

AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM CHROMAGAR ORIENTATION E COM OS MEIOS USUAIS COMO O ÁGAR MAC CONKEY, ÁGAR CLED, ÁGAR SANGUE NO ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS E GRAM POSITIVAS NAS INFECÇÕES DO TRATO URINÁRIO, NO QUE DIZ RESPEITO À IDENTIFICAÇÃO, ECONOMIA DE TRABALHO E CUSTOS DE UTILIZAÇÃO DE CADA MÉTODO.

Luiz Antônio Ximenes

RESUMO

O meio de cultura cromogênico é um meio que possuem na sua formulação uma série de substratos cromogênicos. As bactérias possuem enzimas que dividem estes substratos, dando origem a compostos coloridos que diferenciam as colônias pela cor que elas adquirem quando em cultura neste meio. O Chromagar orientation é um meio de cultura não seletivo para isolar, identificar diretamente e contar as bactérias presentes em um material biológico. Como na maioria dos laboratórios de microbiologia a urina representa a maioria dos materiais biológicos, qualquer economia em trabalho de identificação e economia de reagentes representa um grande efeito em relação à rapidez dos resultados e também sobre os custos do laboratório. O Chromagar Orientation permite a identificação de bacilos gram negativos como a Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae e Proteus mirabilis, bem como cocos gram positivos como o Estafilococos aureus, Estafilococos epidermidis e o Enterococos faecalis, que causam ITU, com uma única placa, sem a necessidade de realizar os testes de confirmação. O objetivo deste trabalho prático foi de avaliar o desempenho do Chromagar Orientation na rotina laboratorial de cultura de urina, bem como o seu custo benefício em relação aos meios usuais. Para realizar este trabalho usamos cepas de bactérias da ATCC, as quais foram semeadas nos meios Chromagar Orientation, Cled, Mac Conkey e ágar sangue e identificadas por dois sistemas de identificação presuntiva no caso dos bacilos gram negativos e testes de confirmação para o cocos gram positivos. A conclusão deste trabalho foi de que o Chromagar Orientation possui vantagens em relação aos outros meios de cultura em relação ao isolamento e identificação de bactérias e também quanto aos custos para o laboratório.

Palavras chaves: Chromagar Orientation. Desempenho. Custos.

Artigo de conclusão de curso de pós-graduação em Análises Clínicas e Moleculares (novembro de 2008 a dezembro de 2009).

Endereço para correspondência: AC&T: Rua Bomfá Natale, 1860. CEP 15020-130. São José do Rio Preto – SP.

Email: a.c.t.@terra.com.br

INTRODUÇÃO

Os laboratórios de análises clínicas na sua rotina bacteriológica utilizam-se diversos meios de cultura para o isolamento de bactérias do trato urinário.

Os meios ágar Mac Conkey e Cled são utilizados para o isolamento de bacilos gram negativos e após este isolamento usa-se meios de cultura de identificação presuntiva ou sistemas de triagem bioquímica para a identificação destes bacilos gram negativos.

Os meios de Cled e ágar sangue são utilizados para o isolamento de cocos gram positivos e após este isolamento são usados testes de confirmação para identificá-los.

A introdução do Chromagar Orientation nesta rotina foi com a finalidade de substituir os meios tradicionais para agilizar o isolamento e a identificação das bactérias bem como verificar o custo do mesmo em relação aos demais meios de cultura.

Todos os meios de cultura foram semeados com cepas da ATCC para o seu isolamento e as colônias desenvolvidas foram submetidas à identificação presuntiva pelos meios de cultura e sistemas bioquímicos e testes de confirmação para identificar as bactérias das referidas cepas.

MATERIAL E MÉTODOS:

CHROMAGAR ORIENTATION - DIFCO. Lote 8350975. Validade 31/10/2010.

Modo de preparo: Dissolver 32,2 g em 1 litro de água destilada. Autoclavar 121° C – 15 minutos. Dispensar em placas descartáveis de 90 x 4 mm.

ÁGAR MAC CONKEY – NEWPROV. Código MCF03. Lote 57096. Validade Dezembro 2010. Placas de 90 x 4 mm.

ÁGAR CLED – NEWPROV. Código MCF01. Lote 57151. Validade Dezembro 2010. Placas de 90 x 4 mm.

ÁGAR SANGUE - NEWPROV. Código 724. Lote 20625. Validade. Agosto de 2009. Placas de 90 x 4 mm.

CALDO TRÍPTICO DE SOJA (TSB) – NEWPROV. Código MCT26. Lote 19969. Validade Março 2010. Tubos de 4 ml.

ÁGAR BILE ESCULINA – NEWPROV. Código MCT01. Lote 16528. Validade Dezembro 2009.Tubos com o ágar inclinado.

MTS – NEWPROV. Código. MCT 34. Lote 19657. Validade. Março 2010.

MEIO DE RUGAI COM LISINA – NEWPROV. Código MCT37. Lote 8707. Validade Junho 2009. Tubos com 6,5 ml de meio de Rugai com Lisina.

BACITRACINA-NEWPROV. Código DR101. Lote 57045. Validade 2011. Frasco com 25 discos.

OXIDASE-TIRAS – NEWPROV. Código 1022. Lote 57005. Validade Maio de 2010. Frasco com 10 tiras.

OPTOQUINA-NEWPROV. Código DRI06. Lote 55610. Validade Novembro 2010. Frascos com 25 discos.

NOVOBIOCINA- DME SENSIDISC. Lote 1589. Validade Maio 2010.

SLIDEZ STAPH PLUS – BIOMÉRIEUX. Referência 73115CE. Lote maio 2010.

STAPHY TEST – PROBAC DO BRASIL. Lote STAF 049. Validade ABRIL 2010.

BACTRAY 1 – LABORCLIN. Código 880108. Lote 90804026. Validade Julho 2010.

BACTRAY 2 – LABORCLIN. Código 880109. Lote 90713001. Validade Julho 2010.

HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO-LABORCLIN. Código 880103. Lote 90708049. Validade Julho 2010.

ÓLEO MINERAL-LABORCLIN. Código 880104. Lote 90706034. Validade Julho 2010.

REATIVO KOVACS-LABORCLIN. Código 571004. Lote 90512039. Validade Maio 2010.

CLORETO FÉRRICO 10 %-LABORCLIN. Código 880102. Lote 90708048. Validade Julho 2010.

ALFA-NAFTOL-LABORCLIN. Código 880101. Lote 90708047. Validade Julho 2010.

ENTEROBACTER CLOACAE DERIVADA DA ATCC 13043. Código MPE 25. Lote 56508. Validade Março 2011.

KLEBSIELLA PNEUMONIAE DERIVADA DA ATCC 13883. Código MPE 07. Lote 56296. Validade Fevereiro 2011.

ESCHERICHIA COLI DERIVADA DA ATCC 25922. Código MPE 01. Lote 56509. Validade Março 2011. **PROTEUS MIRABILIS DERIVADA DA ATCC 25933.** Código MPE 12. Lote 56180. Validade Janeiro 2011.

PROTEUS MIRABILIS DERIVADA DA ATCC 25933. Código MPE 12. Lote 56180. Validade Janeiro 2011.

ENTEROCOCCUS FAECALIS DERIVADA DA ATCC 19433. Código MPE 10. Lote 54545. Validade Junho 2010.

STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS DERIVADA DA ATCC 12228. Código MPE 19. Lote 56256. Validade Fevereiro 2011.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS DERIVADA DA ATCC 25923. Código MPE 04. Lote 56138. Validade janeiro 2011.

A avaliação dos referidos meios de cultura foram feito com cepas de bactérias derivadas da ATCC, conforme descrevemos:

Preparação dos inoculo das cepas de Escherichia coli ATCC 25922, Proteus mirabilis ATCC 25933, Enterobacter ATCC13043, Klebsiella pneumoniae ATCC 13883, Enterococcus faecalis ATCC 19433, Staphylococcus aureus ATCC 25923, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228

1º dia: passou-se um liofilizado da cepa, com o auxílio de uma pinça esterilizada, para um frasco com 4ml de caldo TSB e incubado por uma noite (“ overnight ”) a 35°C em estufa de cultura.

2º dia: passou-se 1 alçada de 1:100 para 4 ml de caldo TSB por uma noite a 35° C em estufa de cultura.

3º dia: repetiu-se a operação anterior por mais uma noite.

Semeadura das bactérias nos meios de culturas para seu isolamento e identificação:

4º dia:

I) Com uma alça descartável de 1:100 semeou-se por esgotamento nas placas de ágar CLED, Mac Conkey e Chromagar Orientation as bactérias (bacilos) gram negativas e incubou-se a 35° C por 24 horas em estufa de cultura.



CLED



MAC CONKEY



CHROMAGAR ORIENTATION

Verificação das características das colônias:

Após análise do crescimento nos diferentes meios de cultura empregados, observamos as características das colônias nesses meios.

Características das bactérias gram negativas no meio de CLED:

Bactérias	Características das colônias
Escherichia coli	grandes, onduladas, amarelas, secas e opacas
Proteus mirabilis	médias, onduladas, azuis e translúcidas
Enterobacter cloacae	grandes, onduladas, amarelas, mucóides brilhantes
Klesiella pneumoniae	grandes, amarelas, onduladas, mucóides e brilhosas

Características das bactérias gram negativas no meio de Mac Conkey:

Bactérias	Características das colônias
Escherichia coli	grandes, róseas, secas e opacas
Proteus mirabilis	incolors, onduladas e translúcidas
Enterobacter cloacae	grandes, amarelas, onduladas, mucóides e brilhosas
Klesiella pneumoniae	grandes, róseas, mucóides e translúcidas

Características das bactérias gram negativas no meio CHROMAGAR ORIENTATION:

Bactérias	Características das colônias
Escherichia coli	Colônias grandes, róseas, onduladas
Klebsiella pneumoniae	Colônias grandes, verde escuras
Enterobacter cloacae	Colônias grandes, verde azuladas
Proteus mirabilis	Colônias pequenas, translúcidas



Escherichia coli



klebsiella pneumoniae



Enterobacter cloacae



Proteus mirabilis

PROVA DA OXIDASE: para identificação das colônias de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter cloacae* das placas semeadas para confirmação que pertencem a família das enterobacteriaceae: Todas as colônias deram resultado : Negativo



Identificação presuntiva das colônias das bactérias presentes nas placas de ágar MAC CONKEY, CLED e CRHOMAGAR ORIENTATION:

1) Identificação com o meio de Rugai com Lisina:



Meio original de Rugai com Lisina

Parte superior: meio de Rugai

Parte central: cera de Vascar

Parte inferior: meio de Líxina

Inoculação: Com uma alça bacteriológica coletou-se a colônia de cada uma das placas e inoculou-se através de uma picada até o fundo e estrias na superfície do meio de Rugai:

a) Identificação de colônias de Escherichia coli de crescimento nos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation:



Indol = Positivo
 LTD= Negativo
 Sacarose= Positiva
 Glicose= Positivo
 Gás= Positivo
 Uréia= Negativo
 H2S= Negativo
 Líxina=Positivo
 Motilidade=Positivo

O comportamento bioquímico da Escherichia coli no meio de Rugai com Líxina foi idêntico para as colônias dos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation.

b) Identificação de colônias de Enterobacter cloacae de crescimento nos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation



Indol= Negativo
 LTD=Negativo
 Sacarose=Positivo
 Glicose=Positivo
 Gás=Positivo
 Uréia=Negativo
 H₂S=Negativo
 Lisina=Negativo
 Motilidade=Positivo

O comportamento bioquímico da Enterobacter cloacae no meio de Rugai com Lisina foi idêntico para as colônias dos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation.

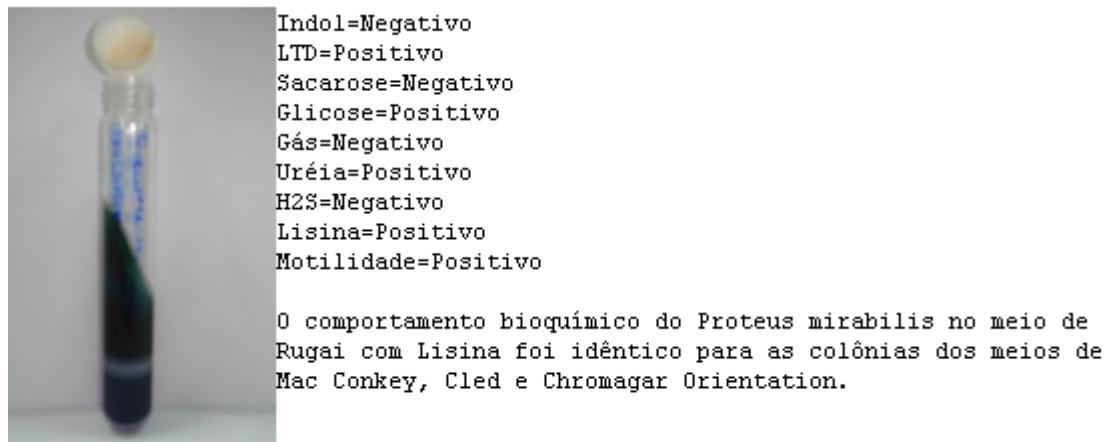
c) Identificação de colônias de Klebsiella pneumoniae de crescimento nos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation:



Indol=Negativo
 LTD=Negativo
 Sacarose=Positivo
 Glicose=Positivo
 Gás=Positivo
 H₂S=Negativo
 Lisina=Positivo
 Motilidade=Negativo

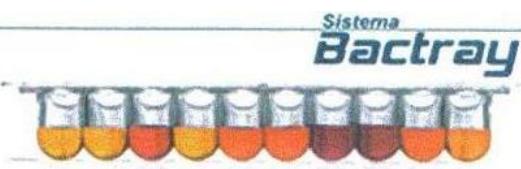
O comportamento bioquímico da Klebsiella pneumoniae no meio de Rugai com Lisina foi idêntico para as colônias dos meios de Mac Conkey, Cled e Chromagar Orientation

d) Identificação de colônias de Proteus mirabilis de crescimento nos meios de Mac Conkey,Cled e Chromagar Orientation:



2) Identificação com o sistema de identificação Bactray I e Bactray II :

a) Identificação das colônias de *Escherichia coli* dos meios de Cled, Mac ConKey e Chromagar Orientation



7541421

ESCHERICHIA COLI

7541421 Perfil Bactray I: ONPG+ ADH+ LDH+ ODC+ H2S- URE+ VP- PD- IND+ CIT+
 Perfil Bactray II: MAL- RHA- ADO- SAL- ARA+ INO- SOR+ SAC- MAN+ RAF-

Percentual	Proporção
100,00%	1:191.408 Excelente

b) Identificação das colônias de *Proteus mirabilis* dos meios de Cled, Mac Conkey, Chromagar orientation



0711000

PROTEUS MIRABILIS

0711000 Perfil Bactray I: ONPG- ADH- LDH- ODC+ H2S+ URE+ VP+ PD- IND- CIT+
Perfil Bactray II: MAL- RHA- ADO- SAL- ARA- INO- SOR- SAC- MAN- RAF-

	Percentual	Proporção
	100,00%	1:49 Excelente

3) Identificação das colônias de *Klebsiella pneumoniae* dos meios de Cled, Mac Conkey, Chromagar Orientation.



Sistema
Bactray



5417773

KLEBSIELLA

5417773 Perfil Bactray I: ONPG+ ADH- LDH+ ODC- H2S- URE+ VP+ PD- IND- CIT+
 Perfil Bactray II: MAL+ RHA+ ADO+ SAL+ ARA+ INO+ SOR+ SAC+ MAN+ RAF+

	Percentual	Proporção
INIAE	98,86%	1:1 Boa

4) Identificação das colônias de Enterobacter cloacae dos meios de Cled, Mac Conkey, Chromagar Orientation.



Sistema
Bactray



: 3513673

: ENTEROBACTERO CLOACAE

: 3513673 Perfil Bactray I: ONPG+ ADH+ LDH- ODC+ H2S- URE+ VP+ PD- IND- CIT+
 Perfil Bactray II: MAL+ RHA- ADO- SAL+ ARA+ INO+ SOR+ SAC+ MAN+ RAF+

	Percentual	Proporção
LOACAE	100,00%	1:65 Excelente

A identificação presuntiva das colônias de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* pelo sistema Bactray I e II apresentaram os mesmos resultados.

II) As bactérias gram (cocos) positivas foram semeadas em ágar sangue, Cled e Chromagar Orientation com alça descartável de 1:100 por esgotamento e incubadas a 35º C por 24 horas em estufa de cultura.



Ágar sangue



Cled



Chromagar Orientation

Verificação das características das colônias:

Após análise do crescimento nos diferentes meios de cultura empregados, observamos as características das colônias nesses meios:

Características dos cocos gram positivos no meio de Cled:

Bactérias	Características das colônias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pequenas a médias e amarelas
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pequenas a médias, amarelas e opacas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Pequenas, amarelas e opacas

Características dos cocos gram positivos no meio de ágar sangue:

Bactérias	Características das colônias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pequenas, brancas, com hemólise beta
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pequenas, brancas e não hemolíticas
<i>Enterococcus faecalis</i>	Pequenas, brancas , hemólise alfa,gama

Características dos cocos gram positivos no meio de Chromagar Orientation:

Bactérias	Características das colônias
Staphylococcus aureus	Pequenas e brancas
Staphylococcus epidermidis	Pequenas e brancas
Enterococcus faecalis	Pequenas e azuis



Estafilococos aureus



Estafilococos epidermidis



Enterococos faecalis

Testes de confirmação para a identificação de cocos gram positivos:

I) Prova da Catalase



Prova da catalase: Positiva: para estafilococos aureus e epidermidis



Negativa: para enterococos faecalis

II) Teste da coagulase:

Slidex Staph Plus



Testes de resultados idênticos para as colônias e estafilococos aureus dos meios de Cled, Ágar Sangue e Chromagar Orientation

III) Teste da Novobiocina:



Teste confirmatório de estafilococos epidermidis, idênticos para as colônias de estafilococos epidermidis dos meios de ágar sangue, Cled e Chromagar Orientation

I) Teste da Bile esculina:



Teste confirmatório de Enterococos faecalis para todas as colônias de enterococos faecalis dos meios de Cled, Ágar Sangue e Chromagar Orientation.

CONCLUSÃO:

Os resultados deste trabalho prático mostram que o Chromagar Orientation é uma alternativa eficiente à rotina para a cultura de amostras de urina.

Em relação a infecção urinária por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis* a identificação é feita pela simples análise da cor das colônias não havendo necessidade de teste confirmatórios. O que gera uma economia de 24 horas no tempo de identificação



Em relação a infecção urinária por estafilococos aureus, estafilococos epidermidis , há a necessidade de testes confirmatórios. Para estafilococos faz-se uma bacterioscopia pelo gram, prova da catalase, prova da coagulase e prova da novobiocina.

O enterococos faecalis é identificado facilmente por apresentar colônias pequenas e azuis.

Concluímos que em relação ao tempo de identificação destas bactérias o Chromagar Orientation apresenta uma economia de 24 horas.

Quanto à análise de custos, foram calculados, para a identificação pelos meios convencionais e pelo Chromagar Orientation, obtendo-se os seguintes resultados:

- a) Identificação de bacilos gram negativos fermentadores pelo meio de Cled e pelo meio de Rugai com Lisina: R\$ 6,43.
- b) Identificação de bacilos gram negativos fermentadores pelo meio de Mac Conkey e pelo meio de Rugai com Lisina: R\$ 6,45.
- c) Identificação de bacilos gram negativos fermentadores pelo meio de Cled e pelo Bactray I e II: R\$ 16,23.
- d) Identificação de bacilos gram negativos fermentadores pelo meio de Mac Conkey e Bactray I e II: R\$ 16,25.
- e) Identificação de bacilos gram fermentadores negativos pelo meio de Chromagar Orientation: R\$ 2,00.
- f) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Cled e testes confirmatórios para Estafilococos aureus: R\$ 5,06.
- g) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Agar Sangue e testes confirmatórios para Estafilococos aureus: R\$ 6,10
- h) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Cled e testes confirmatórios para Estafilococos epidermidis : R\$ 5,29.
- i) Identificação de cocos gram positivos pelo meio Agar Sangue e testes confirmatórios para Estafilococos epidermidis : R\$ 6,33.
- j) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Cled e testes confirmatórios para Enterococos : R\$ 3,84.
- k) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Agar Sangue e testes confirmatórios para enterococos: R\$ 4,88.
- l) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Chromagar Orientation e testes confirmatórios para estafilococos aureus: R\$ 4,95.
- m) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Chromagar Orientation e testes confirmatórios para Estafilococos epidermidis: R\$ 5,18

- n) Identificação de cocos gram positivos pelo meio de Chromagar Orientation para enterococos: R\$ 1,95.

Além da economia de tempo para identificação, o Chromagar Orientation apresenta um custo mais econômico que os demais meios.

Portanto, para um serviço microbiologia que possui um movimento razoável, a implantação do Chromagar Orientation representa uma alternativa eficiente à rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Koneman, Diagnóstico Microbiológico, Guanabara Koogan, São Paulo, 6^a edição, 2008.

Trabulsi Alterthum F., Microbiologia, Atheneu, São Paulo, 4^a edição, 2004

Manual Newprov de Microbiologia, Microscience, Curitiba, 2002, Albini C.A.; Souza H.A.P.M.; Pereira S.M.