

# MÉTODO DE PROVAS BIOQUÍMICAS PARA BACTÉRIAS GRAM POSITIVO DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS* E *ENTEROCOCCUS*

Data de submissão: 07/03/2024

Data de aceite: 02/05/2024

**Franky Willa Ferreira de Abreu**

Centro Universitário Luterano de Palmas  
Palmas-TO

**Ernane Gerre Pereira Bastos**

Centro Universitário Luterano de Palmas  
Palmas-TO

**RESUMO:** Existem microrganismos com grande potencial infeccioso em todos os ambientes, hoje já sabemos que muitos deles compõem a microbiota humana, mas vivem em simbiose ou relação mútua. Por outro lado, a condição fisiológica do hospedeiro quando são comprometidas podem acarretar um desequilíbrio dessa relação, e os mesmos microrganismos podem levar a uma condição patológica. Diante disso, através de um projeto prático laboratorial esse trabalho tem como objetivo de desenvolver um método de prova bioquímica para bactérias Gram positiva do gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus* em microplacas. Usando como base as provas da Uréia, Lactose, Glicose, Maltose, Sarcrose e Frutose. O trabalho teve resultado relevante devido verificar resultados positivos na inoculação das cepas bacterianas dentro das microplacas, ocorrendo viragem de cor possibilitando uma possível identificação bacteriana. Concluindo

assim que a utilização desse método de prova bioquímica e de grande eficácia para bactérias Gram positiva, além de diminuir os gastos do laboratório, também auxilia na praticidade dentro do laboratório, vendo que em uma única placa pode se fazer várias provas e de vários pacientes.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias Gram-Negativas, Bactérias Gram-Positivas, Uréia, Reações Bioquímicas.

## METHOD OF BIOCHEMICAL TESTS FOR GRAM POSITIVE BACTERIA OF THE GENUS *STAPHYLOCOCCUS* AND *ENTEROCOCCUS*

**ABSTRACT:** There are microorganisms with great infectious potential in all environments, today we already know that many of them make up the human microbiota, but they live in symbiosis or mutual relationship. On the other hand, the physiological condition of the host, when compromised, can lead to an imbalance in this relationship, and the same microorganisms can lead to a pathological condition. Therefore, through a practical laboratory project, this work aims to develop a biochemical test method for Gram positive bacteria of the genus *Staphylococcus* and *Enterococcus* in microplates. Using

as a basis the tests of Urea, Lactose, Glucose, Maltose, Sarcose and Fructose. The work had a relevant result due to the verification of positive results in the inoculation of bacterial strains inside the microplates, with a color change allowing a possible bacterial identification. Concluding that the use of this highly effective biochemical test method for Gram positive bacteria, in addition to reducing laboratory costs, also helps in practicality within the laboratory, seeing that a single plate can be used for several tests and for several patients.

**KEYWORDS:** Gram-Negative Bacteria, Gram-Positive Bacteria, Urea, Biochemical Reactions.

Os microrganismos estão presentes em todos os lugares, interna e externamente no corpo, no meio ambiente, nos objetos etc. Algumas bactérias são benéficas para seu hospedeiro, outras são patogênicas causando graves doenças. As infecções bacterianas ocupam lugar de destaque nas patologias humanas, as do trato urinário surgem em segundo lugar logo após as infecções respiratórias (ROCHA et al., 2018).

A maioria dos laboratórios utiliza, como rotina para identificação desses microrganismos, o método manual, baseado em compostos bioquímicos como glicose, lactose, sacarose, citrato, ornitina, lisina, sulfato de hidrogênio, ureia, fenilalanina, entre outros, incorporados a meios contendo ágar (NETO et al., 2012).

A identificação bacteriana baseia-se nas características morfológicas das células da bactéria, nas características culturais, fisiológicas, sorológicas, ação patogênica e características moleculares. A forma da bactéria, observada ao microscópio após coloração diferencial, a forma da colônia obtida após cultura em meio sólido apropriado, a capacidade de metabolização de substratos particulares, são alguns dos indicadores utilizados na identificação de uma bactéria (ROCHA et al., 2018)

O isolamento e a identificação dessas bactérias nos pacientes auxiliam no tratamento uma vez que doenças infecciosas causadas por bactérias apresentam diferentes cursos e consequências. Testar a susceptibilidade de isolados clínicos a antibióticos, ou seja, estabelecer a concentração inibitória mínima pode ajudar na seleção de antibióticos para a terapia.

Do ponto de vista epidemiológico, os cocos Gram-positivos têm emergido como os principais agentes infecciosos, estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras biológicas humanas em laboratórios de microbiologia. Destacando-se os *Staphylococcus aureus*, os estafilococos coagulase-negativos (ECN) e os enterococos. A detecção de patógenos bacterianos é considerada um indicador da disseminação de um processo infeccioso e tem sido reconhecida como um importante recurso diagnóstico. Conhecer as bactérias mais frequentes e o seu perfil de suscetibilidade são essenciais ao direcionamento apropriado da terapia antimicrobiana nos pacientes (LEÃO et al., 2007).

Como método auxiliar de identificação pode ser empregado a prova da catalase, sendo este um não produtor da enzima. A ausência da produção de catalase é uma importante forma de diferenciar gênero *Staphylococcus* e *Enterococcus*. Onde também são empregados as provas da coagulase, que serve para diferenciar *Staphylococcus aureus* de *Staphylococcus coagulase negativa*. E também o Teste de Sensibilização à Novobiocina (CASTRO et al., 2019).

Trazendo como base a metodologia de provas bioquímicas em microplacas, esse

estudo visa um método de provas bioquímicas para bactérias Gram positivas que ainda não é utilizado no Brasil. Sendo assim, visando melhorar a identificação dessas bactérias e o tratamento bacteriano do paciente, diminuindo os gastos e aumentando o fluxo, possibilitando uma maior análise de pacientes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O inóculo inicial foi feito nos meios Ágar Cled e Manitol para dar início ao crescimento das bactérias que serão usadas no estudo, onde após o seu preparo utilizando uma alça de 10ul, os meios foram semeados e levados à estufa por 24 horas a  $35 \pm 2 \text{ C}^\circ$ .

Teve início ao preparo inicial de solução a base de Uréia, Lactose, Glicose, Maltose, Sacarose e Frutose, onde após o seu preparo tiveram que passar por um controle qualidade para verificar se não houve contaminação, e se as provas estão propícias para prosseguir com o projeto.

Foi iniciado o preparo da solução base, onde foram utilizados 150 ml de água deionizada, 50 ml de cloreto de sódio e 3,2g de caldo de vermelho de fenol. Em seguida foi acrescentado os açúcares; 5ml Uréia 40%; 2,6g Lactose; 5g Glicose; 5g Frutose; 5g Maltose; 5g Sacarose, que foram aquecidos no agitador magnético por 15 minutos, ou até verificar fervura. Logo após os meios tiveram que ser autoclavados por 15 minutos a  $120 \text{ }^\circ \text{C}$ . Que por sua vez foram distribuídos em tubos de ensaio e ficaram em temperatura ambiente.

Após o preparo das provas, foi adicionado 200 ul de cada solução dentro dos poços da microplaca, tanto para as bactérias, quanto para o controle, onde em seguida foram devidamente identificados. Em seguida, foi acrescentado em cada poço 5 ul de solução da bactéria do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

Seguindo o esquema abaixo, a placa foi incubada por 24h a  $35 \pm 2 \text{ C}^\circ$ . Sendo assim, é possível verificar se houve reação positiva ou negativa das bactérias dentro das provas preparadas.

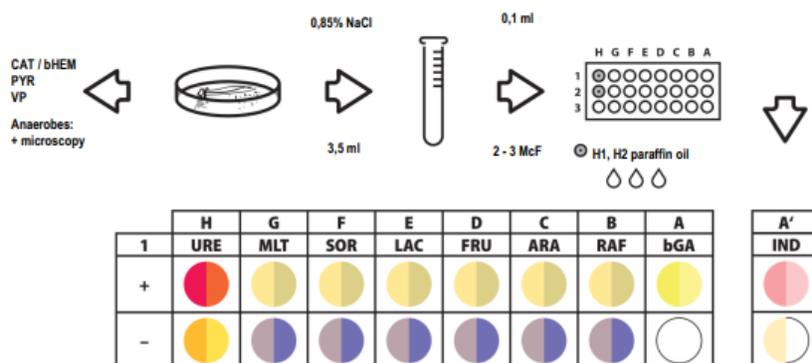


Imagem 1: Esquema do preparo do inóculo dentro da microplaca

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas inicialmente classificadas no gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram submetidas às análises fisiológicas e bioquímicas para a confirmação das bactérias utilizadas, compreendido pelos testes de catalase, coagulase e sensibilidade à novobiocina.

A glicólise é o conjunto de reações iniciais da degradação da glicose, semelhante em todos os tipos de fermentação e na respiração. Fermentação é um processo anaeróbio utilizado pelas bactérias e por leveduras para obter energia. Neste processo não há uso de O<sub>2</sub> ou outro aceptor final de elétrons inorgânico, descritos na respiração aeróbia e anaeróbia, respectivamente. Ao se analisar essa prova bioquímica, verificamos se houve fermentação da glicose, o que traz consigo uma viragem de cor para o amarelo, demonstrando que a bactéria metaboliza o açúcar. (CARDOSO et al., 2016).

A fermentação láctica é realizada de maneira exclusiva por bactérias, especificamente por lactobacilos, ocorre quando a glicólise tem como principal mediador a glicose ou a galactose, obtida a partir da quebra de uma molécula de lactose (açúcar presente no leite). Semelhante à prova da Glicólise, a fermentação da Lactose se dá positivo através da viragem de cor para o amarelo (CAMARGO, Stefanie 2020).

A frutose pode ser anaeróbicamente fermentada por fungos ou por bactérias. As enzimas de bactérias convertem açúcar (glicose ou frutose) a etanol e dióxido de carbono. O dióxido de carbono liberado durante a fermentação permanece dissolvido na água, onde alcançará o equilíbrio com o ácido carbônico, a não ser que a câmara de fermentação seja deixada aberta (CAMARGO, Stefanie 2020).

A Maltose é um carboidrato (glicídio ou açúcar), molécula orgânica formada por átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio. A sua reação é verificada através da viragem de cor como os demais açúcares (CARDOSO et al., 2016).

A prova da Uréia determina a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease. Em caso de reação positiva irá ocorrer a alcalinização do meio para um rosa pink (MARCOS, João. 2016).

Seguindo modelo de Sistema de identificação para bactérias Gram positivas, Sistema de Identificação de *Corynebacterium*, Sistema de Identificação para bactérias anaeróbicas da Diagnostics s.r.o (2020). De início as reações foram feitas em tubos de ensaio, contendo as soluções base de Glicose, Lactose, para verificar se há reação metabólica.

Após os primeiros resultados sendo favoráveis para a pesquisa, e sendo possível analisar as reações metabólicas, como podemos ver na imagem a baixo, deu-se continuidade acrescentando a Maltose e Frutose na solução base, onde além das bactérias do estudo, foi utilizado o tubo controle, para comparar as reações.

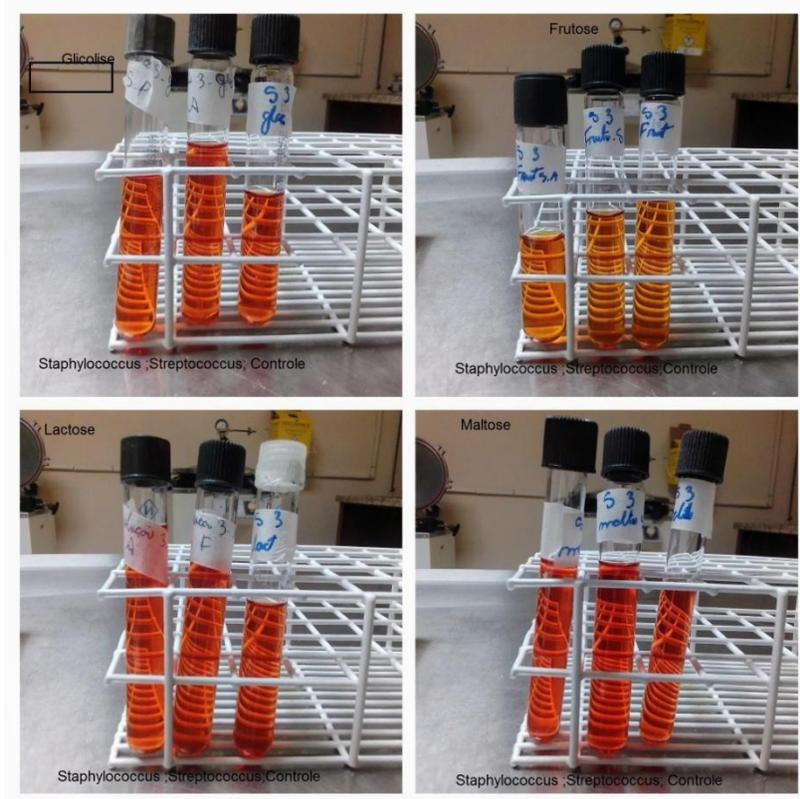


Imagem 2: Foto do segundo experimento contendo os açúcares, as bactérias e o controle.

Com os resultados obtidos nos tubos de ensaio, deu-se início a aplicação das provas dentro da microplaca, utilizando os demais açúcares e uma bactéria Gram negativa para fazer o comparativo. Onde na imagem a seguir foi possível verificar que houve reação metabólica das bactérias, fazendo com que houvesse viragem de cor.

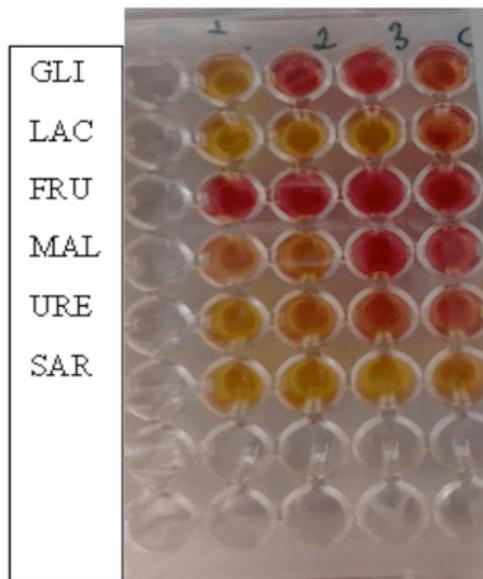


Imagem 3: Foto da reação dentro da microplaca. 1 Streptococcus; 2 Staphylococcus ; 3 Bactéria Gram negativa; Controle

Sendo um método de prova bioquímica que não é utilizado no país, e ainda não tem pesquisas semelhantes que focam no diagnóstico clínico. Mas em comparação com o método da PROBAC BRASIL KIT NF III(2021), que é utilizada para identificação de Gram negativos em microplacas, e que visa outros tipos de reações, os resultados obtidos no projeto são relevantes, visto que com as reações obtidas é possível analisar e fazer a identificação bacteriana.

Com a ECOPLATE (Teste de assimilação de carbono) que também utiliza as reações em microplacas, podemos analisar que as reações de viragem de cor dentro das placas são de grande facilidade para identificação do microorganismo.

Sendo o único laboratório que utiliza o método de prova bioquímica para Gram positivo a Diagnostics s.r.o (2020), traz a relação dos resultados obtidos com as bactérias que foram encontradas, fazendo com que em comparação deste estudo, as reações obtidas na solução preparada estejam dentro das bactérias que foram selecionadas.

Com os resultados obtidos através dos açúcares utilizados na solução base, e em comparação com os métodos atuais utilizados, é possível determinar a sua eficácia dentro da identificação bacteriana, facilitando o diagnóstico dos pacientes, e aumentando o fluxo de realização das provas bioquímicas.

## CONCLUSÃO

A detecção de patógenos bacterianos e a avaliação de seu perfil de suscetibilidade fornecem dados importantes para a racionalização da terapia antimicrobiana e redução das taxas de mortalidade. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir a eficácia do método de prova bioquímica para bactérias Gram positivas em microplacas, tem em vista que houve reação metabólica dentro das soluções, fazendo com que seja possível a identificação das bactérias, e que pode ser semelhante ao método de prova bioquímica para Gram negativa.

Mesmo tendo reações semelhantes em algumas provas bioquímicas, é possível verificar diferenças entre as bactérias, onde junto com as demais provas para Gram positivas facilita uma possível identificação.

Sendo um método que ainda não é utilizado no país, as provas para Gram positivas em microplacas tendem a ser de grande praticidade, visto que segue o método de análise de viragem de cor, onde facilita a análise na placa, trazendo flexibilidade dentro do laboratório de microbiologia fazendo com que seja possível a realização de vários pacientes dentro da mesma microplaca.

## REFERÊNCIA

CASTRO, Barbara *et al.* Prevalência de bactérias Gram-positivas em infecção do trato urinário. **Artigo Original/Original Article**, [S. l.], p. 322-327, 6 set. 2019.

DIAGNOSTICS s.r.o. kit de identificação universal com alta eficiência para a identificação de cocos Gram-positivos. 2020. <http://www.diagnostics.sk/produkty/diagnosticke-supravy/gp-24-2>.

LEÃO, Lara *et al.* Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], p. 537-540, 15 out. 2007.

MAMONA, Bruna *et al.* DETECTAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ADESINAS DAS AMOSTRAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE BEZERRO COM DIARRÉIA EM CRUZ DAS ALMAS, BAHIAS. **Universidade Estadual de Feira de Santana**, [S. l.], p. 1-4, 15 fev. 2018.

NETO, Adelino *et al.* Flora Microbiana de Telefones Públicos Localizados no Campus de Uma Universidade em Cuiabá, MT. **Revista Eletrônica de Biologia**, [S. l.], p. 56-72, 15 out. 2012.

BRASIL, PROBAC. PAINEL PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES DE GLICOSE PROBAC KIT NF III, 2021 <https://site6771.wixsite.com/probac-do-brasil>

ROCHA, Carlos *et al.* Identificação de bactérias presentes em biofilmes de superfícies metálicas. **Rev. Investig. Bioméd.**, [S. l.], p. 172-180, 15 fev. 2018.

SOUZA, Leandro *et al.* Estrutura metabólica e genética de comunidades bacterianas em solo de cerrado sob diferentes manejos. **Pesq. agropec. bras**, [S. l.], p. 269-276, 15 fev. 2012.