

PRINCIPAIS MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DA BACTÉRIA *ESCHERICHIA COLI* EM AMOSTRA DE URINA NO SETOR DE MICROBIOLOGIA

Jockebedy Ribeiro Pimentel Delfino¹, Renata Feitosa Ferreira¹, Eliane Fabichacki²

RESUMO

O estudo aborda testes microbiológicos realizados para identificação da bactéria *Escherichia coli* em amostra de urina, um microrganismo que é frequentemente encontrado em infecções urinárias. Apresentando a finalidade de cada método e como se correlacionam para a adequada identificação, uma vez que as patologias causadas por esta bactéria são de grande relevância para saúde pública e especificamente para os médicos e biomédicos no setor de microbiologia clínica. No diagnóstico microbiológico os testes mais utilizados são a urocultura, coloração de Gram, meio de Rugai Modificado e sistema Bactray. O objetivo deste estudo consiste em descrever os principais testes de identificação com ênfase nas características apresentadas pela *E. coli* durante os procedimentos. Elaborado mediante pesquisa literária de caráter descritivo, qualitativo e exploratório, sendo utilizados, artigos e sites relevantes sobre o tema abordado. A pesquisa foi realizada durante os meses de fevereiro a outubro de 2018, os artigos foram pesquisados por meio dos sites SCIELO e Google acadêmico, utilizando as seguintes palavras-chaves: Diagnóstico, meios de cultura, *Escherichia coli*.

Palavras –chaves: Diagnóstico. *Escherichia coli*. Identificação. Microbiologia.

ABSTRACT

The study addresses microbiological tests performed to identify the bacterium *Escherichia coli* in a urine sample, a microorganism that is often found in urinary infections. Presenting the purpose of each method and how they correlate to the proper identification, since the pathologies caused by this bacterium are of great relevance for public health and specifically for physicians and biomedical in the field of clinical microbiology. In the microbiological diagnosis the most commonly used tests are uroculture, Gram staining, Modified Rugai's medium and Bactray system. The objective of this study is to describe the main identification tests with emphasis on the characteristics presented by *E. coli* during the procedures.

Keywords: Diagnosis. *Escherichia coli*. Identification. Microbiology.

INTRODUÇÃO

A filtração sanguínea é realizada através do sistema urinário, o qual é encarregado pela purificação de moléculas supérfluas ao organismo, tais como toxinas. Após o processamento, o produto resultante é a urina que posteriormente será eliminada por meio da micção¹.

¹ Biomedicina, Instituto Educacional Santa Catarina – IESC/FAG, Guaraí-TO

² Biomédica, Biomedicina, Instituto Educacional Santa Catarina – IESC/FAG, Guaraí-TO. email: fabichack@hotmail.com

As infecções bacterianas têm como motivo cerca de 80% dos casos a *Escherichia coli*, uma bactéria de origem intestinal que ascende pela uretra até à bexiga, bem como pelo ureter até o rim se não tratado pode ocasionar infecção do trato urinário baixo (cistite) - identifica-se frequentemente com disúria, polaciúria, piúria, nictúria, dor suprapúbica com urina avermelhada pelo aparecimento de sangue causado pela presença de litíase e/ou devido o processo inflamatório; infecção do trato urinário alta (pielonefrite) - se inicia normalmente com quadro de cistite, sendo constantemente acompanhada de febre alta, em geral superior a 38°C, relacionada a calafrios, dor lombar uni ou bilateral e bexiga. A dor lombar pode se espalhar em direção para o abdômen, deslocar-se para os flancos, até mesmo para a virilha^{2, 3}.

Diversos procedimentos podem ser empregados para realização do diagnóstico, entre eles estão a identificação e separação dos agentes bacterianos a começar pelo colhimento adequado dos materiais clínicos, para melhor isolamento e identificação do patógeno, dado que a maioria dos erros são cometidos durante a fase da coleta. O diagnóstico é constatado a partir de investigação microbiológica em amostra de urina, promovendo pesquisa e reconhecimento do microrganismo possivelmente presente e consequente análise de sua suscetibilidade aos antibióticos. Fazer a avaliação da incidência de infecções bacterianas causadas pela *E. coli* é de extrema importância, pois, auxilia na compreensão da epidemiologia do patógeno, e assim possibilita a proposição de medidas que podem ajudar na prevenção, reduzindo o número dos casos de infecção e complicações⁴.

Mediante os numerosos casos de infecção bacteriana causada pela *E. coli* surgem questões como: Durante o processo diagnóstico, quais as principais técnicas utilizadas, bem como, as características que indiciam a presença da mesma durante as etapas de identificação? Este microrganismo é bastante conhecido, suas propriedades apresentam-se durante todos os processos empregados na identificação. São utilizadas técnicas que funcionam juntas para o diagnóstico preciso do patógeno.

Este estudo tem por objetivo descrever os meios e procedimentos realizados no laboratório para identificação da bactéria *Escherichia coli*. Expondo de maneira clara e eficiente as técnicas desenvolvidas para a análise da mesma. Elaborado mediante pesquisa literária de caráter descritivo, qualitativo e exploratório, sendo utilizados, artigos e sites relevantes sobre o tema abordado. A pesquisa foi realizada durante os meses de fevereiro a outubro de 2018, os artigos foram pesquisados por meio dos sites SCIELO e Google acadêmico, utilizando as seguintes palavras-chaves: Diagnóstico. *Escherichia coli*. Identificação. Microbiologia.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Escherichia coli

Trata-se de um microrganismo de maior quantidade que habita a biota do trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Foi descrita primeiramente por Theodor von Escherich em 1885, sendo denominada de *Bacterium coli commune*. Inicialmente foi determinada como componente da microbiota entérica da maior parte dos animais e durante muito tempo foi considerada um microrganismo não patogênico. Posteriormente alguns sorotipos de *E. coli* foram associados a doenças

em animais e seres humanos, fazendo com que esta caracterização fosse modificada⁵.

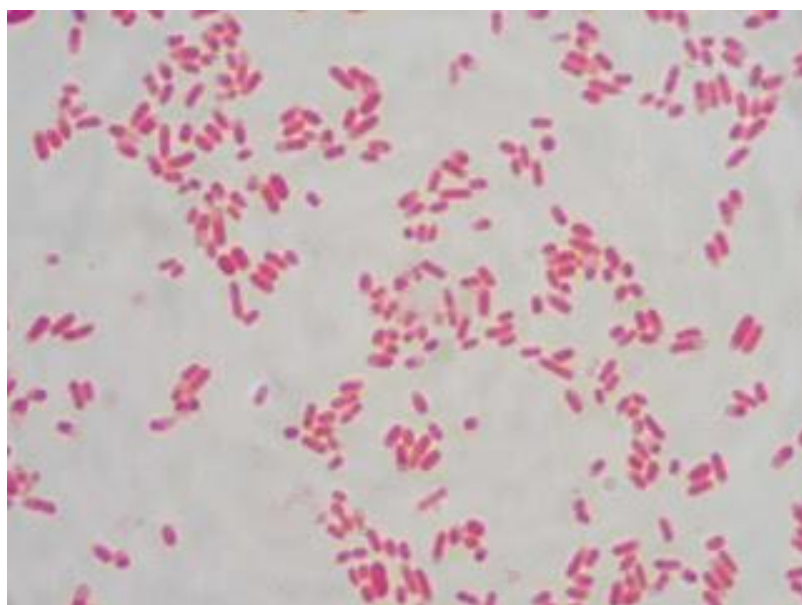
Trata-se de um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativa, que fermenta glicose e outros carboidratos, não esporogênica, reduz nitrato a nitrito como fonte de energia, é natural do trato intestinal humano que após se fixar no tecido invade as células e se prolifera. É um mesófilo típico apto de se desenvolver entre 7° C e 46 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima⁶.

Caracteriza-se como um patógeno situacionista, podendo invadir o trato gastrointestinal e urinário, associadas às fezes outras espécies/cepas de *E. coli* podem causar síndromes diarreicas diferentes devido a seus fatores de virulência. Sobre os fatores e manifestações clínicas das subespécies de *E. coli* destacam-se: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* difusivamente aderente (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enterro-agregativa (EAEC)^{7, 8}.

Desta forma a bactéria *E. coli* uropatogênica (UPEC) é responsável pela maior parte das infecções do trato urinário, resultado de uma base genética que possibilita a colonização e a permanência em nichos específicos do hospedeiro, assim como uma grande quantidade de fatores de virulência. Têm origem intestinal, onde podem deslocar-se e invadir as regiões periuretrais e oportunamente, adentram na uretra, ascendem para a bexiga onde se proliferam e aderem ao epitélio através de filamentos denominados fimbrias^{9, 10}.

A figura 1 mostra a bactéria *Escherichia coli* por coloração de Gram.

Figura 1: Bactéria *Escherichia Coli*.



Fonte: Patrícia P. 2011³

Coleta da Urina

Para garantir resultados satisfatórios, deve-se ter bastante atenção na fase pré-analítica da urina, onde a coleta e o transporte da amostra, são fundamentais para

³ Patrícia P. COLORAÇÃO DE GRAM. [publicação online] 15 de junho de 2011. [Acesso em 23/10/2018]. Disponível em: < <http://magicnumbers-parussolo.blogspot.com/2011/06/coloracao-de-gram.html>>

o bom andamento da fase analítica, onde de fato é realizado o exame. Cerca de 70% dos erros são cometidos na etapa pré-analítica. O laboratório tem a responsabilidade de instruir corretamente seu cliente sobre algumas informações, tais como, horário adequado para coleta, frasco coletor, higiene correta de acordo com o sexo, conservação da amostra até ser entregue ao laboratório, uma vez que algumas propriedades da urina se alteram no decorrer do dia, como, por exemplo, a multiplicação bacteriana¹¹.

A urina deve ser colhida preferencialmente após permanecer no mínimo 2 horas posteriormente a micção mais recente. O modo empregado para se obter a mostra urinária é a coleta do jato médio, no entanto em situações onde haja contaminação cruzada, propagação para as vias urinárias ou em situações em que o cliente não esteja habilitado para coleta se faz necessário outros meios de obtenção da amostra, tais como cateterismo vesical ou inclusive punção supra púbica. Tais procedimentos só devem ser realizados por profissional habilitado e com ordem médica. Portanto, para se adquirir uma coleta de sucesso é necessário realizar uma boa higienização¹¹.

No sexo feminino é necessário realizar a higiene pessoal com gaze embebida com água e sabão neutro, de frente para trás, enxaguar com água em abundância e enxugar o excesso com gaze ou toalha seca, evitando movimentos de trás para frente. Descartar a porção inicial da urina e colher a fração média sem suspender o fluxo em frasco limpo e estéril de boca larga¹¹.

No sexo masculino é importante realizar a higiene da região genital afastando o prepúcio, descartar a primeira porção e colher o jato médio da urina sem suspender o fluxo em frasco limpo e estéril de boca larga. É necessário ter cuidado para não encostar a pele no fundo do frasco para que não haja contaminação¹¹.

Um fator importante é a higienização antecedente à coleta, com o intuito de reduzir significativamente os casos de contaminação da amostra, sendo indispensável para garantir resultados confiáveis. Outra condição relevante que deve ser realizada corretamente é referente ao armazenamento e transporte. A urina necessita de refrigeração adequada (2 e 8°C) onde pode permanecer em condições satisfatórias ao exame por um intervalo de tempo de até 12 horas dependendo do laboratório e levando em conta as particularidades locais. A amostra em nenhuma hipótese deve ser congelada. Amostras que ultrapassam mais de duas horas para chegar ao laboratório são necessárias utilizar conservantes químicos específicos¹¹.

Urocultura

Trata-se de uma técnica quantitativa que indica se a multiplicação bacteriana, além de permitir o isolamento dessa bactéria. O meio de cultura de escolha para semeadura de amostras de urina é o ágar-Cled, este meio permite o crescimento dos principais patógenos urinários, propicia boa diferenciação das colônias e evidencia lactose positiva; Ágar-MacConkey também pode ser utilizado por ser um meio específico para microrganismos gram-negativos, além de verificar a fermentação ou não da lactose e Cromogênicos, meio fundamentado no ágar CLED proporciona crescimento dos microrganismos que causam infecção no trato urinário, através de agentes cromogênicos^{4, 12, 13}.

Como mostram a figura 2, placa de cultura com Agar MacConkey com *Escherichia coli* fermentadora de lactose (esq.) e não fermentadora de lactose (dir.) figura 3, placa de cultura Agar CLED com *E. coli* evidenciando lactose positiva na cor

amarela e a figura 4, *E. coli* em Agar cromogênico evidenciada devido as colônias cor de rosa.

Figura 2: *Escherichia coli* em ágar MacConkey



Fonte: Wikipédia. 2016⁴.

Figura 3: *Escherichia coli* em ágar CLED.

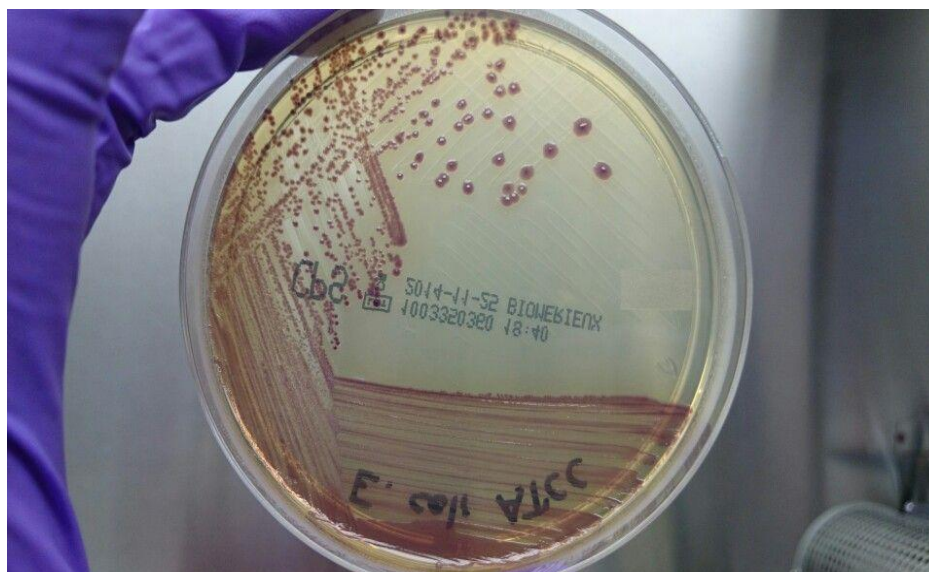


Fonte: Flickr, 2011⁵.

⁴ Ágar MacConkey. [publicação online] 06 de junho de 2016. [Acesso em: 24/10/2018]. Disponível em: <https://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81gar_MacConkey>

⁵ Nathan R. E.coli 2 on C.L.E.D. agar. [publicação online] 12 de setembro de 2011. [acessado em: 22/10/2018]. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/nathanreading/6141285541>> .

Figura 4: *Escherichia coli* em Meio Cromogênico de Biomerieux.



Fonte: Pinterest, 2014⁶

Coloração de Gram

Em 1884 o médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram notou que as bactérias obtinham colorações distintas, quando submetidas a corantes diferentes. Assim pode classificá-las em dois grupos diferentes: as que adquiriram coloração roxa constituíram o grupo das Gram-positivas e as adquiriu coloração avermelhada, chamadas de Gram-negativas. A coloração de Gram é o que diferencia os principais grupos das bactérias na microscopia óptica. Esta técnica é realizada com os seguintes reagentes:

Corantes primário – violeta cristal: Independentemente do tipo, colore o citoplasma bacteriano de roxo.

Mordente – soluto de lugol: Faz com que o corante violeta cristal penetre na célula compatível, se tornando insolúvel.

Agente descorante – álcool ou acetona: Retira o excesso de corante e descora as células que não tem afinidade pelo violeta cristal.

Contrastante – safranina: Colore o citoplasma do outro grupo de bactérias¹⁴.

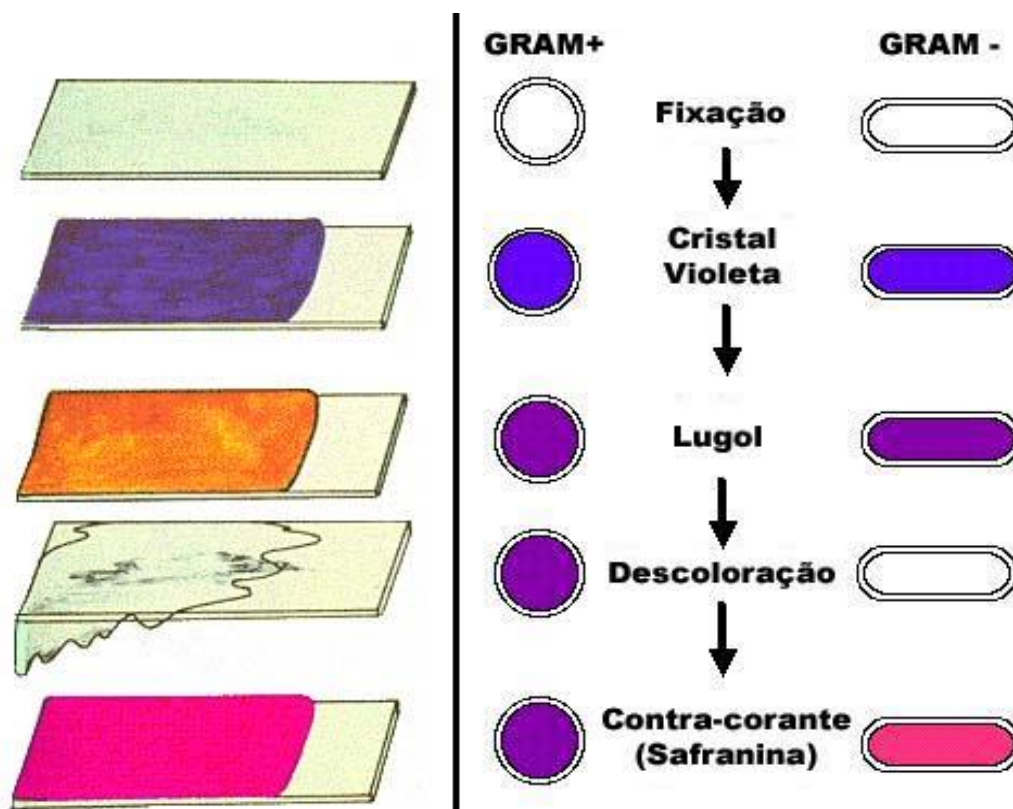
Existem distintos graus de permeabilidade na parede celular dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Alguns aspectos como a espessura da parede celular e as medidas dos espaços intersticiais podem definir o resultado da coloração. Ou seja, quando as estruturas são cobertas pela violeta-de-metila, todos os microrganismos se coram em roxo, após o acrescentamento do mordente, ocorre a formação do complexo iodo-pararosanilina, este tem a característica de prender o violeta cristal no interior da célula, estes podem reter a cor por mais tempo ou definitivamente. Depois de aplicado o agente descorante, o grupo de microrganismos que não absorveu a coloração primaria irá perder o pigmento rapidamente, e serão coradas pela safranina. Bactérias que possuem mureína em sua parede celular, durante o processo de descoloração, conservam o corante. As

⁶ Adrián A. Colonias de *Escherichia coli* en Medio cromogenico CPS de Biomerieux, [publicação online]. [acessado em: 17/09/2018]. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/381046818448644966/?lp=true>>.

bactérias em que sua parede celular em grande parte é constituída por ácidos graxos (lipopolissacarídeos e lipoproteínas) não são capazes de utilizar o complexo iodo-pararosanilina ganhando assim a coloração do corante de fundo¹⁴.

A figura 5 mostra as etapas e colorações adquiridas durante a coloração de Gram.

Figura 5: Coloração de Gram.



Fonte: IBAP, 2018⁷

Meio de Rugai Modificado

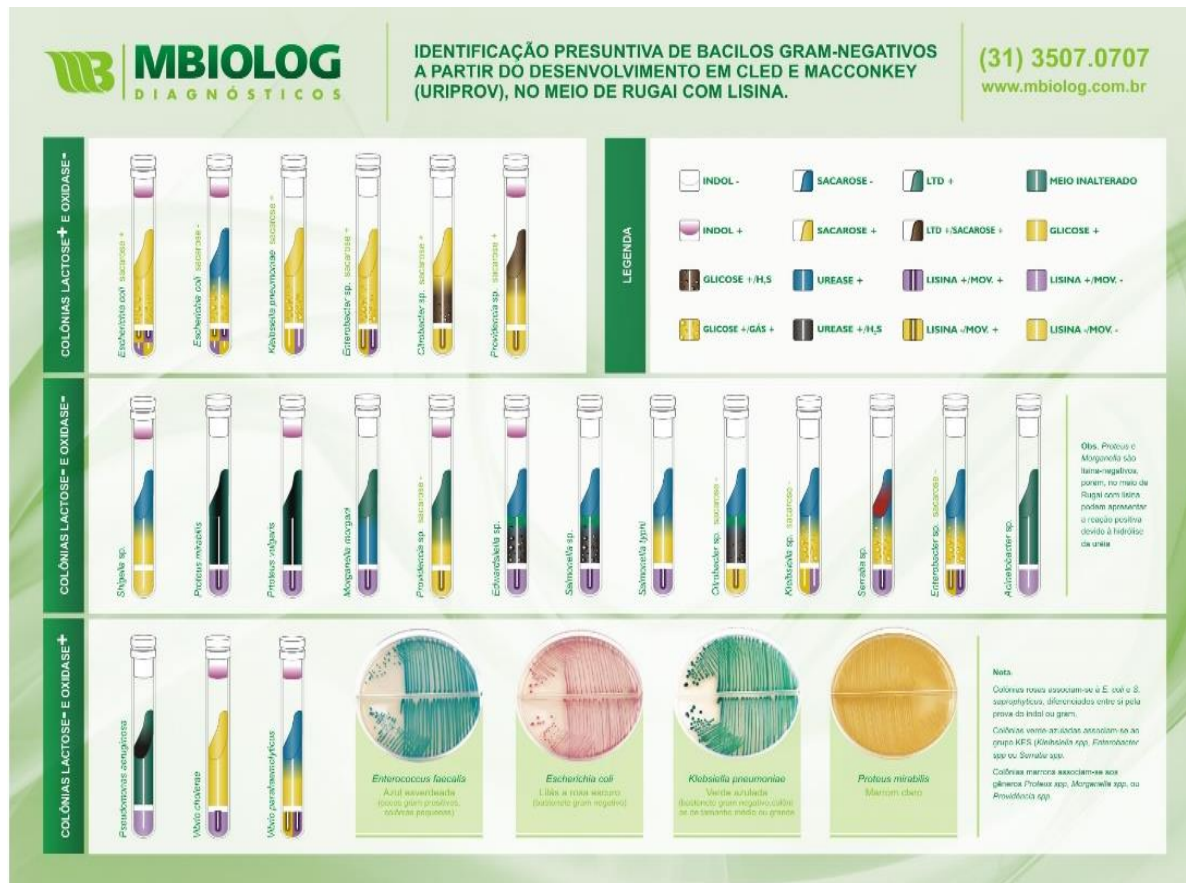
O meio de cultura de Rugai é empregado para contribuir na identificação de vibrios, enterobactérias e aeromonas. Utilizando um único tubo, essa técnica permite observar as seguintes reações: Motilidade, ácido sulfídrico, Lisina descarboxilase, Indol, Fermentação de glicose e sacarose, produção de gás-glicose, Urease e L-triptofano desaminase. Na maioria das culturas geralmente crescem alguns gêneros de bactérias que não possuem significado clínico¹⁵.

O objetivo do meio de Rugai é triar as colônias suspeitas. É realizado a semeadura utilizando uma colônia isolada e pura. É executada por picadas de tal modo que após penetrar em direção à lisina encoste delicadamente o fundo do tubo. Retira-se a alça com cuidado e na porção inclinada do meio realizam-se estrias. Com o algodão específico do teste, tampe leve para incubadora por um período de 18 – 24 horas por 35 a 37°C. Posteriormente ao período de incubação, observar as reações

⁷ Marina C. Coloração de Gram. [publicação online] 2018. [acessado em: 17/09/2018]. Disponível em: <<https://ibapcursos.com.br/coloracao-de-gram>> .

relacionar os resultados obtidos a tabela de interpretação¹⁵. A figura 6, mostra a tabela de interpretação do meio de Rugai modificado.

Figura 6: Tabela de leitura do Meio de Rugai.



Fonte: Mbiolog, 2018⁸.

Sistema Bac tray

É um sistema designado à identificação bioquímica de bacilos Gram-negativos oxidase positiva, não fermentadora de glicose e bacilos Gram-negativos oxidase negativa, fermentadoras ou não da glicose. Esse sistema é constituído por três conjuntos de provas bioquímicas, que juntos são 30 substratos que asseguram ótima precisão ao sistema¹⁶.

Bac tray I e II: Destinado para identificação de bacilos Gram-negativos oxidase negativas fermentadoras ou não de glicose. Cada conjunto é composto por uma placa plástica com 10 compartimentos para efetuação das provas bioquímicas. Bac tray I (Meio ONPG, Meio LDC, Meio Uréia, Meio ODC, Meio ADH, Meio H₂S, Meio VP, Meio PD, Meio INDOL, Meio Citrato) e Bac tray II, este é um complemento do primeiro teste (Meio Malonato, Meio Inositol, Meio Rhamnose, Meio Rafinose, Meio Salicina, Meio Arabinose, Meio Adonitol, Meio Sorbitol, Meio Sacarose, Meio Manitol)¹⁶.

Como mostram a figura 7, placa de inoculação Bactray I e a figura 8, placa de inoculação Bactray II.

⁸ Mbiolog. Pessoa & Silva – Rugai Mod. [publicação online] 2018. [acessado em: 17/09/2018]. Disponível em: <http://www.mbiolog.com.br/?page_id=252> .

Figura 7: Sistema Bactray I



Fonte: Anderson P, Sergio E, Ana Paula LD, 2014⁹.

Figura 8: Sistema Bactray II



Fonte: Anderson P, Sergio E, Ana Paula LD, 2014¹⁰.

O sistema Bactray apresenta uma inoculação homogênea, rápida e simples, assegurando que o inóculo seja distribuído de maneira uniforme em uma placa descartável que minimiza o uso de espaço na estufa. Apresenta um sistema online, dá suporte para a diminuição dos erros de cálculos e atualiza a base de dados com frequência. Após a obtenção dos resultados é necessário lançar os resultados no programa de leitura online do Bactray para cálculo dos códigos e identificação das bactérias¹⁶.

A figura 9, mostra a interface do Bactray Web, como os dados são lançados e a forma como os resultados são obtidos através do sistema online.

^{9,10} Anderson T, Sergio E, Ana Paula LD. Identificação de Bactérias Isoladas em Abatedouro Suíno, [publicação online]. [acessado em: 24/10/2018]. Disponível em: http://www.jovenspesquisadores.com.br/2014/restrito/uploads/posters/2014/Anderson_Togni_1407287305.

Figura 9: Bactray web.

Laborclin Produtos para Laboratório - Laborclin - Bactray Web

:: Provas
 Marque o resultado das provas do Bactray abaixo, se preferir coloque o código diretamente no local indicado e clique calcular:

Positivo									
ONPG	ADH	LDC	ODC	H ₂ S	URE	VP	PD	IND	CIT
									
☐	☒	☒	☒	☒	☒	☐	☐	☒	☐

Negativo									
ONPG	ADH	LDC	ODC	H ₂ S	URE	VP	PD	IND	CIT
									
☒	☐	☐	☐	☐	☐	☒	☒	☐	☒

:: Resultados

Código: 6740 Calcular Cancelar Exportar para Bactray II Imprimir

ORGANISMO	PERCENTUAL	PROPORÇÃO
Escherichia coli ser. 1	82,19%	1:909.187 Aceitável

Percentuais
 Excelente >= que 99,9%
 Muito Boa >= que 99%
 Boa >= que 90%
 Aceitável >= que 80%



Fonte: Print Screen Bactray Web, 2018¹¹

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelo contexto apresentado nesse artigo foi possível observar que os principais testes utilizados tem a necessidade de se inter-relacionar, pois, um depende do outro para que se tenha um diagnóstico preciso do microrganismo. No qual, quando se faz a urocultura escolhendo os meios de cultura específicos para urina, possibilita o reconhecimento das características do microrganismo. Após o crescimento da bactéria, logo é realizado a coloração de gram para observar a morfologia da mesma. Em sequência é necessário realizar as provas bioquímicas para confirmar o patógeno, que no caso é a bactéria *Escherichia coli*. Logo após as provas bioquímicas para a confirmação. Conclui-se que os meios de cultura em amostra de urina mais usados são ágar CLED, Agar MacConkey e meio cromogênico. Portanto o teste presuntivo se dá pela coloração de gram e os confirmatórios através das provas bioquímicas que se destacou Meios de Rugai Modificado e Sistema Bactray que são os principais usados na rotina do laboratório de análises clínicas, devido sua praticidade.

¹¹ Laborclin. Bactray web.

REFERENCIAS

1. Piçarra AMF. Infecções Urinárias – Aspectos Microbiológicos e epidemiológicos (Dissertação). Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde; 2015.
2. Tortora G, Funke B, Case C. Microbiologia. 10.ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
3. Roriz-Filho J, Vilar F, Mota L, et al. (2010). Infecção do trato urinário. Medicina (Ribeirão Preto. Online), 43(2), 118-125.
4. Ravel R. Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais. 6. ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 1997.
5. Rocha DT. Caracterização de *Escherichia coli* patogênica aviária e *Escherichia coli* uropatogênica utilizando grupos filogenéticos e a resistência antimicrobiana (Tese de Doutorado). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; 2018.
6. Levinson, W., Microbiologia Médica e Imunologia, 10. ed. São Paulo: Artmed: 2010.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al. Microbiologia Médica. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
8. Moura LB, Fernandes MG. A incidência de Infecções Urinárias Causadas por *E. Coli*. Revista Olhar Científico – Faculdades Associadas de Ariquemes – Roraima, 1, n.2, 16 p. Ago./Dez. 2010.
9. Reu CE. Incidência de bactérias causadoras de infecção urinária em pacientes atendidos pela unidade de saúde do município de Curitiba e análise genética de *Escherichia coli* uropatogênica. 2013. 75 p. Dissertação (Pós-graduação em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
10. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5 :Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013.
11. Andriolo A et al. Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/ medicina laboratorial (sbpc/ml): Coleta e Preparo da Amostra Biológica. 1.ed. Barueri: Manole Ltda, 2014. 487p.
12. Cardoso J. O. Microbiologia: atividades práticas. 2. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2008.

13. Brito F. Instruções de uso: Agar Cromogênico-Mbiolog. Minas Gerais: Mbiolog Diagnósticos Ltda, 2010. 2 p.
14. Ministério da Saúde. Secretária de Políticas de Saúde Programa Nacional de DST e Aids. Técnica de coloração de Gram. Brasília (DF): 2001.
15. Meio de Rugai e Araújo Modificado por Pessoa e Silva. Fabrício Galvão de Brito. Contagem/MG: MBiolog diagnósticos, 2014. Bula Meio de Rugai e Araújo Modificado por Pessoa e Silva
16. Sistema Bactray. Elisa Hizuru Uemura. Pinhais/PR: Laborclin produtos para laboratório Ltda, 2018. Bula Sistema Bactray.