



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016

AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Maria Luiza C. de Oliveira

PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA CROMOGÊNICO PARA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

Palmas – TO

2023

Maria Luiza C. de Oliveira

PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA CROMOGÊNICO PARA INFECÇÃO DO TRATO
URINÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Palmas – TO

2023

Maria Luiza C. de Oliveira

PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA CROMOGÊNICO PARA INFECÇÃO DO TRATO
URINÁRIO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos

Orientador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. Dr. Luiz Fernando Albarello

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. a Dra. Anne Caroline Dias Neves

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2023

Dedico essa pesquisa prático laboratorial, principalmente, aos meus pais por todo amor, educação, apoio, incentivo, ajuda, suporte e comprometimento ao abraçarem a correria que foi essa prática. Dedico também aos amigos que me acompanharam durante a loucura dessa minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha saúde mental e meu cérebro, por segurar as pontas várias vezes ao longo dessa pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr Ernane Gerre Pereira Bastos, por me apresentar essa proposta de criação de um Meio de Cultura Cromogênico inovador para UTIs visando bactérias que causam infecções no trato urinário, onde pude estudar e ampliar meus conhecimentos na área de microbiologia em pouco tempo, pelo apoio, ideias, confiança e orientações que me fizeram apaixonar pelos desafios que uma pesquisa traz e por me auxiliar a chegar na conclusão deste trabalho.

Agradeço aos meus pais por topar as minhas ideias, me apoiando, incentivando, acompanhando e vibrando a cada resultado e me dando suporte para tudo o que eu necessitava.

Agradeço às minhas irmãs que apesar da falta de tempo e correria sempre me apoiaram.

Agradeço a todos os professores que me acompanharam durante a minha jornada acadêmica, pelas aulas teóricas e práticas que contribuíram para a minha formação profissional.

Agradeço ao meu colega de faculdade e laboratorial Dr. Franky William pelo compartilhamento de conhecimentos e por toda ajuda prestada.

Agradeço aos amigos (as) pelo carinho, incentivo e amizade que me ajudaram de alguma forma nesses dias longos e corridos.

EPÍGRAFE

Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1 Preparo dos Inóculos	9
2.2 Preparo do Meio	9
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	10
3.1 Meio com Lactose e Ureia	10
3.2 Meio com Lactose	10
3.3 Meio com Maltose e Glicose	11
4 CONCLUSÕES	13
REFERÊNCIA	14

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

PRODUÇÃO DE MEIO DE CULTURA CROMOGÊNICO PARA INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

PRODUCTION OF CHROMOGENIC CULTURE MEDIA FOR URINARY TRACT INFECTION

Maria Luiza C. de Oliveira^a; Ernane Gerre Pereira Bastos^b

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP, Av. Joaquim Teotônio Segurado,
1501 – Plano Diretor Expansão Sul, Palmas-TO, 77019-900,
malucavalcante7@gmail.com

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP, Av. Joaquim Teotônio Segurado,
1501 – Plano Diretor Expansão Sul, Palmas-TO, 77019-900, bastos@ceulp.edu.br.

Resumo

As infecções do trato urinário em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs) podem ser causadas por várias bactérias, sendo algumas mais comuns do que outras. As bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* possuem uma capacidade de causar infecções urinárias mais graves em pacientes com o sistema imunológico comprometido. Portanto, para uma identificação mais rápida dessas bactérias e agilizar o diagnóstico e tratamento adequado, necessita de uma metodologia que inclua essas características. O objetivo desse trabalho foi produzir meio de cultura cromogênico em tri-placa destinado as UTIs seletivo para 3 tipos de bactérias que causam infecções urinárias. O desenvolvimento do meio foi realizado através de uma solução base, quatro tipo de açúcares e três tipos de indicadores de pH, obtendo viragem de cor das três bactérias utilizadas no trabalho. A *K. pneumoniae* apresentou coloração roxa com fermentação de Lactose no meio com Cristal Violeta, a *E. coli* apresentou coloração incolor com fermentação de Lactose e Ureia no meio com Phenol Red Broth Base e, a *Enterococcus faecalis* apresentou coloração alaranjado com fermentação da Maltose e Glicose no meio com Azul de Timol. Desta forma, o meio cromogênico é uma ferramenta valiosa por distinguir diferentes espécies bacterianas com base nas

colorações específicas que elas produzem, podendo acelerar o processo de diagnóstico permitindo uma identificação mais rápida e uma seleção adequada de antibióticos.

Palavras-chave: Bactérias; Fermentação; Infecção Urinária; Meio de Cultura Cromogênico.

Abstract

Urinary tract infections in Intensive Care Units (ICUs) can be caused by several bacteria, some more common than others. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* bacteria have the ability to cause more severe urinary tract infections in patients with compromised immune systems. Therefore, for a faster identification of these bacteria and to speed up the diagnosis and adequate treatment, a methodology that includes these characteristics is needed. The aim of this work was to produce a tri-plate chromogenic culture medium for ICUs selective for 3 types of bacteria that cause urinary tract infections. The development of the medium was carried out using a base solution, four types of sugars and three types of pH indicators, obtaining a color change of the three bacteria used in the work. *K. pneumoniae* showed purple color with Lactose fermentation in the medium with Crystal Violet, *E. coli* showed colorless color with Lactose and Urea fermentation in the medium with Phenol Red Broth Base, and *Enterococcus faecalis* showed orange color with Maltose and Glucose in the middle with Thymol Blue. In this way, the chromogenic medium is a valuable tool for distinguishing different bacterial species based on the specific stains they produce, which can accelerate the diagnostic process allowing for faster identification and adequate selection of antibiotics.

Keywords: Bacteria; Fermentation; Urinary Infection; Chromogenic Culture Medium.

1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) ocorrem por meio da invasão tecidual incluindo a uretra, bexiga, ureteres e rins. Patógenos do gênero Gram-negativas como: *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* e do gênero Gram-positivas como *Enterococcus faecalis* podem causar infecção no trato urinário. A bactéria *E. coli* é encontrada em infecções de UTIs, por migrar para o trato urinário causando

infecções quando há uma oportunidade, no caso de uma cateterização urinária. A bactéria *K. pneumoniae* pode causar infecções oportunistas quando há um comprometimento da imunidade ou uso prolongado de cateteres urinários. A bactéria *E. faecalis* habita normalmente o trato gastrointestinal e pode causar infecções do trato urinário, uma vez que percorre o organismo do paciente. (MICROBIOLOGIA..., 2013).

Em uma rotina laboratorial utiliza-se de métodos manuais envolvendo substratos, provas bioquímicas, indicadores de pH e açúcares como: lactose, ureia, glicose, maltose e outros, os quais são incorporados a um ágar para um meio de cultura final. As bactérias podem ser identificadas por meio de características morfológicas (tamanho, forma, arranjo e estrutura) moleculares, celulares, metabólicos, sorológicos, fisiológicos, taxonômicos e ações patogênicas no organismo. A capacidade de metabolizar açúcares específicos, usando um indicador de pH na composição do meio de cultura auxilia na coloração que cada bactéria produz ao entrar em contato com os substratos fermentadores, analisados microscopicamente, podendo gerar uma identificação (PESTANA, OVRUSKI, FERNÁNDEZ et al., 1991).

O trato urinário é o segundo local mais comum de infecção em pacientes nas UTIs. Essa infecção bacteriana pode ter graus leves, moderados ou graves dependendo do grau e tempo de exposição do paciente. Sendo necessário a identificação a partir do isolamento das mesmas, presentes no trato urinário dos pacientes, para contribuir no tratamento e direcionamento junto com os antibióticos terapêuticos corretos (SANTOS e FELGUEIRA et al., 2014).

Técnicas rápidas de identificação como o sistema Bactray composto por 3 conjuntos de provas bioquímicas, denominados Bactray I, II e III, que totalizam 30 substratos destinado à identificação de bacilos gram negativos oxidase negativo, fermentadores ou não da glicose e bacilos gram negativos oxidase positiva não fermentadores da glicose. Para a identificação de bacilos gram negativos oxidase negativa utiliza-se o Bactray I e II, para as oxidases positivas é utilizado o Bactray III. Cada conjunto é composto por um suporte de poliestireno descartável que contém 10 compartimentos para execução das provas bioquímicas (SISTEMA..., 2022, p. 1). Outra técnica rápida são os Meios Cromogênicos, através de colorações específicas liberadas pelas colônias por meio de substratos metabolizados pelas enzimas

produzidas pelos microrganismos, permite fazer a identificação presuntiva da espécie (RENYLAB..., 2021). Agilidade na detecção de patógenos bacterianos no organismo e seu perfil de suscetibilidade são essenciais no encaminhamento da terapia apropriada aos pacientes com antimicrobianos.

No entanto, o custo atribuível à resistência bacteriana é complexo, multidimensional e difícil de ser estimado. Estudos voltados para o tema demonstram o impacto dos microrganismos resistentes no aumento dos custos hospitalares globais, não avaliando especificamente os custos extras com o uso dos antimicrobianos, especialmente no cenário nacional (OLIVEIRA et al., 2015).

A pesquisa tem como objetivo desenvolver um Meio de Cultura Cromogênico em tri-placas de Petri, para ser utilizado em UTIs visando crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas específicas que mais causam infecções urinárias, através de uma coloração diferente dos meios conhecido. Dessa maneira, facilita na identificação de bactérias específicas por uma nova viragem de cor, agilizando os diagnósticos e tratamento adequado, excluindo a preparação das provas bioquímicas, facilitando e simplificando as rotinas, além de possuir alta seletividade, especificidade e eficiência.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos Inóculos:

As cepas 1, 3 e 4 das bactérias liofilizadas foram inoculadas em BHI, levadas para a estufa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ a ponto de crescer e se desenvolver. Nos meios Ágar MacConkey e Ágar Cled realizou o semeio das bactérias de crescimento utilizando uma alça de 10ul, a fim de aumentar as colônias de bactérias usadas na pesquisa. Onde esses meios foram incubados na estufa por mais 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Essas bactérias passaram pela metodologia de Coloração de Gram e pela análise microscópica confirmou que os gêneros específicos das cepas usadas na pesquisa são de fato as pré-estabelecidas como Gram-negativas e Gram-positivas.

Com a confirmação das cepas de bactérias, iniciou-se o inóculo nos meios tri-placas descartáveis para executar a pesquisa. Foi utilizado como base o Ágar Nutriente, juntamente com indicadores de pH e os açúcares: Lactose, Ueria, Maltose e Glicose, compondo o meio de cromogênico.

2.2 Preparo dos Meios de Cultura Cromogênico:

Utilizou-se 200ml de água deionizada e 5,6g de pó do Ágar Nutriente como solução base. Os três indicadores de pH (Phenol Red Broth Base = 3,2g, Cristal Violeta = 0,010g e o Azul de Timol = 0,010g). Em seguida, adicionou os açúcares: 2,6g de Lactose, 5ml de Ureia 40%, 5g de Maltose e 5g de Glicose e distribuiu o conteúdo em tri-placas de Petri. Separou duas placas para Controle Negativo e outra para Controle Positivo, incubadas em estufa isolada e fechada por 24h que promove uma temperatura ideal para o crescimento das colônias bacterianas desejadas.

As bactérias do gênero gram-negativas, como: *K. pneumoniae* e *E. coli*, e a bactéria gram-positiva *E. faecalis* foram semeadas em três tipos de meios diferentes compondo a tri-placa. O primeiro a base de Ágar Nutriente, açúcares Lactose e Ureia 40% com indicador de pH Phenol Red Broth Base; o segundo com base de Ágar Nutriente, açúcar Lactose e indicador de pH Cristal de Violeta e; o terceiro a base de Ágar Nutriente, açúcares Maltose e Glicose com o indicador Azul de Timol. As tri-placas foram incubadas em estufa a 35+/-2°C por no mínimo 24 horas a fim de observar o crescimento das colônias bacterianas, para fazer a identificação simultaneamente através da viragem de cor, sem o auxílio de provas bioquímicas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

3.1 Meio com Lactose e Ureia:

A bactéria *E. coli* através do metabolismo pelas enzimas fermenta os açúcares Lactose e Ureia 40% que compõem o meio em tri-placa, o qual foi semeado, reage com o indicador de pH Phenol Red Broth Base liberando colônias com coloração incolor e aspecto seco, após 24 horas.



Imagem 1: Tri-placa com a *E. coli* no primeiro meio com fermentação de Lactose e Ureia 40%. Viragem de cor incolor, após 24 horas.

3.2 Meio com Lactose:

A bactéria *K. pneumoniae* através do metabolismo pelas enzimas fermenta a Lactose que compõe o meio em tri-placa, o qual foi semeado, reage com o indicador de pH Cristal Violeta liberando colônias com coloração roxo/púrpura e aspecto mucóide, após 24 horas.

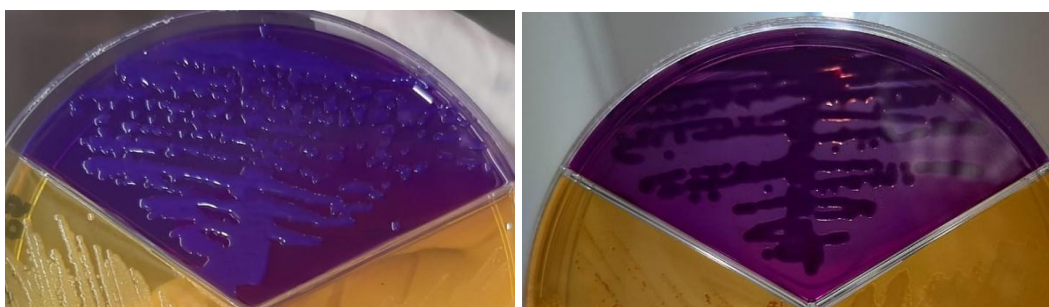


Imagem 2: tri-placa com a *K. pneumoniae* no segundo meio, após 24 horas. Verificação da fermentação de lactose e coloração roxa/púrpura.

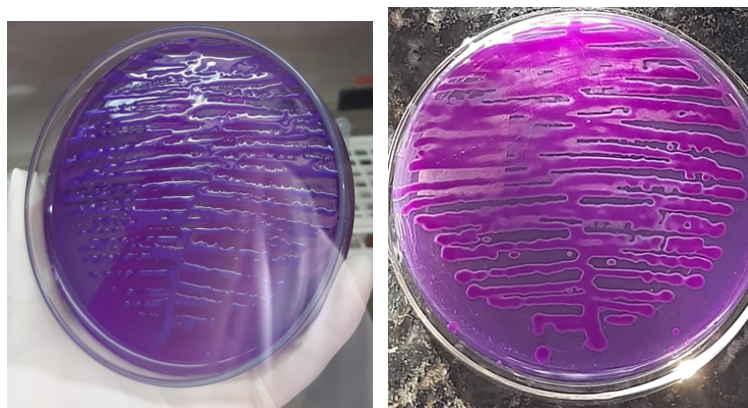


Imagem 2.1: Placa de Petri com a *K. pneumoniae* no segundo meio, após 24 horas. Verificação da fermentação de lactose e coloração roxa/púrpura.

3.3 Meio com Maltose e Glicose:

A bactéria *E. faecalis* através do metabolismo pelas enzimas fermenta os açúcares Maltose e Glicose que compõem o meio em tri-placa, o qual foi semeado, reagindo com o indicador de pH Azul de Timol liberando colônias com coloração alaranjado, após 24 horas.

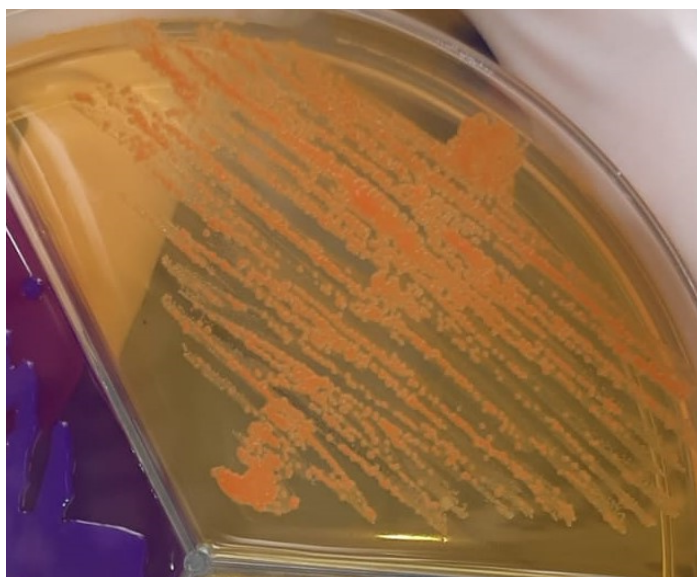


Imagem 3: Tri-placa com o *E. faecalis* no terceiro meio, após 24 horas. Verificação da viragem de cor para alaranjado.

Durante as testagens verificou-se que a *K. pneumoniae* apresenta dois tipos de colorações em dois meios distintos. No meio composto pelo Ágar Nutriente, açúcar Lactose e indicador de pH Cristal de Violeta, as colônias bacterianas apresentaram coloração roxa, como foram mostradas acima e estabelecida para uso na tri-placa. Já no meio composto da mesma base, açúcares como: Lactose e Ureia 40%, e o indicador Phenol Red Broth Base em placa de Petri, as colônias de *K. pneumoniae* apresentaram coloração rosa após 24 horas.

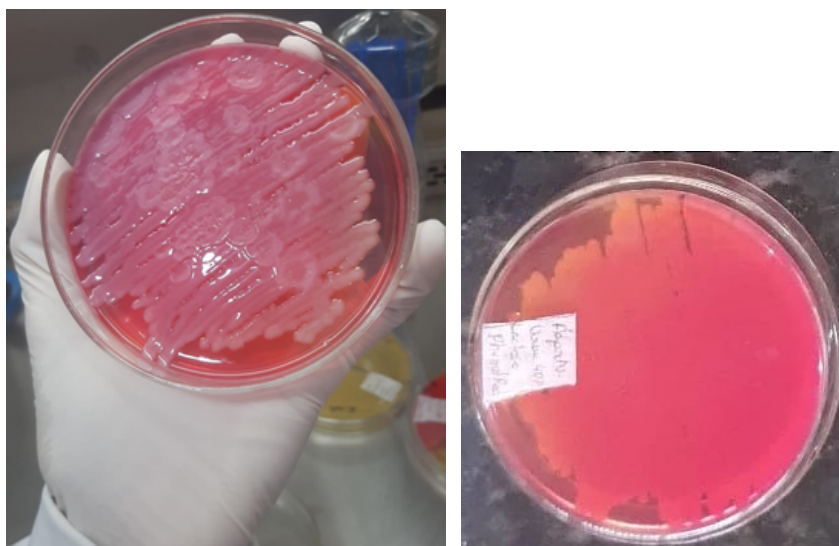


Imagem 4: Placa com a *K. pneumoniae* no primeiro tipo de meio com fermentação de Lactose e Ureia 40%. Viragem de cor para rosa mucoide após 24 horas.

Sendo um método de identificação por viragem de cor através de meio de cultura cromogênico torna a próxima geração dos meios de cultura. Em comparação

com o estudo realizado no laboratório Cendilab, localizado em Curitiba (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006) utilizando meio cromogênico CPS ID3 para identificar bactérias apenas pela coloração no meio, os resultados obtidos na pesquisa são inovadores, devido as colorações obtidas é possível analisar e fazer a identificação bacteriana.

O Ágar coliforme cromogênico-CCA (ÁGAR..., 2015, p. 1) é uma outra composição de meio ágar pronto para uso, utilizado na identificação e diferenciação bacteriana de *E. coli* e bactérias coliformes através de substratos diferentes incorporando o meio, fazendo as enzimas específicas da bactéria formar complexos de cores. Podemos analisar que as reações de viragem de cor no meio cromogênico são de grande facilidade para identificação do microrganismo.

Sendo um estudo realizado para efetivar a comercialização de meio de cultura cromogênico no ambiente laboratorial hospitalar e ambulatorio, traz a associação dos resultados atingido com as bactérias específicas, o qual foram identificadas, fazendo com que em comparação a este estudo, as colorações obtidas na viragem de cor das bactérias que foram selecionadas, estejam associados a função de um meio cromogênico.

Com os resultados obtidos por meio dos indicadores, açúcares e o meio utilizados na solução base, em comparação simultaneamente das bactérias e as colorações pelos métodos já empregados, será possível comprovar sua eficácia dentro da identificação bacteriana em 24 horas. A fim de agilizar o diagnóstico dos pacientes de UTIs e diminuir a demora de identificação das bactérias. Vale ressaltar que novos indicadores de pH e reagentes devem ser testados, por não ter sido possível serem testados nesta pesquisa.

4 CONCLUSÕES

A identificação de patógenos bacterianos e a avaliação de sua suscetibilidade fornecem informações importantes para o uso racional de antimicrobianos e reduzir a taxa de mortalidade. Levando em consideração os resultados obtidos foi possível demonstrar a objetividade do método em meios de cultura cromogênico para o crescimento das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas em 24 horas, considerando que houve fermentação dos açúcares em tri-placa, possibilitando a identificação das bactérias pela coloração.

Sendo uma nova forma de identificação realizada de uma metodologia usualmente em alguns laboratórios atualmente, os meios de cultura cromogênico com novos indicadores e açúcares diferentes compondo uma nova base em tri-placa tendem a ser de grande praticidade. Pois seguem o método de análise de viragem de cor e aspecto, que facilita e simplifica a análise simultaneamente em tri-placa, proporcionando resultados mais rápidos e precisos na detecção de patógenos e indicadores, com alta seletividade, especificidade e eficiência, facilitando e simplificando as rotinas, devido ao princípio ser baseado em substratos cromogênicos específicos para cada microrganismo alvo. O custo para desenvolvimento e comercialização do Meio de Cultura Cromogênico será de R\$3000,00 o frasco com 500g.

REFERÊNCIA

ÁGAR coliforme cromogênico (CCA). **DOHLER**, [S. l.], p. 1-3, 21 Jan. 2015.
Disponível em:
<https://www.doehler.com/pt/nosso-portfolio/solucoes-integradas/solucoes-de-servico/meios-de-cultura-microbiologicos/portfolio-de-produtos-dmdr/agar-coliforme-cromogenico-iso.html>

AVILA, Mario Julio *et al.* Introdução à Microbiologia, 2016.
Disponível em:
http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/arquivos/Aulas/Introducao_Microbiologia_Texto.pdf

OLIVEIRA, Bernardo Gabriel *et al.* A IDENTIFICAÇÃO Direta Pelos Meios Cromogênicos é Confiável a Ponto de Dispensar as Provas Bioquímicas? **MEIOS CROMOG.pdf**, [S. l.], p. 1-8, 6 jun. 2006.

LABORCLIN. **SISTEMA BACTRAY**, [S. l.], p. 1-7, 15 nov. 2022.

MASSON, Letícia Carrijo; MARTINS, Luíza Vieira; GOMES, Clayson Moura; CARDOSO, Alessandra Marques. **Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: relação entre a urocultura e o eas**. 10 f. Artigo – Curso de Biomedicina, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2019.

MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas**, [S. l.], 2013.

Oliveira ac et al. Custos com antimicrobianos no tratamento de pacientes com infecção. Artículo de Investigación. 2015. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/09/102609/custos-com-antimicrobianos-no-tratamento-de-pacientes-com-infeccao.pdf>

SANTOS, Josiane Bitencourt; FELGUEIRA, Mariana Pavanelli *et al.* Urinary infection in patients of public health care of Campo Mourão-PR, Brasil: bacterial prevalence and sensitivity profile. **Artigo Scielo**, Sep-Oct 2014.