

CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ
CURSO DE BIOMEDICINA

ALANA BEATRIZ VASCONCELOS
ANA JÚLIA CRUZ DE SOUZA
FLÁVIA DE LIMA MARIA

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEMEADURA PARA
UROCULTURA E SUAS IMPLICAÇÕES NOS RESULTADOS

Ribeirão Preto
2023

CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ
CURSO DE BIOMEDICINA

ALANA BEATRIZ VASCONCELOS
ANA JÚLIA CRUZ DE SOUZA
FLÁVIA DE LIMA MARIA

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEMEADURA PARA
UROCULTURA E SUAS IMPLICAÇÕES NOS RESULTADOS

Trabalho de conclusão de curso de
Biomedicina do Centro Universitário Barão
de Mauá para obtenção do título de
bacharel.

Orientador: Profa. Dra. Denissani Ap.
Ferrari dos Santos Lima

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

A963

Avaliação das diferentes técnicas de semeadura para urocultura e suas implicações nos resultados/ Alana Beatriz Vasconcelos; Ana Júlia de Cruz e Souza; Flávia de Lima Maria - Ribeirão Preto, 2023.

50p.il

Trabalho de conclusão do curso de Biomedicina do Centro Universitário Barão de Mauá

Orientador: Dra. Denissani Ap. Ferrari dos Santos Lima

1. Urocultura 2. Infecção trato urinário 3. Técnicas de semeadura I. Vasconcelos, Alana Beatriz II. Souza, Ana Júlia de Cruz e III. Maria, Flávia de Lima IV. Lima, Denissani Ap. Ferrari dos Santos V. Título

CDU 612.461.1

Bibliotecária Responsável: Iandra M. H. Fernandes CRB8 9878

CENTRO UNIVERSITÁRIO BARÃO DE MAUÁ
CURSO DE BIOMEDICINA

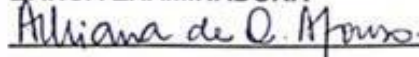
ALANA BEATRIZ VASCONCELOS
ANA JÚLIA CRUZ DE SOUZA
FLÁVIA DE LIMA MARIA

AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE SEMEADURA PARA
UROCULTURA E SUAS IMPLICAÇÕES NOS RESULTADOS

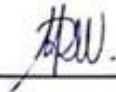
Trabalho de conclusão de curso de
Biomedicina do Centro Universitário Barão
de Mauá para obtenção do título de
bacharel.

Data de aprovação: 6/11/2023

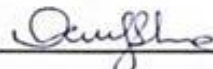
BANCA EXAMINADORA



Profa. Adriana de Oliveira Afonso
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto



Prof. Amadeu Pasqualim Neto
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto



Profa. Dra. Denissani Ap. Ferrari dos Santos Lima
Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto
Orientadora

Ribeirão Preto
2023

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradecemos a Deus por ter nos abençoado até o momento e durante toda a nossa jornada rumo à conclusão do curso.

Agradecemos ao apoio dos nossos familiares, que nos incentivaram a continuar buscando nosso sonho, pelos conselhos e pelo amor que nunca faltou.

Agradecemos a nossa professora e orientadora, Denissani, pelo companheirismo, por todo ensinamento durante o curso e também no decorrer deste trabalho, pela paciência, dedicação e amor para nos ensinar.

Agradecemos também aos nossos professores que nos acompanharam durante o curso, e que nos transmitiram conhecimento necessário para seguirmos a nossa trajetória profissional.

RESUMO

Infecção do Trato Urinário (ITU) é uma doença bacteriana que acomete principalmente o sexo feminino, com prevalência entre crianças e idosos. Este estudo foi realizado com intuito de avaliar o crescimento de microrganismo em diferentes meios de cultura utilizados na rotina microbiológica, metodologias de semeadura de urocultura, contagem de colônias bacterianas utilizando normas estabelecidas pela ANVISA, por aplicativos ou por orientações de fornecedores de insumos, utilizando volumes padronizados, concentrações bacterianas diferentes e cepas dos principais causadores de ITU. Os resultados obtidos demonstraram que tanto o Agar Cled como o Cromoagar apresentaram bom desempenho em relação ao crescimento bacteriano, assim como a contagem das colônias desde que seja semeado uma amostra por placa; o laminocultivo não foi satisfatório em relação a contagem de bactérias, mas foi possível observação do crescimento bacteriano. O uso de diferentes amostras em uma única placa apresentou contaminação entre as amostras. A contagem das unidades formadoras de colônia utilizando aplicativos devem ser avaliadas com precaução, já as técnicas visuais ou por contadores visuais foram mais adequadas por poderem diferenciar os gêneros nas placas. Concluimos que as técnicas padronizadas quando seguidas segundo as recomendações e normativas são confiáveis, os meios utilizados apresentaram bom desempenho quanto a semeadura, crescimento e contagem bacteriana. As contagens foram coerentes ao utilizar métodos visuais, a utilização de softwares para contagem das colônias necessita de testes de qualidade e padronização para assegurar resultados confiáveis. Foi possível concluir que, os métodos exercidos visualmente são confiáveis, enquanto para aplicativos é necessário cautela na liberação de resultados.

Palavras-chave: urocultura; infecções do trato urinário; métodos quantitativos e qualitativos; patógenos urinários; técnicas de semeadura;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figura 2 -	Semeadura Quantitativa	21
Figura 3 -	Semeadura em 4 campos sobrepostos	21
Figura 4 -	Crescimento de Bactérias Ágar Cromogênico	23
Figura 5 -	Laminocultivo contagem de colônias	24
Figura 6 -	Semeadura das Cepas para avaliar a pureza das amostras bacterianas.	28
Figura 7 -	Turbidímetro Portáti MCF- 500	28
Figura 8 -	Ágar Cled estéril	29
Figura 9 -	Laminocultivo com lâminas de Agar Mac Conkey e Agar Cled estéril	29
Figura 10 -	Contador de Colônias de placa com lupa	31
Figura 11 -	Semeadura de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas concentrações de 1,0 MCF e 0,5 MCF, respectivamente em meio CLED e Chromagar	33
Figura 12 -	Triplicatas da semeadura quantitativa em quatro campos em meio CLED na concentração de 0,5 MCF.	34
Figura 13 -	Cepa ATCC de <i>Escherichia coli</i> semeada em duplicata, em CLED nas concentrações de 0,05 MCF, 1,0 MCF, 3,0 MCF e 4,0 MCF	35
Figura 14 -	Cepa ATCC de <i>Escherichia coli</i> semeada em duplicata, em Chromagar nas concentrações de 0,05 MCF; 1,0 MCF; 3,0 MCF e 4,0 MCF	36
Figura 15 -	Triplicatas da semeadura quantitativa da <i>Escherichia coli</i> em Chromagar	36
Figura 16 -	Triplicatas da semeadura quantitativa em Chromagar com contaminação quando semeadas mais de uma amostra	37
Figura 17 -	Laminocultivo das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i>	37
Figura 18 -	Laminocultivo da amostra de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Figura 19 -	Contagem automatizada por meio dos aplicativos APD Colony App Lite e Colony Counter Promega	40

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Escala de McFarland	30
Quadro 2 -	Contagem visual Cepas ATCC: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> semeadas com alça de 10µL	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Contagem por aplicativo	35
Gráfico 2 -	Contagem visual em meio CLED	38
Gráfico 3 -	Contagem visual em meio Chromagar	39
Gráfico 4 -	Contagem pelos aplicativos no meio CLED	39
Gráfico 5 -	Contagem pelos aplicativos no meio Chromagar	40

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
ESPC	Estágio Supervisionado em Patologia Clínica
ITU	Infecção do trato urinário
mL	Mililitro
UFC	Unidades formadoras de colônia
CMCISS	Comissão Municipal de Controle de Infecção em Serviços de Saúde de Contagem
SBPC	Sociedade Brasileira de Patologia Clínica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1 Principais patógenos.....	17
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	17
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	17
2.1.3 <i>Enterococcus faecalis</i>.....	18
2.1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	18
2.1.5 <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	20
2.2 Técnicas Utilizadas em Cultura de Urina.....	20
2.2.1 Técnica Quantitativa.....	20
2.2.2 Semeadura Quantitativa em 4 Campos Sobrepostos.....	21
2.2.3 Placa especial cromogênica para semeadura de urina.....	22
2.2.4 Laminocultivo.....	23
2.3 Avaliação do crescimento e contagem Cultura Quantitativa.....	25
3 OBJETIVO.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivo Específico.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Local do estudo.....	27
4.2 Amostras e procedimentos.....	27
4.2.1 Amostras Utilizadas.....	27
4.2.2 Preparo das amostras bacterianas.....	28
4.2.3 Meios de Cultura e Alças de Semeaduras Utilizados.....	29
4.2.4 Procedimentos de Semeadura.....	30
4.2.5 Semeadura com Alça de 1 e 10µL.....	30
4.2.6 Semeadura em Laminocultivo.....	30
4.2.7 Leitura das Placas.....	31
4.2.8 Contagem Visual.....	31
4.2.9 Contagem de colônias por aplicativos de celular.....	31
4.3 Armazenamento dos dados.....	31
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	41

7 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

As infecções características do trato urinário (ITU) são comuns e em sua maioria ocorrem por meio de microrganismos presentes na própria flora, tais como os bacilos Gram-negativos, sendo a *Escherichia coli* a mais comum, seguida por *Proteus sp*, *Klebsiella sp* e *Enterobacter sp*. São desencadeadas por desajustes do organismo e recorrentes em pacientes imunodeprimidos, pacientes transplantados, portadores do vírus poliomavírus, citomegalovírus e adenovírus (ABBAS; FAUSTO, 2010).

Segundo Guerra *et al.* (2018), “a ITU está entre as infecções mais comuns no Brasil”, tendo grande relevância no âmbito laboratorial, visto que seu diagnóstico compreende grande parte dos serviços de atenção primária até atendimentos de urgências devido as possíveis complicações. São classificadas em dois grupos: infecções baixas, onde não há surgimento de alterações funcionais do trato urinário, podendo ser assintomática e permanecer localizada, e infecções altas que correspondem à pielonefrite, um distúrbio renal que afeta os rins mais especificamente os túbulos renais, interstício e pelve renal.

O espectro clínico das infecções do trato urinário é baseado em Cistite, quando há aderência da bactéria à bexiga. Pielonefrite (PN) aguda, ou como também é chamada de infecção do trato urinário “alto” ou nefrite intersticial bacteriana por causar alterações estruturais renais e/ou anatômicas, por ser um processo inflamatório agudo que compromete os rins e suas estruturas próximas. Difere-se da Cistite por conta de seus sintomas mais sistêmicos e exagerados (HEILBERG; SILVA *et al.*, 2020).

Pode-se dividir as infecções em duas importantes ocorrências, sendo o surgimento da bacteriúria de baixa contagem, que pode estar relacionado a uma contaminação, mas na maioria dos casos, as bactérias isoladas são típicas de ITU, sendo a *E. coli*, alguns gram-negativos ou o *Staphylococcus saprophyticus*. A baixa contagem pode apresentar também a fase precoce de uma ITU que está em andamento; diluição urinária por maior ingestão de líquidos; síndrome uretral; ou ainda, o crescimento retardado de certos uropatógenos como o *Staphylococcus saprophyticus*, este, pode ser confundido com o *Staphylococcus epidermidis*, sendo necessário realizar a diferenciação através do teste do antibiótico Novobiocina que apresentará resistência pelo *Staphylococcus saprophyticus* (LOPES; TAVARES, 2005; CARVALHO, 2023).

E a bacteriúria assintomática é a presença da bactéria, porém sem sintomas. Para diferenciação de contaminação são necessárias pelo menos duas uroculturas do mesmo microrganismo isolado e que possua uma contagem de 10^5 UFC/mL ou próximas a este valor (LOPES; TAVARES, 2005).

Em infecções do trato urinário em crianças a indicação para hospitalização é para menores de 2 meses, pacientes imunocomprometidos, falha no tratamento ambulatorial, sinais de pielonefrite (febre alta, prostração e dor lombar) e doença concomitante grave (CMCISS, 2009).

No caso de infecção nos adultos, o tratamento é diferenciado de acordo com o sexo do paciente. Em mulheres jovens que possuem infecção primária, e que não tenha fatores agravantes de cistite, podem ser sujeitas a terapia de curto período (3 dias). No tratamento de outros pacientes é indicado o prazo de 7 dias (CMCISS, 2009).

A infecção do trato urinário na gravidez é caracterizada como uma das doenças infecciosas mais comum durante a gestação. Pode ser assintomática ou sintomática, e é possível observar alguns fatores que alteram de assintomático para sintomático, por conta das modificações da fisiologia durante a gravidez, por exemplo, dilatação das pelves renais e ureteres, que é detectável a partir da sétima semana de gravidez, resultam em aumento da frequência urinária e predispõem as bactérias que são assintomáticas em infecções sintomáticas (CMCISS, 2009).

O diagnóstico é realizado tendo como base os resultados obtidos pelos exames laboratoriais de urina rotina e, principalmente, a urocultura onde é possível observar a confirmação de positividade para ITU, identificação do agente causador e possíveis resistências desse microrganismo (ANVISA, 2010).

Quando as urinas são sujeitas a cultura sem informação clínica específica, recomenda-se que “contagens de colônias $< 10^5$ UFC/mL possam também causar infecção, somente se um único micro-organismo e potencial patógeno for isolado. Nos casos em que a contagem de colônias seja $\geq 10^5$ UFC/mL, para um possível patógeno é necessário identificar o nível da espécie e realizar o teste de sensibilidade (antibiograma). No caso dos pacientes que são assintomáticos, deve-se solicitar uma nova amostra, pois trata-se de possível bacteriúria assintomática. No caso da presença de outras espécies em contagens $< 10^5$ UFC/mL, é preciso relatar o número de micro-organismo(s) presente(s)” (ANVISA, 2010).

É extremamente importante para os profissionais e laboratórios, a análise das diferentes técnicas de semeadura para averiguar se estão dentro das normas padronizadas pela ANVISA (ANVISA, 2010). Os meios que possuem substratos cromogênicos são amplamente utilizados para urocultura, como também o ágar CLED. Estes possuem a vantagem de identificação dos principais gêneros e espécies associados à ITU, além de caracterizar a ocorrência de culturas polimicrobianas, reduzindo o número de identificações desnecessárias (SBPC, 2015).

A técnica de laminocultivo é indicado para diagnóstico presuntivo de infecções urinária, consiste em utilizar um recipiente plástico cilíndrico, onde pode também ser coletada a amostra, com uma tampa ligada a um suporte plástico com duas faces contendo meios de cultura como CLED e Mac Conkey ou outras combinações. É indicada devido a praticidade no transporte (ANVISA, 2010).

Justifica-se a realização deste trabalho, a preservação do diagnóstico laboratorial com metodologia validada, utilizando as semeaduras quantitativas para avaliar a homogeneidade de crescimento pela placa, manuseando meios de cultura como ágar CLED, ágar cromogênico e laminocultivo, que são indicadas para a diferenciação das bactérias e diagnose das infecções do trato urinário (ANVISA, 2010).

E, para avaliação do crescimento e contagem das culturas quantitativas é imprescindível levar em conta o número de unidades de colônias que obtiveram crescimento após a incubação de 24 ou 48 horas, portanto deve-se utilizar uma padronização para sua contagem, segundo a ANVISA (ANVISA, 2010).

2 DESENVOLVIMENTO

Dentre os principais patógenos causadores de infecção urinária, optou-se pela utilização de cepas ATCC, padronizadas, para simular um quadro de infecção urinária e um quadro de cultura negativa.

2.1 PRINCIPAIS PATÓGENOS

Descrito abaixo estão as cepas ATCC utilizadas para a pesquisa devido a serem os principais patógenos causadores de infecções urinárias, tanto na comunidade como em ambientes hospitalares.

2.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, pertencente à família *Enterobacterales*, está amplamente distribuída na natureza, e o principal habitat é o trato intestinal humano e animal, sendo considerado um bacilo Gram negativo participante da microbiota comensal do trato gastrointestinal (MCCORMICK *et al.*, 2008 *apud* SILVA *et al.*, 2020; COSTA *et al.*, 2019).

As colônias da *E. coli* dispõem de ótimo crescimento em ágar ou caldo simples a temperatura de 37°C, que é semelhante ao corpo humano, favorecendo a sua colonização e infecção (TRABULSI, 2005; COSTA *et al.*, 2019).

Escherichia coli uropatogênica (ECUP) é considerado o agente etiológico com maior incidência em infecção urinária, assim como em pielonefrite, apresentando fatores de virulência que aumentam sua sobrevivência no hospedeiro, visto que, facilitam a ascensão no trato urinário, aderindo-se ao epitélio da bexiga e do trato urinário superior (BRESOLIN, 2016; PEREIRA, 2016).

2.1.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, recebe esse nome pois apresentam uma morfologia semelhante a cachos de uvas, demonstrando-se também como células únicas, aos pares ou cadeias curtas. A maioria dos estafilococos são considerados, imóveis e anaeróbios facultativos, capazes de crescer

em meios com altas concentrações de sal. São consideradas bactérias mesófilas (temperaturas entre 18 °C e 40 °C) e não esporuladas. São capacitados de colonizar a pele e mucosas de seres humanos e causar vários desfechos clínicos, como infecções de pele, ossos, tecidos moles, trato urinário e infecções oportunistas. Todos os estafilococos são catalase positivo, porém, apenas o *Staphylococcus aureus* apresenta positividade para os testes de coagulase (MURRAY; BARON, 2007).

Considerado um microrganismo muito resistente, visto que, pode sobreviver em condições desfavoráveis. Esses microrganismos são capazes de desenvolver biofilmes e se tornarem mais tolerantes ou mais resistentes aos convencionais antibióticos. A insensibilidade desta bactéria inicia-se a partir da composição da sua parede celular, da superfície estrutural, da variação fenotípica e das atividades enzimáticas (BRITES; SILVA; SAMPAIO-SÁ, 2006; FERREIRA *et al.*, 2014).

2.1.3 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus spp. são considerados um grupo importante de bactérias ácido-láticas (CASSENEGO, 2010). Cocos Gram-positivos que geralmente surgem em pares e cadeias curtas, anaeróbios facultativos e sua temperatura de crescimento é 35°C, mas conseguem se desenvolver entre 10°C e 45°C. Estão distribuídos no ambiente, podendo estar presente em água, plantas e em fontes, como solo. São microrganismos comensais que colonizam o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (COSTA *et al.*, 2009; MUNDT, 1961).

O gênero *Enterococcus* é composto de mais de 20 espécies. As mais importantes são *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. hirae* (CASSENEGO, 2010). As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são consideradas como principais causadoras de infecções em humanos, estas, já foram encontradas em 90-80% e 10-5% dos isolados clínicos, respectivamente. A endocardite, bacteremia, pneumonia e infecções urinárias ocorrem em pacientes internados, após procedimentos cirúrgicos (COSTA *et al.*, 2009; MURRAY; BARON, 2007).

2.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é caracterizada como Bacilo gram-negativo não fermentador que possui oxidase-positiva e odor característico de frutas devido a presença do pigmento piocianina nos casos de infecção. Em geral, se apresentam como beta-hemolíticos em ágar sangue, colônias grandes, brilhosas ou mucoides, ásperas ou pigmentadas (KONEMAN *et al.*, 2018).

Sua origem, assim como de outras espécies de bactérias deu-se a milhões de anos e sua primeira descrição foi feita, segundo Pallenori, (2010) pelo “professor Walter Migula do Instituto Karlsruhe na Alemanha no final do século XIX”. Pallenori diz em estimativa, existir “mais de 800 nomes espécies atribuídos a *Pseudomonas* em meados do século XX”.

Pallenori coordenou, com base na tese escrita por Lee den Dooren de Jong (1926) um trabalho onde ele ordena as espécies de *Pseudomonas* em uma tabela, baseado nas características nutricionais. Ele caracteriza a *Pseudomonas aeruginosa* como tipo ideal para o gênero. Pallenori realizou um experimento exploratório com o RNA extraído das espécies que eram associadas à *Pseudomonas*, e através da hibridização versus DNA total obteve resultados interessantes (PALLENORI, 2010).

Seu isolamento é comum em casos clínicos em pacientes com fibrose cística, leucemia aguda, feridas de queimadura, transplantes de órgãos, e em infecções das vias urinárias e do trato respiratório inferior; estas últimas podem ser graves e fatais nos pacientes imunossuprimidos” (KONEMAN *et al.*, 2018).

Devido a produção de diversas substâncias que possibilitam a adesão e a colonização da *Pseudomonas aeruginosa* ao tecido do hospedeiro combinados a um conjunto de fatores de virulência presentes na figura 1, configuram a ela a posição de bactéria de maior importância clínica dentre os Bacilos gram-negativos não fermentadores (KONEMAN *et al.*, 2018).

Figura 1 – Fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*

Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Fator de virulência	Atividade biológica
Alginato	Polissacarídeo capsular, que permite às bactérias infectantes aderir às superfícies das células do epitélio pulmonar e formar biopelículas que, por sua vez, protegem as bactérias contra os antibióticos e o sistema imune do corpo.
<i>Pili</i>	Apêndices superficiais que permitem a adesão das bactérias aos receptores gangliosídicos GM-1 presentes nas superfícies das células epiteliais do hospedeiro.
Neuraminidase	Remove as moléculas de ácido siálico dos receptores gangliosídicos GM-1, facilitando a fixação dos <i>pili</i> .
Lipopolissacarídeo	Produce endotoxina e causa síndrome séptica: febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada e distúrbios metabólicos.
Exotoxina A	Destruição dos tecidos e inibição da síntese proteica; interrompe a atividade celular e a reação dos macrófagos.
Enterotoxina	Interrupção da atividade gastrointestinal normal e diarreia.
<i>Exoenzima S</i>	Inibição da síntese proteica.
Fosfolipase C	Destruição da membrana plasmática; destruição do surfactante pulmonar; inativação das opsoninas.
Elastase	Clivagem das imunoglobulinas e dos componentes do complemento; supressão da atividade dos neutrófilos.
Leucocidina	Inibição das funções dos neutrófilos e linfócitos.
Piocianinas	Suprimem outras bactérias e bloqueiam a atividade dos cílios respiratórios; causam lesão oxidativa dos tecidos, principalmente dos tecidos oxigenados como os pulmões.

Fonte: KONEMAN *et al.*, 2018

2.1.5 *Klebsiella pneumoniae*

As espécies do gênero *Klebsiella* foram descritas pela primeira vez no final do século XIX e nomeadas em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. Segundo Dong *et al.* (2022), “O gênero *Klebsiella* compreende atualmente uma grande diversidade de espécies, incluindo espécies pertencentes ao complexo de espécies *K. pneumoniae* (KpSC) e outras espécies de *Klebsiella* (*K. indica*, *K. terrigena*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. oxytoca*, *K. grimontii*, *K. pasteurii* e *K. michiganensis*)” (KALPANA *et al.*, 2023).

São bacilos gram-negativos encapsulados, imóveis e apresentam oxidase-negativa, colônias grandes e mucoides. A espécie *Klebsiella pneumoniae* é a mais comum nos achados clínicos se apresentando na forma clássica da pneumonia primária. *K. pneumoniae* pode causar várias infecções extrapulmonares, como

enterite e meningite (nos lactentes), infecções das vias urinárias (crianças e adultos) e septicemia” (KONEMAN *et al.*, 2018).

Dong *et al.* (2022) observaram que a capacidade da bactéria de adquirir material genético externo o levou a evolução da espécie a dois patótipos. Cepas clássicas de *K. pneumoniae* (cKP) têm ganhado cada vez mais notoriedade devido à sua propensão a acumular mutações e adquirir determinantes”, eles evidenciam que “mais de 100 genes adquiridos de resistência antimicrobiana foram identificados em *K. pneumoniae*”.

2.2 Técnicas Utilizadas em Cultura de Urina

A urocultura é considerada uma cultura quantitativa, sendo a análise do diagnóstico positivo ou negativo apurado no número de unidades formadas de colônias/mL (UFC/mL) que obtiveram crescimento em placa após a semeadura (CARVALHO, 2023). É o exame mais requisitado nos laboratórios de microbiologia clínica e atualmente existem várias metodologias empregadas para a semeadura deste exame.

2.2.1 Técnica Quantitativa

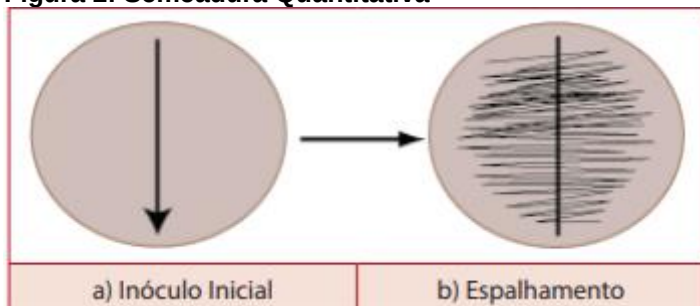
Recomenda-se o uso de ágar Cled ou Brolacin, que permitem o cultivo de microrganismos aeróbios ou microaerófilos, gram-positivos ou gram-negativos, e *Candida* spp. Por conta de uma ampla disponibilidade de substâncias nutritivas e por não possuírem substâncias inibidoras, são classificadas como meios de cultivo universal para urocultura, no entanto, atualmente existem diversos tipos de semeaduras que são empregadas para este tipo de meio de cultura (ANVISA, 2010; CAMARGO *et al.*, 2001).

A semeadura recomendada descrita no “Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde Módulo 4 da Anvisa”, é a técnica de semeadura quantitativa, podendo utilizar para o volume amostras de urina 1 µL, 10 µL ou 100 µL (ANVISA, 2010).

Para o procedimento em geral deve-se homogeneizar o material com agitação manual em diferentes direções. Obter o volume definido pela técnica com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada. No caso da alça, observar

a integridade da película formada até depositá-la na parte superior da placa. Utilizando a alça, realiza-se a distribuição do material em linha reta até a outra extremidade (Figura 2). Perpendicularmente, distribuir o material por toda a superfície de maneira homogênea. Refazer o mesmo procedimento por 3 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria (ANVISA, 2010).

Figura 2: Semeadura Quantitativa



Fonte: ANVISA, 2010.

É indicado “evitar o uso de placas úmidas e, após semeadas, não incubar caso haja umidade na superfície do ágar e o rompimento do ágar, estriando o material suavemente” (ANVISA, 2010).

Uma suspensão com 10^5 UFC/mL resulta em um tapete de colônias que cobrirá toda a superfície do ágar de maneira uniforme, com colônias confluentes (ANVISA, 2010).

2.2.2 Semeadura Quantitativa em 4 Campos Sobrepostos.

Seguindo as orientações da Anvisa para o inóculo bacteriano, a técnica de semeadura em quatro campos sobrepostos é utilizada em meio Agar Cled.

Para esta semeadura, é necessário obter o volume definido com o auxílio de uma pipeta com ponteira estéril ou alça calibrada, distribuir o material em linha reta até a outra extremidade. Perpendicularmente, realizar a distribuição do material por toda a superfície de maneira uniforme. Repetir o mesmo procedimento por 4 vezes, ou até que a superfície da placa esteja seca, alterando a direção da estria, como demonstrado na figura 3 (ANVISA, 2010).

Figura 3: Semeadura em 4 campos sobrepostos



Fonte: <https://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/09/tecnicas-de-semeadura.html>

2.2.3 Placa especial cromogênica para semeadura de urina

O princípio do meio, de acordo com o fabricante é a diferenciação de bactérias gram-positivas e gram-negativas com base na coloração das colônias.

Escherichia coli, *Enterococos*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp* e *Proteus spp*, *Morganella spp* e *Providencia spp* são os organismos mais frequentemente responsáveis pelas infecções do trato urinário (OLIVEIRA, 2008). *Staphylococcus saprophyticus* e *Streptococcus agalactiae* são menos frequentes em infecções femininas. Determinados organismos envolvidos produzem enzimas para o metabolismo da lactose, dos glucosídeos ou de ambos, ao passo que outros não produzem nenhuma destas enzimas. Por exemplo, *E. coli* produz enzimas provenientes do metabolismo da lactose, porém é negativa para a β -glucosidase. Outros membros da família *Enterobacterales* são positivos para a β -glucosidase, mas não possuem as enzimas necessárias para ocorrer a fermentação da lactose, podendo outros conter os dois tipos de enzimas ou nenhuma delas. As betaglucosidases também se encontram nos cocos Gram positivos como exemplo, os *Enterococcus spp.* e os *Streptococcus agalactiae*. A triptofano desaminase (TDA) é uma enzima que é encontrada no grupo de organismos *Proteus-Morganella-Providencia*. O Chromagar permite a identificação de *E. coli*, dos enterococos e da maioria das cepas de *Staphylococcus saprophyticus* e *S. simulans* diretamente na placa de isolamento. Além de que, é possível realizar uma constatação dos grupos *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (=KES) e *Proteus-Morganella-Providencia* (=PMP) através da coloração da colônia e do meio (MERLINO et al., 1996).

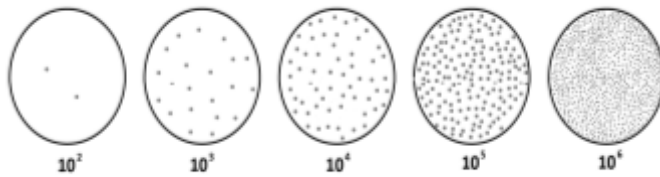
O Chromagar não é seletivo, poderá crescer outros agentes patogênicos das ITUs, sendo necessário testes bioquímicos para a sua identificação. No

Chromagar as peptonas especialmente selecionadas para o efeito, fornecem os nutrientes. A mistura de cromogênios é composta por substratos artificiais, que propiciam compostos de várias cores na sequência da degradação por enzimas microbianas específicas, assegurando assim a diferenciação direta de determinadas espécies, ou detecção de determinados grupos de organismos, utilizando apenas um número mínimo de testes de confirmação (MERLINO *et al.*, 1996).

A placa pode ser semeada com auxílio de um swab umedecido com a amostra ou alça calibrada e a sua incubação deve ser feita com a tampa para baixo (PROBAC, 2003).

Para a análise dos resultados, estimar o valor aproximado do número de colônias de acordo com o esquema abaixo (figura 4). O diagnóstico presuntivo de gênero e espécie é realizado de acordo com a coloração da colônia (SAMRA *et al.*, 1998.)

Figura 4: Crescimento de Bactérias Ágar Cromogênico



Fonte: PROBAC

2.2.4 Laminocultivo

Laminocultivo consiste em um recipiente plástico cilíndrico, onde pode também ser coletado a urina, com uma tampa ligada a um suporte plástico com duas faces contendo meios de cultura como CLED e Mac Conkey ou outras combinações. (ANVISA, 2010). Esta técnica é muito utilizada por laboratórios com pequena rotina, e para aqueles de grande movimento pelos seguintes motivos:

- Facilita a semeadura, não necessita de alça calibrada ou outra medida de volume.
- Favorece o transporte da urina semeada utilizando o próprio recipiente do laminocultivo.
- Possui fácil conservação do produto em temperatura ambiente por aproximadamente seis meses.

- Realiza a identificação primária dos principais patógenos encontrados, dependendo do produto adquirido.

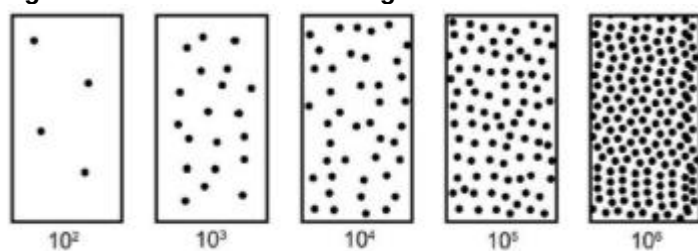
Os meios referidos permitem a identificação através de algumas provas bioquímicas rápidas, e encontrar alguns dos principais gêneros de bactérias ou pelo menos sugerir ou afastar a presença de *E. coli* (ANVISA, 2010).

O laminocultivo é indicado para o diagnóstico presumível dos agentes causadores das infecções do sistema urinário. Ao preparar a amostra deve ser cumprido a metodologia do laboratório, obedecendo às normas de segurança. Pode ser semeada de três formas, sendo elas por imersão direta do laminocultivo na amostra; realizar o gotejamento da amostra sobre o laminocultivo e semear com o auxílio de um “swab” com algodão estéril (ANVISA, 2004; URIBAC, 2007).

O procedimento geral indica que após semeado, o pote deve ser incubado a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, podendo ser estendida para 48 horas (URIBAC, 2007).

A interpretação dos resultados é feita observando o crescimento em meio CLED que determina a capacidade do microrganismo em fermentar a lactose (MACKEY, SANDYS1966). A contagem aproximada em UFC/mL presente na amostra pode ser feita comparando com o padrão de crescimento demonstrado na figura 5.

Figura 5: Laminocultivo contagem de colônias.



Fonte: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Laminocultivos/Uribac%20-%20Rev%2007.pdf>

As principais desvantagens do método são, ser semiquantitativo, possuir a superfície menor de leitura e observação de crescimento (ANVISA, 2010).

Os laminocultivos substituem, com eficácia e qualidade, métodos tradicionais de isolamento, mas nunca de identificação de gênero e espécie, ainda que a urocultura quantitativa fique prejudicada pela falta de padronização do inóculo. (ANVISA, 2010).

É recomendado a utilização de laminocultivo somente em laboratórios de pequeno porte (desde que usados cautelosamente), plantões (visto que, habitualmente o plantonista não é microbiologista), resultando em uma padronização de técnica mais fácil (CAMARGO *et al.*, 2001).

2.3 Avaliação do crescimento e contagem Cultura Quantitativa

Deve-se seguir alguns parâmetros para avaliar a contagem dos microrganismos nas placas, para as culturas quantitativas devemos observar:

A homogeneidade de crescimento pela placa, a contagem separada de todas as colônias diferentes entre 30 e 300 UFC, e para realizar a contagem deve-se marcar com uma caneta o verso de cada unidade contada, para que evite a contagem da mesma colônia (ANVISA, 2010).

As contagens maiores devem ser determinadas por estimativa, dividindo-se a placa em 4 ou 8 partes, observando a semeadura aplicada, visualiza-se a uniformidade do crescimento e conta-se as partes que sejam mais representativas do crescimento total (ANVISA, 2010).

Conta-se o número de UFC da parte escolhida e multiplica-se pelo total de partes, e é necessário converter o número de UFC contadas em UFC/mL ou UFC/g, conforme o material analisado (ANVISA, 2010).

Utiliza-se o fator de correção do volume:

- 1 μL – multiplicar por 1000
- 10 μL – multiplicar por 100
- 100 μL – multiplicar por 10

3 OBJETIVOS

O trabalho buscou simular as possíveis situações *in vitro* de infecções do trato urinário, tanto positivas como negativas, e as técnicas utilizadas para sua semeadura, seguindo os objetivos abaixo.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o crescimento do número de colônias utilizando diferentes metodologias empregadas na semeadura de culturas de urina.

3.2 Objetivo Específico

Utilizar diferentes meios de cultura padronizados para culturas de urina a fim de, avaliar e comparar o crescimento utilizando volumes diferentes.

Utilizar as cepas de: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, para avaliar o crescimento e contagem nos meios de cultura testados.

Utilizar diferentes concentrações bacterianas, baseadas na escala de McFarland, para analisar as variações de culturas positivas e culturas negativas nos diferentes volumes empregados.

Quantificar o número de colônias utilizando metodologia visual, por equipamento e por aplicativos de programas de contagem de colônias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental, de caráter quantitativo e qualitativo, durante o período de junho a setembro de 2023 no Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto.

A respeito da técnica de semeadura, quantitativa, utilizamos o mesmo padrão estabelecido em triplicata para que não ocorresse nenhum viés ou erro de técnica.

4.1 Local do estudo

Como local de estudo prático foi utilizado o Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Barão de Mauá em Ribeirão Preto.

4.2 Amostras e procedimento

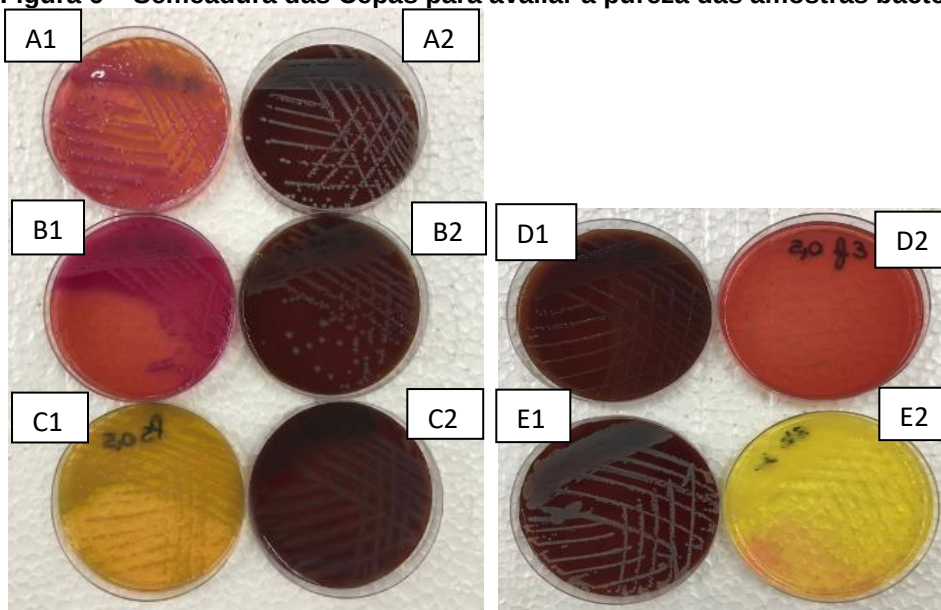
As amostras utilizadas, assim como procedimentos estão descritos em sequência.

4.2.1 Amostras Utilizadas

Para o experimento foram utilizadas cinco cepas ATCC dos agentes com maior ocorrência nas infecções do trato urinário (ITU) descritos na literatura, sendo eles *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Estas cepas foram semeadas em meios enriquecedores e seletivos para avaliar a pureza da amostra bacteriana, na figura 6, é possível visualizar as cepas isoladas nos meios de cultura Ágar Sangue e Mac Conkey para o controle de qualidade, não houve crescimento de contaminantes.

Figura 6 – Semeadura das Cepas para avaliar a pureza das amostras bacterianas.



Klebsiella pneumoniae em ágar Mac Conkey (A1), *Klebsiella pneumoniae* em ágar sangue (A2), *Staphylococcus aureus* em ágar Mac Conkey (B1), *Staphylococcus aureus* em ágar sangue (B2), *Pseudomonas aeruginosa* em ágar Mac Conkey (C1), *Pseudomonas aeruginosa* em ágar sangue (C2), *Enterococcus faecalis* em ágar sangue (D1), *Enterococcus faecalis* em ágar Mac Conkey (D2), *Escherichia coli* em ágar sangue (E1) e *Escherichia coli* em ágar Mac Conkey (E2).

Fonte: Autoria própria

4.2.2 Preparo das amostras bacterianas.

Foram preparadas diluições em solução salina estéril das cepas ATCC na concentração de 0,1 a 0,5 na escala de McFarland, utilizando o Turbidímetro Portátil MCF-500 (figura 7) para ajuste da turvação.

Figura 7 – Turbidímetro Portátil MCF- 500



Fonte: Autoria própria.

4.2.3 Meios de Cultura e Alças de Semeaduras Utilizados

Para a pesquisa foram semeados microrganismos em dois meios de cultura, em placa Agar Cled e Agar Cromogênico. Para a semeadura foi utilizado dois volumes de alça estéril, 1µL e 10 µL. Além destes, foram semeadas as diluições em laminocultivos que apresentavam lâminas com Agar Mac Conkey e Agar Cled em cada face (figura 9).

Figura 8: Ágar Cled estéril.



Fonte: [CLED Agar \(Cystine Lactose Electrolyte Deficient\) | Medical Laboratories \(medical-labs.net\)](http://medical-labs.net)

Figura 9: Laminocultivo com lâminas de Agar Mac Conkey e Agar Cled estéril.



Fonte: <https://www.laborclin.com.br/produto/500214-urilab-cled-mac-conkey-cx-10tb/>

4.2.4 Procedimentos de Semeadura

Todas as semeaduras foram realizadas em triplicata para garantir consistência e replicabilidade, com as mesmas soluções bacterianas e alças calibradas.

4.2.5 Semeadura com Alça de 1 e 10 μ L

Foram utilizadas alças de 1 μ L e 10 μ L para semear os microrganismos em quatro campos sobrepostos e em única estria (técnica quantitativa) nas placas de ágar Cled e Chromagar, como ilustrados nas figuras 2 e 3.

As soluções foram preparadas utilizando o Turbidímetro para as escalas de McFarland de: 0.5, 0.1, 0.3, 0.4 e 0,05 para teste (quadro 1). Após a semeadura as placas semeadas foram encubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 36°C por 24 horas.

Quadro 1 – Escala de McFarland

ESCALA MCFARLAND

Nº	BaCl ₂ 0,048M ml	H ₂ SO ₄ 0,36M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	1,5 · 10 ⁸
1	0,1	9,9	10	3 · 10 ⁸
2	0,2	9,8	10	6 · 10 ⁸
3	0,3	9,7	10	9 · 10 ⁸
4	0,4	9,6	10	12 · 10 ⁸
5	0,5	9,5	10	15 · 10 ⁸
6	0,6	9,4	10	18 · 10 ⁸
7	0,7	9,3	10	21 · 10 ⁸
8	0,8	9,2	10	24 · 10 ⁸
9	0,9	9,1	10	27 · 10 ⁸
10	1	9	10	30 · 10 ⁸

Fonte: <http://monterde2.blogspot.com/2016/06/sesion-8-recuentocoliformes-totales-por.html>

4.2.6 Semeadura em Laminocultivo

A diluição foi preparada para os testes de semeadura em placa e para a semeadura no laminocultivo, efetuados de acordo com as recomendações do fabricante. Realizado o gotejamento da amostra sobre as duas faces da lâmina do laminocultivo, posteriormente foram levadas para incubação em estufa bacteriológica a 36°C por 24 horas.

4.2.7 Leitura das Placas

Para a leitura das placas analisamos a quantidade de colônias com crescimento nas amostras. Essa contagem foi realizada por duas formas: visual com auxílio do contador de colônias e utilizando aplicativos de celulares.

4.2.8 Contagem Visual

Para a contagem visual, a placa foi dividida em 4 campos e a contagem realizada em um quarto da placa, usando o contador de colônias (figura 10).

Figura 10: Contador de Colônias de placa com lupa



Fonte: <https://www.globaltradebr.com.br/contador-de-colonias-digital/p>

4.2.9 Contagem de colônias por aplicativos de celular.

Foram utilizados dois aplicativos, sendo o APD Colony App Lite que possui como fundamento analisar imagens de placa de ágar e contá-las manualmente usando a tela sensível ao toque e o Colony Counter Promega, que fornece uma estimativa de contagem manual, a partir de fotos tiradas das placas de semeadura.

4.3 Armazenamento dos dados

Os dados foram separados em dois tipos de tabelas com o objetivo de comparar as contagens visuais com as que foram feitas pelos aplicativos, realizadas pelas três integrantes deste trabalho.

Todos os dados obtidos foram armazenados em tabelas no formato EXCEL e analisados, com isso, foi possível realizar de forma didática a formação de gráficos demonstrando a comparação das bactérias semeadas nos meios de cultura e seu devido crescimento de colônias.

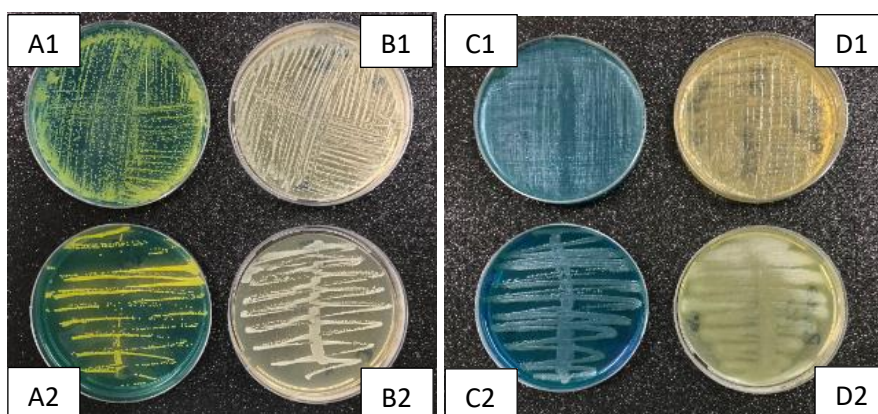
5 RESULTADOS

Ao final do estudo obtivemos os seguintes dados:

Os resultados encontrados nas placas de ágar Cled e Chromagar, quando semeadas em quatro campos e de forma quantitativa com as cepas ATCC mostraram uma contagem de colônias superior a 100.000 UFC/mL nos dois volumes semeados nas diferentes diluições semeadas. Observamos que, o resultado obtido foi concordante nas diferentes condições de semeadura e se comparado com uma amostra clínica característica, seria de um possível quadro de infecção do trato urinário. Como mostra a figura 11, caracterizando boa reprodução das técnicas

Observou-se a reprodutibilidade evidenciado nas figuras 11 e 12, realizado em triplicata, em meios diferentes, as bactérias obtiveram um crescimento concordante.

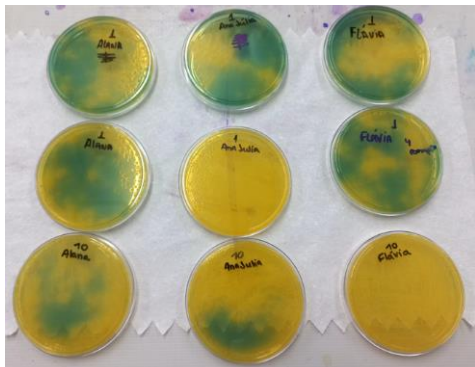
Figura 11 – Semeadura de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de 1,0 MCF e 0,5 MCF, respectivamente em meio CLED e Chromagar.



Staphylococcus aureus semeado em quatro campos em ágar CLED na concentração de 0,5 MCF (A1); *Staphylococcus aureus* semeado em estria única em ágar CLED na concentração de 1,0 MCF (A2); *Staphylococcus aureus* semeado em quatro campos em Chromagar na concentração de 0,5 MCF (B1); *Staphylococcus aureus* semeado em estria única em Chromagar na concentração de 1,0 MCF (B2); *Pseudomonas aeruginosa* semeado em quatro campos em ágar CLED na concentração de 0,5 MCF (C1); *Pseudomonas aeruginosa* semeado em estria única em ágar CLED na concentração de 1,0 MCF (C2); *Pseudomonas aeruginosa* semeado em quatro campos em Chromagar na concentração de 0,5 MCF (D1) e *Pseudomonas aeruginosa* semeado em estria única em Chromagar na concentração de 1,0 MCF (D2),

Fonte: Arquivo do autor.

Figura 12 – Triplicatas da semeadura quantitativa em quatro campos em meio CLED na concentração de 0,5 MCF.



Fonte: Arquivo do autor.

A contagem visual realizada por cada componente do grupo da semeadura quantitativa dos microrganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, estão demonstradas no quadro 2. As contagens em unidades formadoras de colônia (UFC) realizadas foram próximas nas três placas.

Enterococcus faecalis apresentou dificuldade na contagem em UFC, devido ao tamanho das colônias e a proximidade entre elas.

Quadro 2 – Contagem visual Cepas ATCC: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* semeadas com alça de 10µL

Contagem Visual			
	Alana	Ana Julia	Flavia
<i>Escherichia coli</i>	172	161	161
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	163	119	110
<i>Staphylococcus aureus</i>	620	605	764
<i>Enterococcus faecalis</i>	Incontáveis	Incontáveis	Incontáveis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	307	286	306

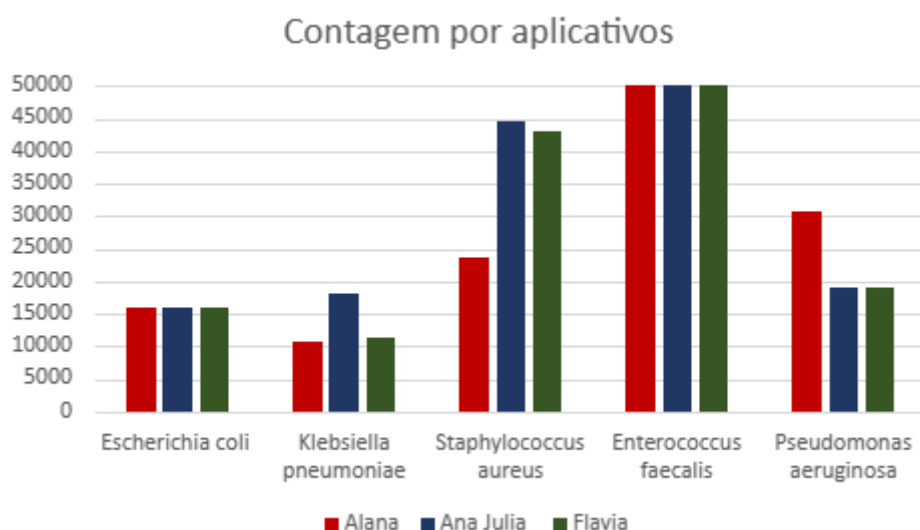
Fonte: Produzidos pelo autor.

Ao ser comparada as contagens utilizando os aplicativos, visto no gráfico 1, algumas pequenas divergências surgiram nos resultados.

Nas amostras de *Escherichia coli* o resultado se manteve nos dois aplicativos. Para *Klebsiella pneumoniae*, as contagens variaram nos dois aplicativos.

Staphylococcus aureus obteve as maiores contagens em relação as amostras dos outros agentes, porém houve redução na contagem de colônias em comparação com a contagem visual 61,6%, 26,3% e 43,7%, respectivamente. Para as amostras de *Enterococcus faecalis* o número de colônias permaneceu incontáveis pelos aplicativos, pois não conseguiram identificar colônias isoladas. Amostras de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram contagens diferentes pelo mesmo aplicativo, sendo elas 307 UFC/mL e 191 UFC/mL (gráfico 1), entretanto quando comparada com o segundo a contagem foi mantida semelhantemente.

Gráfico 1 – Contagem por aplicativos

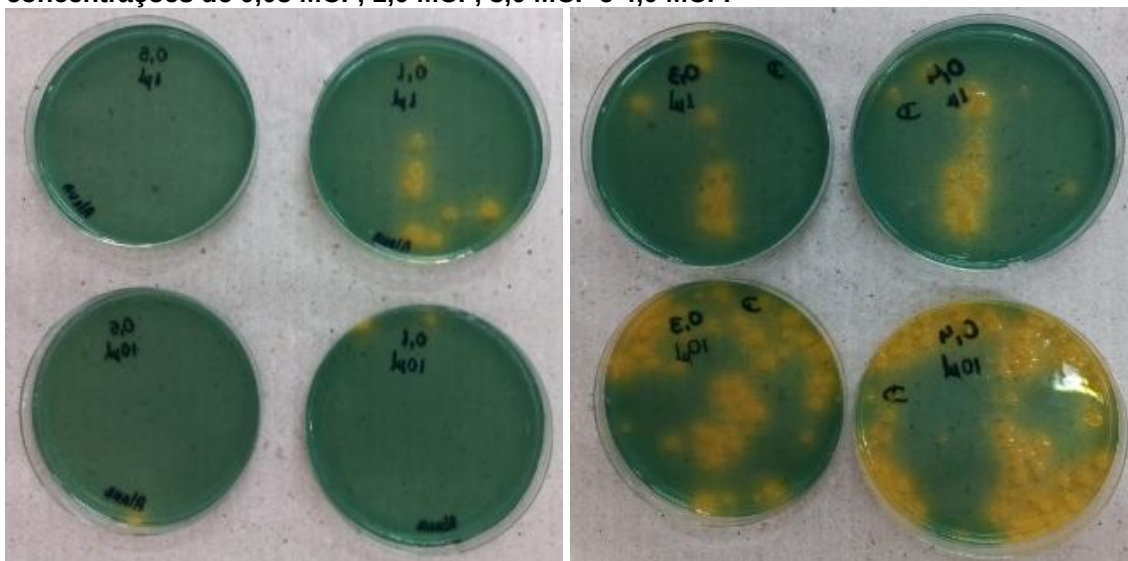


Os enterococos cresceram em toda a placa, impossibilitando a contagem unitária tanto manual como pelo aplicativo.

Fonte: Dados obtidos pela contagem do aplicativo, produzidos durante o estudo.

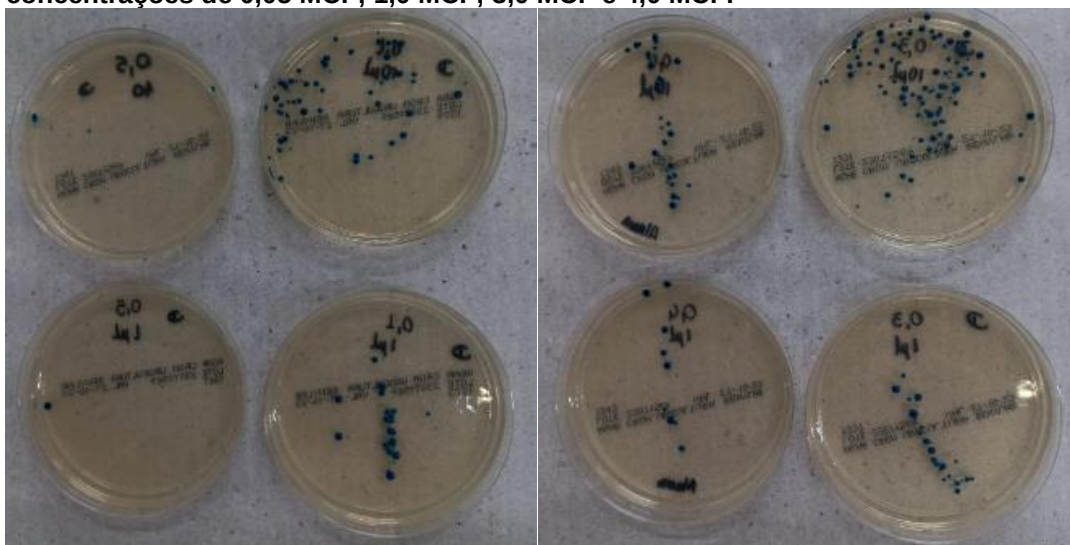
Nas figuras 13 e 14 foi observado o crescimento das colônias em concentrações diferentes (0,05 MCF, 1,0 MCF, 3,0 MCF e 4,0 MCF) e seu comportamento nos meios de ágar CLED (figura 13) e Chromagar (figura 14).

Figura 13 – Cepa ATCC de *Escherichia coli* semeada em duplicata, em CLED nas concentrações de 0,05 MCF, 1,0 MCF, 3,0 MCF e 4,0 MCF.



Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

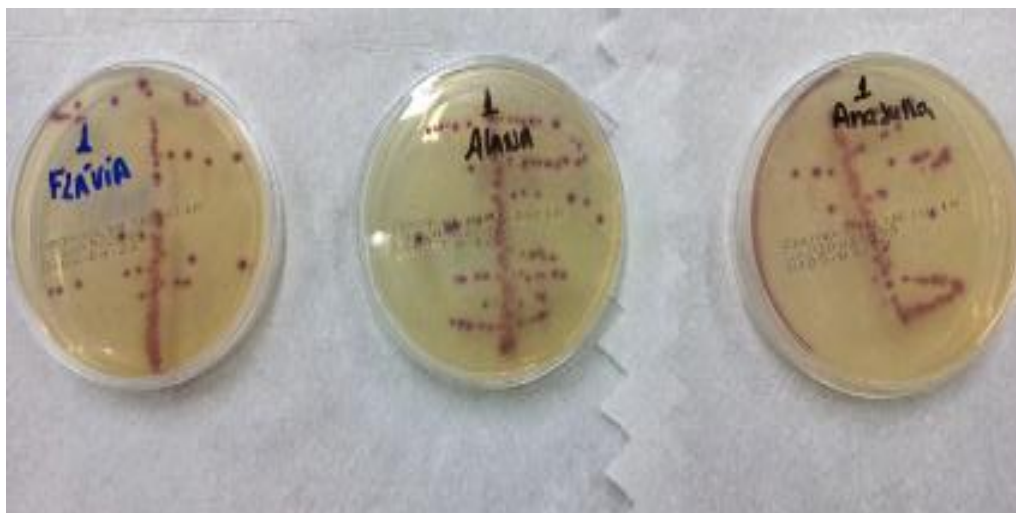
Figura 14 - Cepa ATCC de *Escherichia coli* semeada em duplicata, em Chromagar nas concentrações de 0,05 MCF; 1,0 MCF; 3,0 MCF e 4,0 MCF.



Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

As contagens em Chromagar também obtiveram uma boa reprodutibilidade quando semeadas apenas um agente por placa, como observado na figura 15 de *Escherichia coli*, no entanto, quando semeadas amostras de diferentes microrganismos na mesma placa e com agentes diferentes foi observado que houve uma mistura das bactérias semeadas, indicando erro na técnica e na contagem, como é demonstrado na figura 16.

Figura 15 – Triplicatas da semeadura quantitativa da *Escherichia coli* em Chromagar.



Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

Figura 16 – Triplicatas da semeadura quantitativa em Chromagar com contaminação quando semeadas mais de uma amostra.

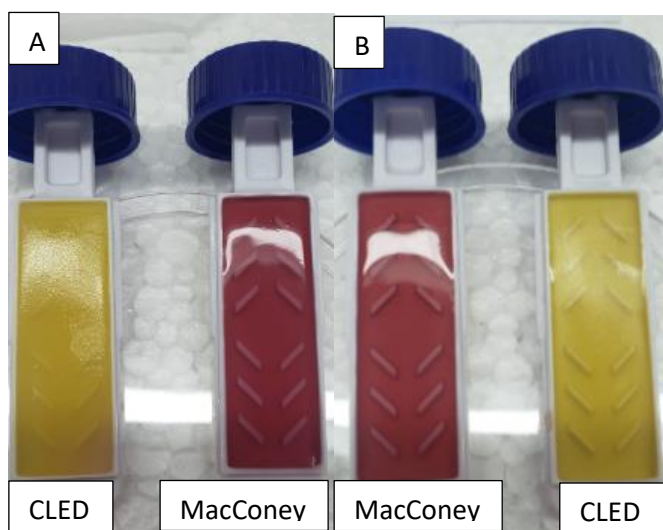


Fonte: Arquivo do autor.

As amostras semeadas em laminocultivo por meio do gotejamento sobre a lâmina, foram inconclusivas, devido a impossibilidade de visualização unitária das colônias para a contagem, como descrita pelo fabricante, representadas nas figuras 17 e 18.

Em relação à utilização e caracterização dos meios de cultura mostrou-se eficiente pois pode-se observar que, os microrganismos utilizaram a lactose presente nas lâminas.

Figura 17 – Laminocultivo das amostras de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.



Crescimento de *Staphylococcus aureus* em Agar Cled, e ausência de crescimento em Agar Mac Conkey (A); Crescimento de *Enterococcus faecalis* em Agar Cled, e ausência de crescimento em Agar Mac Conkey (B).

Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

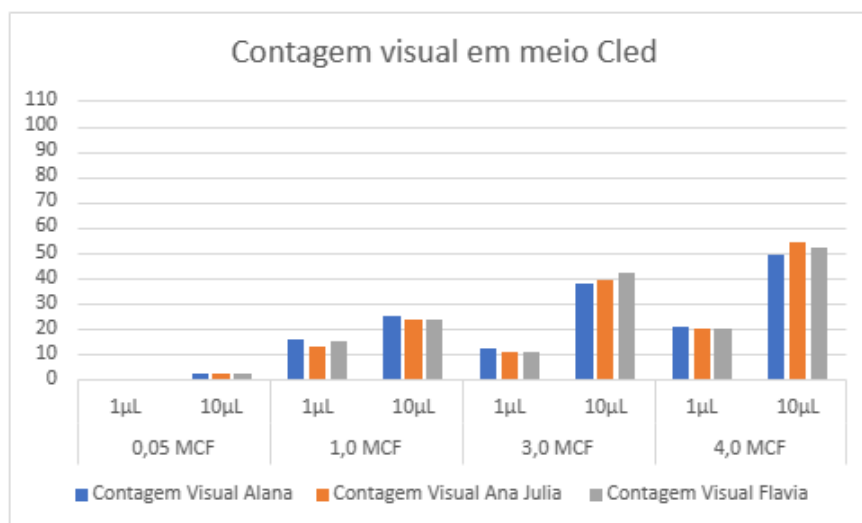
Figura 18 – Laminocultivo da amostra de *Pseudomonas aeruginosa*.



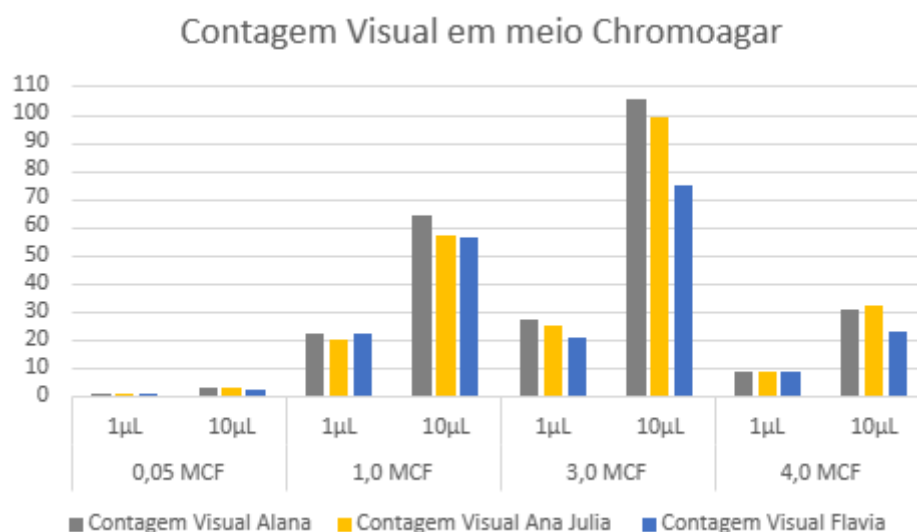
Observação de crescimento de bacilos gram negativos não fermentadores de lactose, meio apresenta-se inalterado.

Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

Os gráficos 2 e 3 evidenciaram concordância nas contagens nos meios de cultura CLED e Chromagar, dos quais apresentam similaridade no número de colônias.

Gráfico 2 – Contagem visual em meio CLED

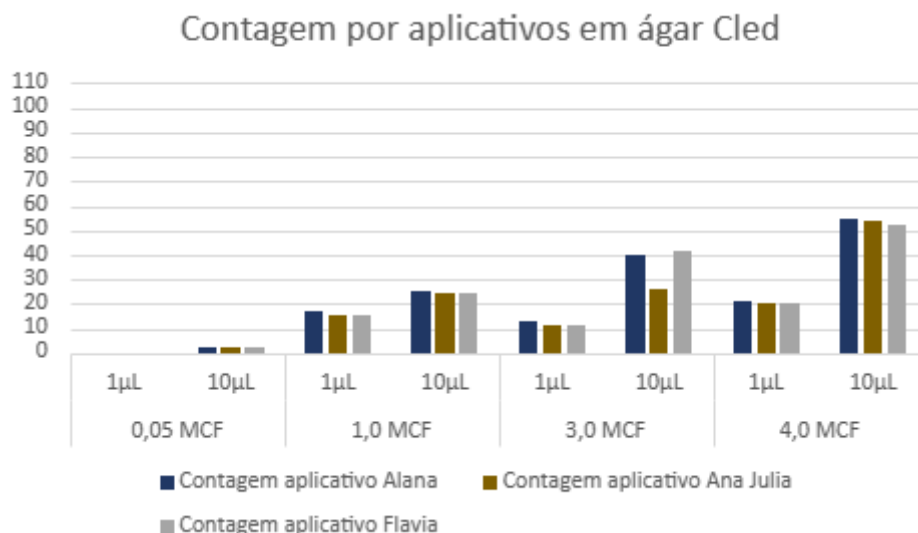
Fonte: Dados obtidos durante o estudo.

Gráfico 3 – Contagem visual em meio Chromagar

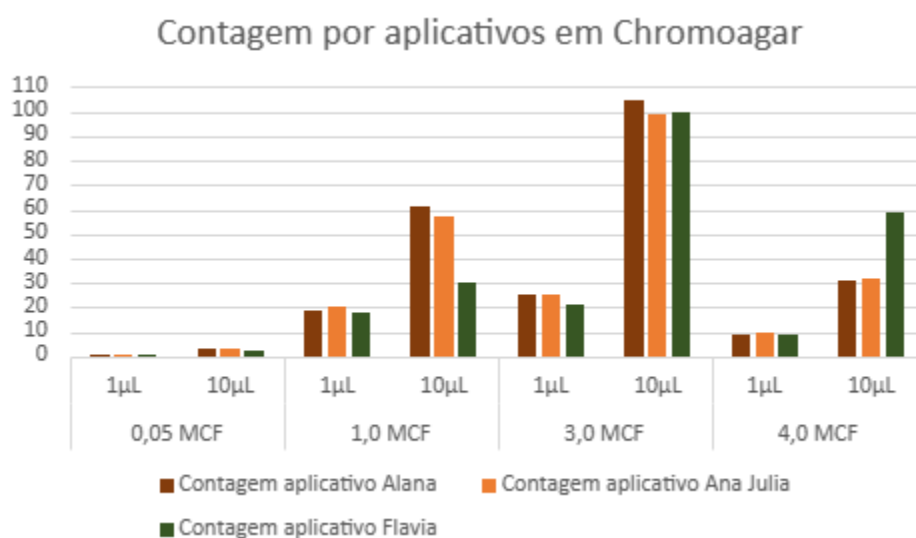
Fonte: Dados obtidos durante o estudo.

Em relação ao ágar Cled (gráfico 4) e ao Chromagar (gráfico 5) foi observado grande homogeneidade nas contagens quando comparadas as concentrações de 0,05 MCF, 1,0 MCF e 4,0 MCF. Apenas na concentração de 3,0 MCF no Agar Cled e na de 4,0 MCF na semeadura de 10 µL no Chromagar que surgiram divergências irrelevantes.

Devido as diferenças entre os aplicativos de celulares para a contagem de colônias encontrados para sistemas Android e IOS, buscamos um aplicativo de cada sistema para fazer as contagens.

Gráfico 4 – Contagem pelos aplicativos no meio CLED

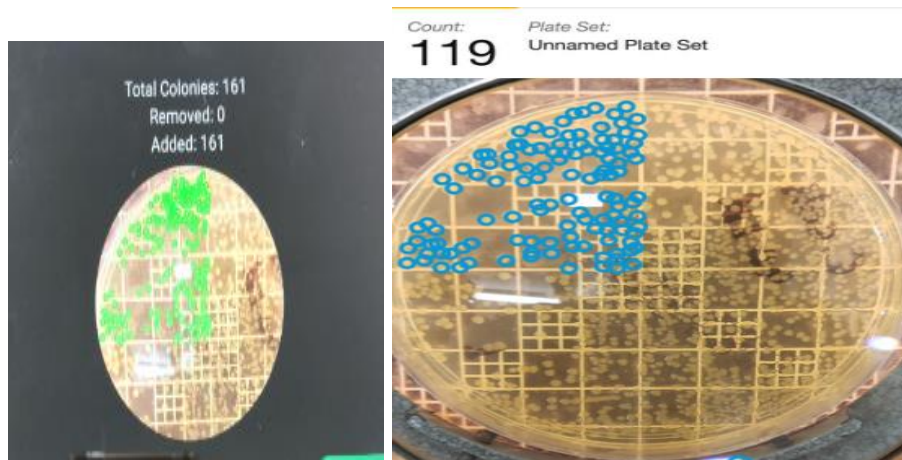
Fonte: Dados obtidos durante estudo.

Gráfico 5 – Contagem pelos aplicativos no meio Chromagar

Fonte: Dados obtidos durante o estudo.

Ao observar as contagens pelos aplicativos, demonstrada na figura 19, houve uma disparidade nos resultados, sendo utilizada como parâmetro a mesma bactéria, *Staphylococcus aureus*. No primeiro aplicativo, APD Colony App Lite, com a presença do crescimento da colônia, a contagem resultou em 161 UFC/mL enquanto no Colony Counter Promega, a contagem foi de apenas 119 UFC/mL. Demonstrando que, ao utilizar os softwares, é necessário observar mesmo visualmente se todas as colônias foram contadas para liberação de resultados.

Figura 19 – Contagem automatizada por meio dos aplicativos APD Colony App Lite e Colony Counter Promega.



Fonte: Resultados obtidos durante o estudo experimental.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou as técnicas empregadas nos laboratórios de microbiologia para a realização dos exames de urocultura, para isso, foram utilizadas cepas controle dos microrganismos que são isolados com maior frequência nas infecções do trato urinário, sendo eles *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (STINGNEL ML, 2022).

Com base nos resultados obtidos pelas contagens visuais das colônias no experimento foi evidenciado que, quando utilizadas metodologias padronizadas e seguindo critérios de reprodutibilidade, todas as semeaduras e volumes são aplicáveis, uma vez que, não houve diferenças significativas capazes de interferir nos resultados dos laudos. Como Camargo aponta em sua revisão que, “A compatibilidade entre cultura e clínica é importante para diagnósticos de ITUs, já que em muitos casos, a utilização de metodologias de triagem em laboratórios é utilizada como guia do microbiologista” (CAMARGO *et al.*, 2001).

Comparando com os casos em que se utilizou o meio Chromagar, os resultados mostraram boa reprodutibilidade nas contagens quando semeadas uma amostra por placa, assim como Ximenes aponta em seu estudo que na maioria dos laboratórios de microbiologia a cultura de urina representa a maior parte dos materiais biológicos encaminhados para cultura, e quando utilizado o Chromagar, é feita a identificação de algumas bactérias em uma única placa, sem a necessidade de realizar os testes de confirmação. Desse modo, é possível realizar a identificação bacteriana mais rapidamente (XIMENES, 2009).

Entretanto, quando foram semeadas mais de uma amostra na mesma placa, caso este que ocorre em algumas rotinas hospitalares e laboratoriais, houve contaminação. Ao realizar semeadura de amostras diferentes seria possível incorrer em um resultado como falso positivo.

No laminocultivo, mesmo seguindo as recomendações do fabricante, os resultados obtidos não permitiram a contagem de colônias isoladas, uma vez que seu crescimento cobriu toda a lâmina, sendo em soluções com alta carga bacteriana ou não. Martino, Toporovski e Mimica (2002), mostram em seu trabalho que além da evidência do crescimento bacteriano o laminocultivo permitiu o diagnóstico rápido de alguns agentes infecciosos, como a *E. coli*, resultando na diminuição do número de provas bioquímicas para a identificação de outros agentes. Diverge-se dos resultados

obtidos durante o estudo, dos quais a identificação dos agentes não foi possível apenas com a observação do crescimento na lâmina, principalmente quando surge mais de um microrganismo, necessitante de outros procedimentos para o isolamento das bactérias.

Laboratórios modernos utilizam sistemas automatizados que aplicam uma quantidade precisa de urina em meios de cultura, interpretam o crescimento e fazem a contagem das colônias, além da rápida liberação de resultados. Isso aumenta a eficiência e reduz o risco de contaminação (SBPC, 2020).

Camargo *et al.* (2001), observou que os softwares utilizados na investigação das ITUs, são importantes pois, oferecem benefícios e facilidades para o paciente quanto para o laboratório, por exemplo, a diminuição do tempo de internação de pacientes e a rapidez da liberação dos resultados. Levando em consideração que, os programas possuem grande potencial de ajuda para a rotina no diagnóstico e para os pacientes, abre-se espaço para que esses aplicativos passem por controles mais rigorosos a fim de melhorar sua acurácia.

Nas contagens realizadas durante o estudo por meio dos aplicativos foi observado pequenas divergências quando comparados os dois softwares, indicando uma possibilidade de aplicação nas rotinas laboratoriais se houver a instauração de controle de qualidade.

7 CONCLUSÃO

Concluímos, portanto, que, as sementeiras em meio de cultura Agar Cled e Chromagar, apresentaram resultados positivos quanto ao crescimento dos diferentes gêneros bacterianos, sendo concordantes em relação ao número de UFC, mesmo utilizando volumes e sementeiras diferentes.

Podemos avaliar que mesmo sendo muito empregado nos laboratórios de Microbiologia, os laminocultivos não se mostraram seguros em relação a contagem do número de colônias devido ao crescimento ser indiferente tanto para concentrações bacterianas pequenas como grandes.

Foi possível observar que, a utilização de laminocultivo para análise de crescimento e caracterização dos microrganismos foi satisfatória, demonstrando algumas características metabólicas que ajudam na identificação bacteriana, sendo necessário alguns procedimentos para finalização.

A contagem de UFC visual pelo laboratorista ou utilizando contador, mostrou-se ainda muito eficiente devido a prática em analisar o crescimento bacteriano, identificar do gênero e verificar se há mais de um tipo de microrganismos presente ou ainda se há necessidade de pedir nova amostra.

Na utilização de métodos tecnológicos, como os aplicativos de contagem de colônias, é preciso precaução para a escolha do tipo de aplicativo devido as diferenças que podem ser vistas nos programas de celulares (Android e IOS), pois a contagem é geral não especificando o tipo bacteriano, portanto é possível que o programa forneça um resultado incorreto se houver mais um de um agente na placa. Desta forma, é necessário criar um protocolo para sua utilização e sempre ter um profissional capacitado para sua interpretação.

Nosso estudo, simulou os exames realizados na rotina microbiológica de uma cultura de urina, mostrando que se seguirmos padrões de qualidade e metodologias reconhecidas por órgãos como a ANVISA, teremos resultados confiáveis e de qualidade.

REFERÊNCIAS

ABBAS, K.; FAUSTO, A. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

A HENGSTLER, K; HAMMANN, R; FAHR, A M. Evaluation of BBL CHROMagar orientation medium for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 35, n. 11, p. 2773-2777, nov. 1997. American Society for Microbiology. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.35.11.2773-2777.1997>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jcm.35.11.2773-2777.1997>. Acesso em: 11 out. 2023.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. Brasília: Anvisa, 2013. 95p. v. 9 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/manuais/manuais-de-microbiologia-clinica>. Acesso em: 08 abr. 2023.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 1. ed. Brasília: Anvisa, https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf?cv=1. Acesso em: 28 out. 2023.

ARMOND, G. A. *et al.* **Manejo e tratamento da infecção urinária**. Contagem: Comissão Municipal de Controle de Infecção em Serviços de Saúde de Contagem (CMCISS), 2009. 25 p. Disponível em: https://www.contagem.mg.gov.br/arquivos/downloads/manejo_e_tratamento_de_infeccao_urinaria.pdf . Acesso em: 20 set. 2023.

ATLAS R. M. **Handbook of Microbiological Media**. 4. ed. Washington, DC: ASM Press, 2010.

BRESOLIN, N. L. *et al.* Infecção do Trato Urinário. **Departamento Científico de Nefrologia - SBP**, Rio de Janeiro, v. 1, p 1-8, 2016. Disponível em: https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/2016/12/Nefrologia-Infeccao-Trato-Urinario.pdf Acesso em: 11 out. 2023.

BRITES, C; SILVA, N; SAMPAIO-SÁ, M. Temporal evolution of the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital in BAHIA, Brazil: a nine-year evaluation study. **Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, Salvador, v. 10, n. 4, p. 235-238. 26 jul. 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/RJNWWDdVpc3kgW7NshTwwcR/?lang=en>. Acesso em: 10 nov. 2023.

CAMARGO, I. L. B. C. *et al.* Diagnóstico bacteriológico das infecções do trato urinário. **Medicina (Ribeirão Preto)**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 1, p. 70-78, 30 mar. 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v34i1p70-78>. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/1194/1213>. Acesso em: 11 out. 2023.

CASSENEGO, A. P. V. **Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus sp.* isolados de "swabs" cloacais de frangos de corte.** 2010. 90 f. TCC (Pós-Graduação) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/25895/000755444.pdf?sequence=1>. Acesso em: 11 out. 2023.

CARVALHO, L. C. F. **Cultura de urina (urocultura).** 2023. Disponível em: <https://profluiscarloscarvalho.comunidades.net/urocultura>. Acesso em: 10 out. 2023

COSTA, A. G. *et al.* Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR. **Biociências**, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 74-81, dez. 2009. Disponível em: https://dadospdf.com/download/perfil-genotipico-de-enterococcus-faecalis-isolados-de-carne-de-frango-e-de-infecao-urinaria-pela-tecnica-molecular-rapd-pcr-5a4d456ab7d7bcab6738d6e2_pdf?cv=1. Acesso em: 22 out. 2023.

COSTA, F. C. **Prevalência e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de microrganismos isolados em urocultura no período de janeiro a dezembro de 2007, em hospital municipal de Ibitiré/MG.** 2007. 80 p. TCC (Pós Graduação em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-99RJD3/1/monografiabianaccosta.pdf>. Acesso em: 18 out. 2023.

COSTA, I. A. C. *et al.* Infecção do trato urinário: revisão de literatura. **Salusvita**, Bauru, v. 38, n. 1, p. 155-193, 28 fev. 2019. Disponível em: https://secure.unisagrado.edu.br/static/biblioteca/salusvita/salusvita_v38_n1_2019/salusvita_v38_n1_2019_completa.pdf?cv=1. Acesso em: 10 out. 2023.

CUNHA, B. D. C. Infecção do Trato Urinário: diagnóstico e tratamento. **Academia de Ciência e Tecnologia.** 2013 Disponível em: http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/microbiologia/microbiologia_das_infeccoes/8-Infeccao-do-trato-urinario-Diagnostico-e-tratamento.pdf. Acesso em: 17 out. 2023.

DONG, Ning *et al.* Klebsiella species: taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **The Lancet Home.** [s.l.], p. 1-11. maio 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9010751/pdf/main.pdf>. Acesso em: 18 out. 2023.

ELLNER, P. D. *et al.* A New Culture Medium for Medical Bacteriology. **American Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 502-504, 1 abr. 1966. http://dx.doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.502. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article->

[abstract/45/4 ts/502/4821088?redirectedFrom=fulltext&login=false](#). Acesso em: 11 out. 2023.

FERREIRA, A. C. B. *et al.* Infecções em cateter de hemodiálise: aspectos microbiológicos e de resistência em uma unidade de referência de Belém. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, Belém, v. 12, n. 4, p. 293-296, dez. 2014. Disponível em: <https://www.sbcm.org.br/ojs3/index.php/rsbcm/article/view/103/99>. Acesso em: 28 out. 2023.

FRANCO, V. C. **Exame laboratorial de urina e urocultura**: uma visão geral. 2017. 13 f. TCC (Graduação) - Curso de Microbiologia Clínica, Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto, 2017. Disponível em: https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/microbiologia/avaliacoes_especificas/27-EXA.PDF. Acesso em: 18 out. 2023.

FUJIYOSHI, S. M. (ed.). **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/ Medicina Laboratorial (SBPC/ML)**: boas práticas em laboratório clínico. Barueri: Manole, 2020. 594 p. Disponível em: <https://bibliotecasbpc.org.br/pags/view.archive.php?ID=2762&PATH=pdf> . Acesso em: 14 out. 2023.

GUERRA, J. E. S. G. *et al.* Infecções do trato urinário: frequência e etiologia em paciente não hospitalizados. **Unimontes científica**, Montes Claros, v. 20, ed. 1, p. 1-15, jun. 2018. Disponível em: <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/832>. Acesso em: 10 out. 2023.

HEILBERG, I. P; SCHOR, N. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário: itu. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 109-116, jan. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302003000100043>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/d9yDDkYdZJyBvhnfgTvyxzv/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 out. 2023.

HOUANG, Elizabeth T. S.; TAM, Po Chu; LUI, Sau Lai; CHENG, A. F. B.. The use of CHROMagar Orientation as a primary isolation medium with presumptive identification for the routine screening of urine specimens. **Apmis**, [s.l.], v. 107, n. 7-12, p. 859-862, mar. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01483.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10519322/>. Acesso em: 19 out. 2023.

KALPANA, S. *et al.* Yao. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens—A Review on Proteomic Perspective. **Diagnostics**, [s.l.], v. 13, n. 6, p. 1014, 7 mar. 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13061014>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-4418/13/6/1014>. Acesso em: 17 out. 2023

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LOPES, H. V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do trato urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 6, p. 306-308, dez. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302005000600008>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/6kHcLNzhk6KyTmmz3cwqDPy/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 11 out. 2023.

MARTINO, M. D; TOPOROVSKI, J; MIMICA, I. M. Métodos bacteriológicos de triagem em infecções do trato urinário na infância e adolescência. **J Bras Nefrol.**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 71-80. abr. 2002. Disponível em: https://www.bjnephrology.org/wp-content/uploads/2019/11/jbn_v24n2a02.pdf. Acesso em: 27 out. 2023.

MCCORMICK, T; ASHE, R. G; KEARNEY, P. M. Urinary tract infection in pregnancy. **The Obstetrician & Gynaecologist**, [s.l.], v.10, n.3, p.156-162, jul. 2008. Disponível em: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1576/toag.10.3.156.27418>. Acesso em: 22 out. 2023.

MERLINO, J *et al.* Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and Enterococcus species. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 34, n. 7, p.1788-1793, jul. 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.34.7.1788-1793.1996>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8784591>. Acesso em: 27 out. 2023.

MONTAGNOLI, F. D. (ed.). **Placa especial cromogênica para semeadura de urina**. 3. ed. Santa Cecília: Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, 2015. 2 p. Disponível em: <http://probacbrasil.com/Anexos/Bulas/Semeadura%20Prim%C3%A1ria/Placas%20Especiais%20Cromog%C3%AAnica%20para%20semeadura%20de%20Urina%20Rev%2003.pdf> . Acesso em: 19 out. 2023.

MONTAGNOLI, F. D. (ed.). **URIBAC**. 7. ed. Santa Cecília: Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda, 2015. 2 p. Disponível em: <http://www.probac.com.br/Anexos/Bulas/Laminocultivos/Uribac%20-%20Rev%2007.pdf>. Acesso em: 19 out. 2023.

MUNDT, J. O. Occurrence of Enterococci: Bud., Blossom., and soil studies **J. Appl. Microbiol.**, Oxford (UK), v. 9, n. 6, p. 541-544, 1961. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16349612/> Acesso em: 10 out. 2023

MURRAY, P. R; BARON, E. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th. ed. Washington: ASM, 2007.

NCCLS. **M7-A6**: Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo. 1 ed. Pennsylvania: CLSI, 2005. 177 p. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf f. Acesso em: 12 out. 2023

OLIVEIRA, K. R. P. **β -lactamases na família Enterobacteriaceae: Métodos de detecção e prevalência.** 2008. 89 f. TCC (Pós-graduação em Medicina – Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <http://docplayer.com.br/4269983-V-lactamases-na-familia-enterobacteriaceae-metodos-de-deteccao-e-prevalencia.html>. Acesso em: 10 out. 2023.

PALACIOS, E. *et al.* Utilidad del medio cromogénico MPO® en el procesamiento habitual del urocultivo. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Granada, v. 20, n. 8, p. 388-390, jan. 2002. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72825-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72825-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X02728255>. Acesso em: 14 out. 2023.

PALLERONI, N. J. The Pseudomonas Story. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 1377-1383, jun. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>. Disponível em: <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>. Acesso em: 17 out. 2023.

PARVEEN, R *et al.* Detection of Uropathogens by Using Chromogenic Media (Hicrome UTI agar), CLED agar and other Conventional Media. **Imsear: Index Medicus for South-East Asia Region**, Faridpur, v. 6, n. 1, p. 46-50, jan. 2011. Disponível em: <https://imsear.searo.who.int/items/b201b98c-da07-420b-a281-be32b57371d6>. Acesso em: 12 out. 2023.

PEREIRA, C. S. R. **Escherichia coli e infecção urinária recorrente em pediatria.** 2016. 20 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26376/1/CatarinaSRPereira.pdf>. Acesso em: 24 set. 2023.

SAMRA, Z. *et al.* Evaluation of Use of a New Chromogenic Agar in Detection of Urinary Tract Pathogens. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v.36, n.4, p.990-994, fev.1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.36.4.990-994.1998>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jcm.36.4.990-994.1998>. Acesso em: 11 out. 2023.

SCARPARO, C. *et al.* Comparative Evaluation of Two Commercial Chromogenic Media for Detection and Presumptive Identification of Urinary Tract Pathogens. **European Journal Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 283-289, 19 fev. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-002-0718-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12072939/>. Acesso em: 19 out. 2023.

SILVA, A. A. da *et al.* Infecção por Staphylococcus Aureus em pacientes hemodialíticos: uma revisão integrativa. **Saúde e Desenvolvimento**, [s.l.], v.14, n.19, p.65-79, 2020. Disponível em: <https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/artic/e/view/1119>. Acesso em: 22 out. 2023.

STINGHEL, M. L. *et al.* Infecção do trato urinário: estudo de sensibilidade e resistência bacteriana em pacientes internados. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 101, n. 1, p. 1-6, 14 fev. 2022. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v101i1e-171057>. Disponível em:

<https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/171057/180021>. Acesso em: 17 out. 2023.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia Trabulsi**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 912 p. Disponível em: <https://www.meulivro.biz/microbiologia/1079/microbiologia-trabulsi-alterthum-6-ed-pdf/>. Acesso em: 13 out. 2023.

WANG, G. *et al.* The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 17, n. 17, p. 6278, 28 ago. 2020. DOI:

<http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17176278>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32872324/>. Acesso em: 23 out. 2023.

XIMENES, L. A. **Avaliação técnica e financeira entre o Chromagar e os meios usuais de análise microbiológica**. 2009. 20 f. TCC (Pós-Graduação em Análises Clínicas e Moleculares) Ac&T Científica, São José do Rio Preto, 2009. Disponível em:

https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/artigoximenes.pdf. Acesso em: 23 out. 2023.