PÓS- GRADUAÇÃO “lato sensu” EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS ADOTADOS PARA O DIAGNÓSTICO DE COCOS GRAM-POSITIVOS EM URINAS

Fernanda de Oliveira Borges[1]

Margarete Teresa Gottardo de Almeida[2]

[1]Biomedica, Pós-Graduanda “Lato-Sensu” em Microbiologia Clínica - Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto - SP.

[2] Bióloga, Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Professora Adjunto da FAMERP, docente e orientadora do Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, docente da Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto – SP.

RESUMO

Uma das infecções mais comumente relatadas na clinica médica é a infecção do trato urinário (ITU), As ITU acometem homens e mulheres em qualquer idade, atingido mais as mulheres devido às condições anatômicas: uretra mais curta e a sua maior proximidade com a vagina e o ânus.As bactérias Gram-negativas são as maiores causadoras das infecções urinarias, tendo como micro-organismo invasor mais comum a *Escherichia coli*, estando presente em cerca de 80% a 90% das infecções bacterianas agudas não-complicadas. Para realizar a analise qualitativa primeiro realiza-se o exame físico. A urocultura é realizada quando se quer saber qual tipo de micro-organismo esta colonizando as vias urinarias.

OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo explorar a microbiologia, pesquisando quaistipos de provas bioquímicas podem ser usadas na determinação do diagnostico de infecções do trato urinário para cocos Gram-positivos, diferenciando assim as espécies mais frequentemente encontradas de cocos em ITU.

INTRODUÇAO

Uma das infecções mais comumente relatadas na clinica médica é a infecção do trato urinário (ITU), podendo comprometer tanto o trato urinário baixo, diagnosticando uma cistite, como tambem afetar simultaneamente o trato urinário inferior e superior, denominando assim uma pielonefrite, quando a invasão microbiana ocorre da uretra até os rins. Podem ocorrer com ou sem sintomas, sendo conhecido assim como bacteriúria assintomática. (SATOat al., 2005; SILVA at al., 2008.)

As ITU acometem homens e mulheres em qualquer idade, atingido mais as mulheres devido as condições anatômicas: uretra mais curta e a sua maior proximidade com a vagina e o ânus. Outros grupos mais susceptíveis são recém-nascidos do sexo masculino, homens com obstrução prostática, mulheres jovens sexualmente ativos, e idosos de ambos os sexos.(SATO at al., 2005; SILVA at al., 2008.)

As bactérias Gram-negativas são as maiores causadoras das infecções urinarias, tendo como micro-organismo invasor mais comum a *Escherichia coli*, estando presente em cerca de 80% a 90% das infecções bacterianas agudas não-complicadas. O *Staphylococcussp* pode ser responsável por 10% a 20% dos casos de ITU, *Enterococcussp* também são comuns. (SATO at al., 2005.)

No diagnostico de uma infecção do trato urinário as técnicas laboratoriais mais empregadas incluem a análise qualitativa (sedimentoscopia) e a cultura de urina (urocultura), sendo o ultimo método considerado padrão-ouro para o diagnóstico de ITU. (SATO at al., 2005.)

Para realizar a analise qualitativa primeiro realiza-se o exame físico da urina: cor, aspecto, volume e densidade. Depois ocorre a analise química: tiras reagentes (pH, proteínas, glicose, cetonas, sangue, bilirrubina, urobilinogênio, nitritos, esterase leucocitária). E por ultimo é realizado o exame microscópico da urina, onde são observados os constituintes do sedimento. (STRASINGERat al., 2009.)

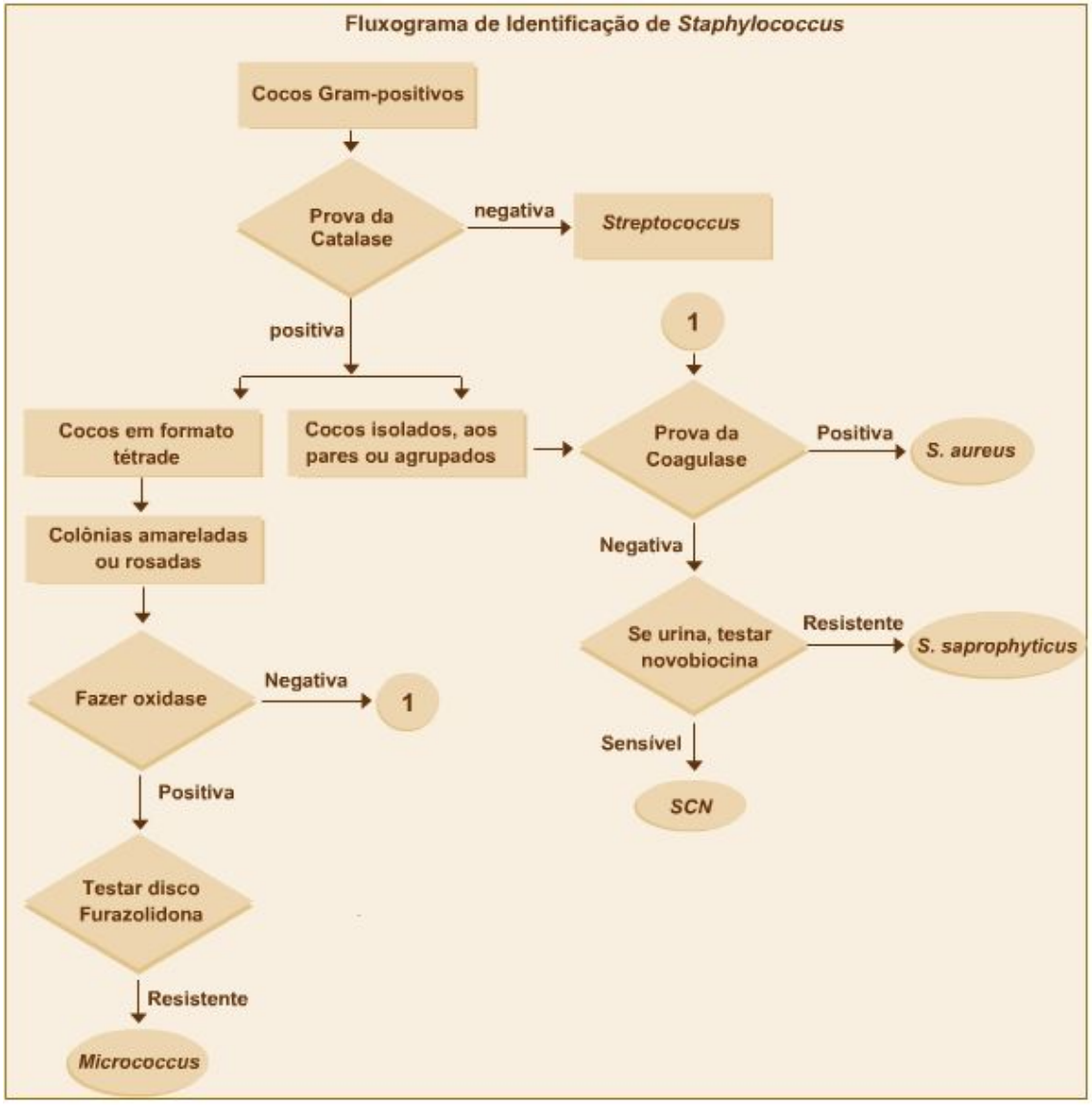
A urocultura é realizada quando se quer saber qual tipo de micro-organismo esta colonizando as vias urinarias, podendo assim isolar a bactéria encontrada e realizar o estudo de sensibilidade e resistência aos antibióticos já previamente estabelecidos para que o medico possa saber qual a melhor terapia a ser aplicada. Para isso são utilizados alguns meios de cultura para isolamento do patógeno, entre eles estão, ágar macconkey, ágar sangue, ágar cromogênico. (SILVA at al., 2008.)

Os cocos Gram-positivos são os micro-organismos de menor ocorrência em ITU, mas são mais difíceis de identificar pela sua maior semelhança entre si. Os mais frequentes em urinas são os estafilococos e enterococos.

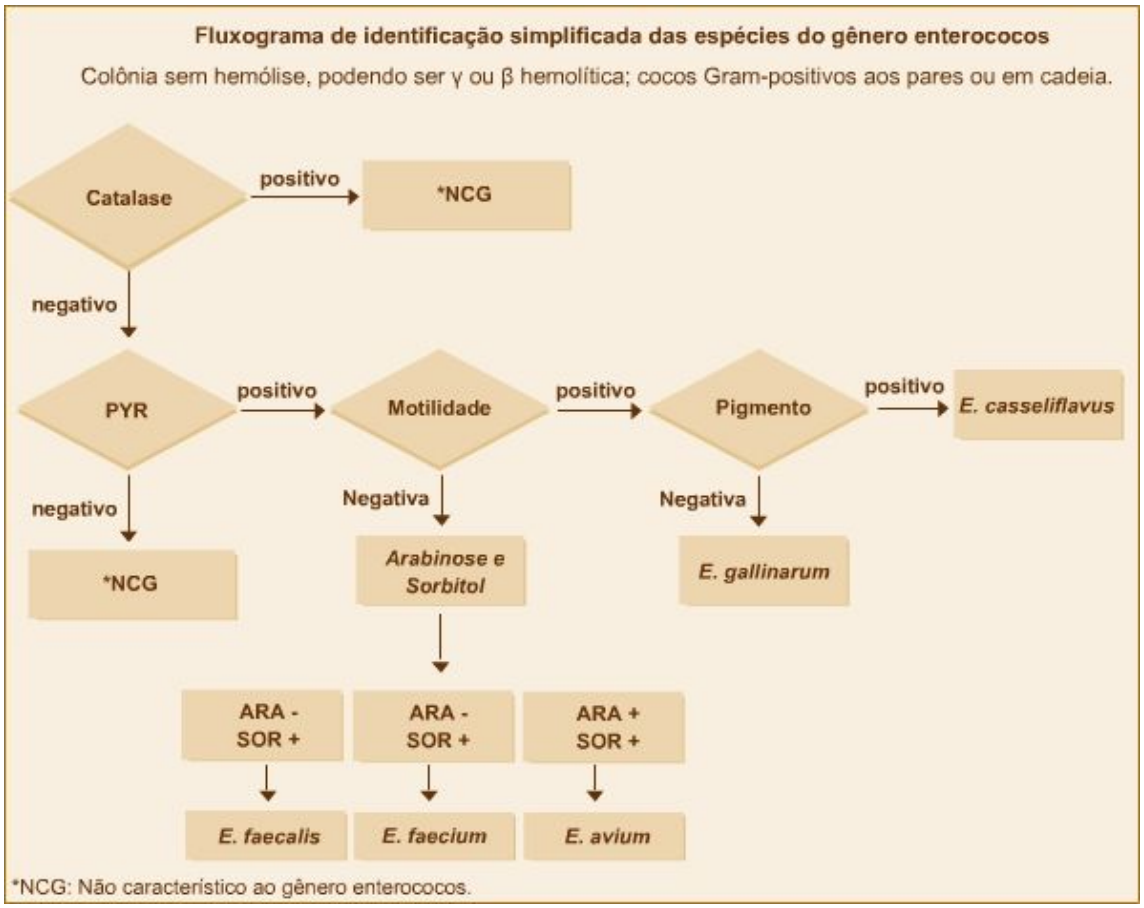
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A identificação preliminar dos enterococos e estafilococos esta baseado na morfologia que cada um apresenta em meios líquidos, sendo os enterococos, uma cadeia normalmente longa e os estafilococos mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados. (NOWAKONSKIat al., 2013.)

Após a distinção dos microorganismos pela sua morfologia devem serrealizados algumas provas bioquímicas para que possa ser feita a identificação correta da família e gênero da bactéria isolada.



Fonte: Anvisa, 2017.



Fonte:Anvisa, 2017.

- **PROVA DA CATALASE**

Consiste na detecção da enzima catalase em bactérias. Esta enzima atua sobre a água oxigenada quebrando suas moléculas, separando assim o oxigênio e a água, esse processo gera a efervescência que mostra positividade ao teste.

Com o auxilio de uma alça bacteriológica estéril coleta-se o centro da colônia suspeita e a transfere para uma lamina de vidro, logo após deve ser colocado uma gota de água oxigenada a 3% e observar a formação de bolhas.

Este teste não deve ser realizado com bactérias isoladas em meio de cultura ágar sangue, já que o sangue presente no meio contém a enzima catalase, levando assim a resultados falso positivo.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

Catalase positivos	Catalase negativos
*Staphylococcus*spp.	*Enterococcus* spp.
Micrococcus spp.	*Streptococcus* spp.
*Planococcus*spp.	*Aerococcus*spp.
*Stomatococcus*spp.	*Gemella*spp., *Leuconostoc*spp.
*Lactococcus*spp.	*Stomatococcus*spp.

Fonte :NOWAKONSKIat al., 2013.

- **PROVA DA CATALASE**

É utilizado para a identificação de espécies patogênicas de *Staphylococcus.* As enzimas coagulases possuem capacidade de reagir com um fator plasmático formando um complexo que atua sobre o fibrogênio formando a fibrina, ocorrendo assim a coagulação do plasma sanguíneo.

Preparar um pool de plasma sanguíneo com EDTA em um tubo, após transfere-se para outro tubo uma quantidade referente a 500µl do pool, com o auxilio de uma alça bacteriológica estéril coleta-se o centro da colônia suspeita e inocula no tubo, incubar o tubo em estufa a 37ºC. Deve ser observada a formação do coáguloàs 2 horas, 6 horas e 24 horas após incubação se houver aparecimento de coágulo a prova é confirmada positiva, se não houver aparecimento de coagulo a prova deve ser confirmada como negativa. (NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DA DNAse**

Através deste teste é possível identificar se a bactéria isolada possui a enzima desoxiribonuclease, que é a responsável por degradar o ácido nucléico (DNA).

Realiza-se com a inoculação de colônias previamente isoladas em um meio contendo DNA. Este teste é positivo quando aparece uma coloração rosa característica ao redor das colônias produtoras de DNAse.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DA NOVOBIOCINA**

É um teste realizado para verificar a resistência da bactéria a novobiocina.

Deve-se semear a cepa isolada da mesma maneira que se realiza o antibiograma em placa de Muller Hinton, acrescentar o disco de novobiocina, incubar a placa em estufa a 37ºC por 24 horas, observar o seu halo de inibição. Amostras resistentes possuem halo de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as sensíveis possuem halos de 16 mm ou mais. (NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DA OXIDASE**

Importante na verificação da produção de enzima oxidase pela bactéria.

Inocular uma colônia isolada da bactéria a ser testada na tira de oxidase (comercial pronto para uso) previamente umedecida com água deionizada. A coloração roxa indica positividade ao teste.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DA BILE ESCULINA**

Tem como finalidade diferenciar *Enterococcus spp*. e*Streptococcusbovis* de *Streptococcus spp*.

Inocula-se as colônias a serem testadas em um meio contendo bile esculina, incubar em estufa a 37ºC por até 72 horas. A presença de cor enegrecida no meio indica hidrolise, isto é uma prova positiva.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DO NaCl 6,5%**

Indica a capacidade do microrganismo crescer em altas concentrações de sal. Tem por finalidade diferenciar *Enterococcus* spp. de *Streptococcus* spp.

Inocula-se as colônias a serem testadas em caldo BHI suplementado com 6,0% de NaCl (com ou sem indicador), incubar em estufa a 37ºC por até 72 horas. A turvação ou mudança de cor (no caso de adição de indicador) é indicativa de crescimento bacteriano (teste positivo).

Somente enterococos são positivos ao teste do NaCl 6,5%.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

- **TESTE DE PYR**

Tem como finalidade determinar a atividade da enzima pyrrolidonilarilamidase produzida pelo *Streptococcuspyogenes.*

Com auxílio de uma pinça, retirar um disco de PYR do frasco e colocá-lo sobre uma lâmina, pingar uma gota de água destilada estéril e realizar um esfregaço com a bactéria a ser testada, previamente isolada, sobre o disco de PYR umedecido, aguardar alguns minutos e colocar uma gota do reagente PYR. A reação ocorrerá em até 1 minuto. O aparecimento da cor vermelha indica um teste positivo.

Streptococcuspyogenes e *Enterococcus* spp. são PYR positivos.(NOWAKONSKIat al., 2013; Anvisa, 2017.)

CONCLUSÃO

A identificação correta dos microorganismos isolados nas ITU é de importância fundamental, através dessa identificação conseguimos direcionar quais antibióticos devem ser testados, levando a uma melhor escolha da terapia a ser administrada pelo paciente. Este trabalho procurou informar através de uma revisão bibliográfica, quais são os métodos mais utilizados para a diferenciação e identificação dos cocos Gram-positivos, tentando assim diminuir a margem de erros de identificação dessas bactérias.

REFERÊNCIA

SATO, A. F.; SVIDZINSKI, A. E.; CONSOLARO, M. E. L.; BOER, C. G. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos gram-positivos. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 397-404, Dec. 2005.

SILVA, C. H. P. M. Urocultura: Parte 3. In: _____. Protocolos de Microbiologia Clínica. Vila Velha: Newslab, 2008. Ed. 88, p. 132-137.

NOWAKONSKI, A. V.; MAMIZUKA, E. M. Estafilococos, Estreptococos, Enterococos e outros. In: MORENO, C. R. M.; GUARALDI, A. L. M.; NOWAKONSKI, A. V.; NEVES, C. T. C.; LEVY, C. E.; GARCIA, D. O.; MAMIZUKA, E. M.; MCCULLOCH, J. A.; MIMICA, L. M. J.; MARTINEZ, M. B.; VAZ, T. M. I. (Org.). Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionado à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013. cap. 1.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.;SINTO, S.I. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica: Sarvier, São Paulo, 2010.cap. 9.

STRASINGER, S. K; LORENZO, M.S. D.Urinálise e fluidos corporais. 5 a ed. São Paulo : Editora LMP (Livraria Médica Paulista), 2009.

Portal Anvisa, Módulo 4 - Gram-positivos. <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_ent.htm>. Acesso em 6 de maio de 2017.