

ISO 6461-1. Water quality- Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) – Part 1: Method by enrichment in liquid medium, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1986.

ISO 17994. Water quality- Criteria for establishing equivalence between microbiological methods, 1st ed. The International Organization for Standardization, 2004.

LABBE, R. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. **Food Technology**, Chicago, v. 34,n. 4,p. 88-90, 1980.

MEDEMA, G. J.; BAHAR, M.; SCHETS, F. M. Survival of *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli*, faecal enterococci and *Clostridium perfringens* in river water: Influence of temperature and autochthonous microorganisms **Water Science and Technology**, Kidlington, Oxford, England, v. 35, n. 11-12, p. 249-252, 1997.

PAYMENT, P.; FRANCO, E. *Clostridium-perfringens* and somatic coliphages as indicators of the efficiency of drinking-water treatment for viruses and protozoan cysts **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 8, p. 2418-2424, 1993.

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Clostridium perfringens*. In: **US Food and Drug Administration (FDA)**, Bacteriological Analytical Manual (BAM) Online, <<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>>, Chapter 16, revisão de janeiro de 2001. Acesso em 02/02/2012.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.S.; GOMES, R.A.R. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4ª ed. São Paulo, Livraria Varela, 2010, 632p.

ST. JOHN, E.W.; MATCHES, J.R.; WEKELL, M.M. Use of Iron Milk Medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Arlington, VA, v. 65, n. 5, p. 1129-1133, 1982.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCQA – ITAL, pela oportunidade de estágio.