



INTER
FACES
CIENTÍFICAS

SAÚDE E AMBIENTE

ISSN IMPRESSO 2316-3313

ISSN ELETRÔNICO 2316-3798

ANÁLISE CRÍTICA DA UTILIZAÇÃO DO CONGELAMENTO PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS DE URINA DESTINADAS À UROCULTURA

Rosiane Cavalcanti Souza Fernandes¹
Malone Santos Pinheiro²

Plácia Barreto Prata Góis²
Débora Machado Barreto⁴

RESUMO

As infecções do trato urinário (ITU) são uma das mais frequentes infecções bacterianas do ser humano. É uma patologia que ocorre em todas as idades, tendo predomínio no sexo feminino. Os principais agentes responsáveis pelas ITU's são *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Proteus sp*, *Enterobacter sp*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus saprophyticus*. Fatores como a coleta, conservação e o transporte são importantes para obtenção de amostras de urina adequadas para diagnóstico das ITU's. O presente estudo teve como objetivo analisar a viabilidade do congelamento de amostras de urina por mais de 24h para que possa ser utilizada como método de conservação. Para tanto, utilizou-se de urina estéreis contaminadas artificialmente pelas bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus agalactiae*, que foram congeladas em temperatura entre -15°C e -20°C. Após 24h de congelamento,

todas as bactérias tiveram crescimento, entretanto as bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram uma diminuição significativa no número de colônias. Após 48h, as bactérias gram negativas não obtiveram crescimento e as bactérias gram positivas cresceram, mas houve redução no número de colônias. Após 72h, as bactérias gram positivas obtiveram crescimento embora o número de colônias continuarem diminuindo. Após uma semana, somente *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecium* obtiveram crescimento, entretanto o número de colônias foram ainda menores. Assim sendo, conclui-se que o congelamento da urina não é viável para transporte ou conservação de amostras para urocultura.

PALAVRAS-CHAVE

Urocultura. Conservação. Congelamento.

ABSTRACT

The urinary tract infections (UTI) are one of the most frequent bacterial infections of humans. It is a condition that occurs in all ages, with predominance of females. The main agents responsible for UTI's are *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus*, *Enterobacter* sp, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus saprophyticus*. Factors such as the collection, storage and transport are important for adequate urine samples for diagnosis of UTI's. This study aimed to analyze the viability of freeze urine samples for more than 24 hours for it to be used as a preservation method. For this we used a sterile urine spiked by bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium* and *Streptococcus agalactiae*, which were frozen in temperature between -15°C and 20°C . After 24 hours of freezing, all bacteria grew, however

the bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* showed a significant decrease in the number of colonies. After 48 hours, the negative gram bacteria did not get growth and positive gram bacteria grew, but there was a reduction in the number of colonies. After 72 hours, the positive gram growth obtained although the number of colonies continued to decline. After a week, only *Streptococcus agalactiae* *Enterococcus faecium* obtained growth, however the number of colonies were even lower. Thus, it follows that freezing of urine is not viable for transportation or storage of samples for urine culture.

KEYWORDS

Urine Culture. Conservation. Freezing.

RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las infecciones bacterianas más comunes de los seres humanos. Es una condición que se produce en todas las edades, con predominio en el sexo femenino. Los principales agentes responsables de las infecciones urinarias es *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp, *Enterobacter* sp, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus saprophyticus*. Factores tales como la recogida, el almacenamiento y el transporte son importantes para las muestras de orina adecuadas para el diagnóstico de la IU de. El presente estudio tuvo como objetivo examinar la viabilidad de la congelación de las muestras de orina de más de 24 horas para que pueda ser utilizado como un método de conservación. Para ello se utilizó orina estéril contaminado artificialmente por las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium* y *Streptococcus agalactiae*, que se congelaron a temperaturas entre -15°C y -20°C . Después

de 24 horas de congelación, todas las bacterias crecieron, sin embargo, las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* mostraron una disminución significativa en el número de colonias. Después de 48 h, las bacterias gram-negativas no alcanzaron el crecimiento y bacterias positivas crecieron, pero no hubo una reducción en el número de colonias. Después de 72 horas, el crecimiento positivo de colonias siguió disminuyendo. Después de una semana de la congelación entre 15° y 20° , *Streptococcus agalactiae* *Enterococcus faecium* obtuvo crecimiento, sin embargo, el número de colonias era aún más bajo. Por lo tanto, se concluye que la congelación de la orina no es factible para el transporte o almacenamiento de muestras para cultivo de orina.

PALABRAS CLAVE

Cultivo de orina. La conservación. Congelación.

1 INTRODUÇÃO

As infecções do trato urinário (ITU) estão entre as infecções bacterianas de maior frequência nos seres humanos, estando muito predominantemente associada ao sexo feminino (SILVA, 2008; CUNHA et al., 2010).

A ITU acomete todas as idades, desde o neonato ao idoso. Nos três primeiros meses de vida a maior incidência ocorre no sexo masculino. A partir dos três primeiros meses as meninas passam a ser mais acometidas, principalmente nas fases pré-escolares (HEILBERG; SCHOR, 2003; SILVA, 2008; CUNHA et al., 2010).

Na vida adulta, a maior incidência é no sexo feminino, principalmente durante a fase sexual ativa, gestação e menopausa. O número de gestações, o diabetes, uso de certas geleias espermicidas, higiene pessoal deficiente, baixas condições socioeconômicas, obesidade e a idade aumentam a predisposição das mulheres a desenvolver ITU (HEILBERG; SCHOR, 2003; SILVA, 2008).

Outro fator que aumenta a susceptibilidade das mulheres à ITU é a anatomia da uretra, por ser mais curta e devido à proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal, produz um canal chamado de ponte, dando livre acesso para os microrganismos uropatogênicos transitarem até o sistema urinário. As mulheres, também, possuem a bexiga maior do que os homens, podendo armazenar mais urina, o que serve de meio de colonização das bactérias (HEILBERG; SCHOR, 2003; SILVA, 2008).

A frequência das ITU's em pacientes adultos do sexo masculino ocorre devido à instrumentação das vias urinárias, como cateterismo vesical e hiperplasias prostáticas. No homem, o maior comprimento uretral, o fator antibacteriano e o maior fluxo urinário atuam como protetores contra o desenvolvimento da ITU (HEILBERG; SCHOR, 2003; LOPES; TAVARES, 2005; SILVA, 2008; CUNHA et al., 2010).

As infecções do trato urinário podem ser classificadas como complicadas ou não complicadas. A ITU complicada tem maior risco de falha terapêutica e está associada a fatores que favorecem a ocorrência da infecção, sendo estas de caráter obstrutivos, anatomofuncionais e metabólicas. A ITU não complicada ocorre em pacientes com estrutura e função urinária normal e é adquirida fora do ambiente hospitalar, geralmente ocorrem em mulheres jovens e sexualmente ativas (HEILBERG; SCHOR, 2003; SILVA, 2008; CUNHA, et al., 2010).

A infecção pode afetar mais de um local do trato urinário, quando localizada na uretra é chamada de uretrite, na bexiga, cistite, e a nível renal, pielonefrite. As uretrites e cistites são denominadas infecções das vias urinárias baixa, e a pielonefrite, infecção das vias urinárias alta, que podem aparecer juntas ou separadas (SILVA et al., 2005; SILVA, 2008).

Existem três formas das bactérias alcançarem o rim: via hematológica, via ascendente e linfática. A disseminação pela via hematológica ocorre por meio da corrente sanguínea, a via ascendente ocorre através do trato urinário e a via linfática, ainda desconhecida, pode ocorrer a partir dos tubos linfáticos. Sendo mais comum a via ascendente, principalmente em mulheres, em que a bactéria sai da uretra até chegar ao rim (CUNHA et al., 2010).

Na comunidade, os agentes etiológicos que envolvem a ITU mais frequentemente encontrados são *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp, *Enterobacter* sp, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus saprophyticus*. Os germes gram-negativos, responsabilizam-se por 70% a 85% das infecções do trato urinário adquiridas na comunidade, e por 50% a 60% em pacientes idosos admitidos em asilos (SILVA, 2008, MENEZES et al., 2009).

Quando se trata de ITU adquirida no hospital, predominam as enterobactérias, com diminuição na frequência de *E. coli* (embora ainda permaneça habitualmente como a primeira causa), e um crescimento de *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Enterococcus faecalis* e de fungos, com destaque para *Candida sp.* (SILVA, 2008).

A urina é composta por substâncias orgânicas (ureia, creatinina e ácido úrico) e inorgânicas (cloreto, sódio, potássio e outros). Também pode ser encontrados hormônios, vitaminas e medicamentos, além de outras substâncias como células, cilindros, cristais, muco e bactérias que podem ser usado como indicativo de doença (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

A presença da bactéria na urina é indicativa de ITU, já que o rim e as vias urinárias são estéreis. A urocultura quantitativa é o exame confiável no diagnóstico de ITU (LO et al., 2010).

A presença de um único tipo de bactéria com contagem maior ou igual a 105 UFC/mL é o que define o diagnóstico de ITU eliminando a possibilidade de contaminação (LO et al., 2010).

A coleta da urina para urocultura deve ser feita no período da manhã, de preferência a primeira micção do dia ou qualquer urina duas horas após a retenção vesical. Deve ser feita rigorosa assepsia das genitais com água e sabão neutro e, posteriormente, secagem com gaze estéril, o ideal é colher o jato intermediário (jato médio) (ANVISA, 2013).

O método mais utilizado para conservação é a refrigeração, conservando a urina pelo período de 24h, o qual evita a decomposição das bactérias da urina e impede a proliferação bacteriana (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

Um outro método de conservação é a utilização de conservantes químicos, um dos principais conservantes químicos para a urocultura é o ácido bórico que

mantém o pH em aproximadamente 6.0, agindo como bacteriostático (não bactericida). Este componente, possibilita que durante a contagem da colônia, esta se aproxime o mais fielmente possível da contagem inicial, minimizando chances de resultados “falso-positivo”, podendo assim ser usado para transporte de amostras (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

Hoje em dia existe uma evidente preocupação nos cuidados a serem tomados na coleta de amostras de urina destinadas à urocultura, e principalmente no que diz respeito a seu transporte e conservação. A conservação inadequada ou impossibilidade de refrigeração dentro do tempo padrão altera significativamente o número de bactérias da amostra. Na necessidade de transportar amostras de urina para laboratórios mais distantes, onde se requer tempo maior que 24h, a refrigeração não é suficiente e não há um método de conservação que possa ser utilizado.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a viabilidade do congelamento de amostras de urina por mais de 24h para que possa ser utilizado como método de conservação e dessa forma, contribuir para otimização da fase pré-analítica dessas amostras que são responsáveis pelo maior contingente nos laboratórios de microbiologia.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para as amostras testes, foi feito um pool de urina, onde foram utilizadas oito amostras obtidas em coletores estéreis. Foi retirada uma alíquota de 10ml para realizar o sumário de urina, onde foram observados, principalmente, os seguintes parâmetros: leucócitos, nitrito e bactérias, pois a presença destes inviabilizava a amostra.

Após a realização do sumário, toda urina foi depositada em tubos cônicos estéreis e fechadas com parafilme. Em seguida, para esterilizar o pool de urina, foi centrifugada por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membrana chromafil de 0,20/ μ m.

Para a realizar o teste de esterilidade, retirou-se 100µl do pool de urina e colocou-se em um tubo de caldo TSB, e em seguida, foi incubado a 36°C por 24h, o teste foi feito em triplicata. Após 24h, foi feita a leitura, a presença de turvação era indicativo de contaminação, devendo descartar o pool, se límpida, ausência de microrganismo, teste de esterilidade positivo, poderia ser utilizada para os testes.

As bactérias para as amostras testes, foram reativadas em caldo de enriquecimento TSB, e incubadas em 36°C por 24h. Foram utilizadas cinco espécies de bactérias, duas gram negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e três gram positivas, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus agalactiae*. Em seguida, preparou-se uma suspensão bacteriana na escala de 0,5 Mac Farland em solução salina. Foi transferida 100µl da suspensão bacteriana para tubos contendo 1mL da urina estéril.

Os controles positivos, consistiam de 100µl da suspensão bacteriana e 1ml de caldo TSB. E controle negativo, somente o pool de urinas estéreis.

Amostras teste, controle positivo e negativo, foram semeadas em Ágar Sangue e incubadas a 36°C por 24h (tempo 0h). Após 24h de incubação foi feita a contagem de colônias. Os mesmos procedimentos foram realizados após 24h, 48h, 72h e uma semana de congelamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A solicitação de amostras de urina para realização de urocultura responde pela principal demanda da maioria dos laboratórios de microbiologia. Cuidados que envolvem a amostra na fase pré-analítica, como coleta e transporte, são fundamentais para obtenção de resultados fidedignos (PEZZLO, 2014).

Segundo a ANVISA (2013), as amostras urinárias destinadas à cultura devem ser obtidas por meio da primeira micção matinal, ou após duas ou três horas

de intervalo entre micções. Quanto à conservação dessas amostras, é indicado que, caso não seja possível processá-las imediatamente, essas podem ser conservadas sob refrigeração (2 – 8°C) durante um período máximo de 24 horas sem prejuízo para viabilidade dos uropatógenos.

Esse período é mais que suficiente para laboratórios que possuem o serviço de microbiologia, contudo, devido a peculiaridades que envolvem essa área a terceirização das análises microbiológicas é uma opção muito utilizada pelos laboratórios clínicos, gerando necessidade de métodos que possibilitem a conservação de espécimes biológicos por mais tempo, a exemplo da criopreservação.

Antes de submetidas ao congelamento e após 24h de incubação, todas as bactérias cresceram nas seguintes concentrações: *Escherichia coli* 156 UFC/mL, *Staphylococcus saprophyticus* 486 UFC/mL, *Enterococcus faecium* 769 UFC/mL e *Pseudomonas aeruginosa* 820 UFC/mL, *Streptococcus agalactiae* 1244 UFC/mL (Figura 1).

Congeladas por 24 horas, todas as bactérias obtiveram crescimento, entretanto a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram uma abrupta diminuição no número de colônias, 3 UFC/mL e 14 UFC/mL, respectivamente, enquanto que as bactérias gram positivas obtiveram as seguintes concentrações: *Staphylococcus saprophyticus* 286 UFC/mL, *Streptococcus agalactiae*, 1.144UFC/mL, *Enterococcus faecium*, 736 UFC/mL (Figura 1).

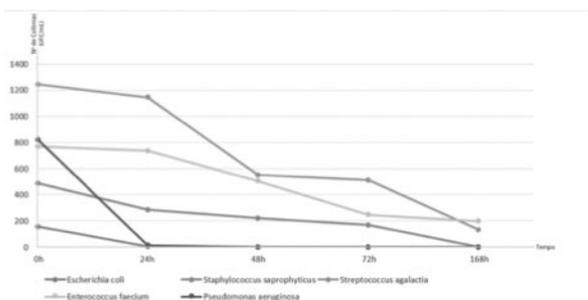
Após 48 horas, as bactérias gram negativas não estavam viáveis, diferente das gram positivas que ainda se mantiveram, apesar de diminuição das células viáveis (*Staphylococcus saprophyticus* 222 UFC/mL, *Streptococcus agalactiae* 551UFC/mL, *Enterococcus faecium* 504UFC/mL) (Figura 1).

Passadas 72 horas de congelamento, as bactérias gram positivas obtiveram crescimento, no entanto, o

número de colônias continuaram a diminuir apresentando 168 UFC/mL para *Staphylococcus saprophyticus*, 511 UFC/mL *Streptococcus agalactiae* e 247 UFC/mL *Enterococcus faecium* (Figura 1).

A análise após 168 horas demonstrou que somente o *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecium* obtiveram crescimento, entretanto o número de colônias foi ainda menor, 133 UFC/mL e 200 UFC/mL, respectivamente (Figura 1).

Figura 1 – Número absoluto de bactérias viáveis (UFC/mL) durante os diferentes tempos estudados.



Fonte: Dados da pesquisa, 2014.

Não houve crescimento das bactérias no controle negativo nos tempos testados, demonstrando que não houve contaminação durante toda a pesquisa.

Apenas as bactérias *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus faecium* conseguiram manter-se viável até o período de uma semana, enquanto as demais não resistiram ao congelamento, tendo decaimento gradativo de acordo com o tempo, o que demonstra que o procedimento de congelamento da urina não é viável.

Segundo Medeiros (2008), o congelamento a -20°C é a forma mais acessível para conservação de bactérias, entretanto, pode sofrer variações de acordo com o meio utilizado para o congelamento. Este método pode conservar as bactérias por até um ano, desde que a estabilidade do congelamento seja man-

tido, não ocorrendo mudanças bruscas de temperaturas. Para tanto é necessário o uso de crioprotetores, como o glicerol e “skim milk”, que vão agir protegendo os microrganismos, impedindo a formação de cristais que danifiquem a membrana bacteriana e forneçam fontes de carbono necessária para mantê-las viáveis.

No presente estudo as bactérias foram congeladas emulsionadas nas amostras urinárias, que apesar de possuírem fontes de carbono suficientes para seu pleno desenvolvimento, provavelmente não exerceram função crioprotetora efetiva e, portanto, não evitaram a morte celular.

4 CONCLUSÕES

Enterococcus faecium e *Streptococcus agalactiae* apresentaram-se viáveis após longo período de congelamento (168 horas), contudo, os microrganismos com maior valor epidemiológico em ITU como *Escherichia coli* e *Staphylococcus saprophyticus* demonstraram não suportar o congelamento.

Diante do exposto, pôde-se concluir que apesar da criopreservação a -20°C ter demonstrado ser eficiente nas primeiras 24 horas para microrganismos Gram positivo, o mesmo não ocorreu com os Gram negativo, tornando o método em questão inapto para ser utilizado como procedimento de rotina pelos laboratórios de microbiologia.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Brasília: **ANVISA/MS**, 2013.
- CUNHA, O.; GARRIDO, A.; GONÇALVES, M. et al. Utilidade da Urocultura de controle na infecção urinária. **Acta Pediátrica Portuguesa**. Vila Nova de Gaia, v.41, n.2, 2010, p.51-53.

HEILBERG, I. P.; SCHOR, N. Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Infecção do Trato Urinário – ITU. **Revista Associação Médica Brasileira**, v.49, n.1, 2003, p.109-116.

LO, D. S.; RAGAZZI, S. L.; GILIO, A. E.; et al. Infecção urinária em menores de 15 anos: etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana em hospital geral de pediatria. **Revista Paulista de Pediatria**. v.28, n.4, 2010, p.299-303.

LOPES, H. V.; TAVARES, W. Diagnóstico das infecções do Trato Urinário. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.51, n.6, 2005.

MEDEIROS, A W. **Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias**. 2008. 32f. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Centro Universitário, FEEVALE. Novo Hamburgo, RS, 2008.

MENDONÇA, A. W. **Acompanhamento de métodos de congelamento de bactérias**. 2008. 32f. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Centro Universitário, FEEVALE Novo Hamburgo, RS, 2008.

MENEZES, K. M. P.; GÓIS, M. A. G.; OLIVEIRA, I. D. et al. Avaliação da resistência da Escherichia coli frente a Ciprofloxacina em uroculturas de três laboratórios clínicos de Aracaju-SE. **RBAC**, v.41, n.3, 2009, p.239-242.

PEZZLO, M.T.; Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections: Guidelines, Challenges, and Innovations. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.36, junho 2014, p.87-93.

SILVA, C. H. P. M.; LINS, A. P.; SOUZA, D. R. et al. Desenvolvimento e Utilização de Conservante Químico em Amostras de Urina para Análises Microbiológicas (Urocultura) e Rotina (E.A.S). **RBAC**, v.37, n.3, 2005, p.137-147.

SILVA, C. H. P. M. Urocultura. **Protocolo de Microbiologia Clínica**, [s.l.], v.88, n.3, 2008, p.132-137.

STRASINGER, S K; DI LORENZO, M S. **Urinálise e fluidos corporais**. 5.ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2009.

1. Graduanda do Curso de biomedicina – UNIT.
E-mail: rosiane_fernandes@hotmail.com

2. Doutora em Biotecnologia, Professora da Universidade Tiradentes.
E-mail: placia@uol.com.br

3. Biomédico, Doutor em Biotecnologia, Professor da Universidade Tiradentes. E-mail: malonepinheiro@hotmail.com

4. Biomédica, Mestre em Biologia Parasitária. E-mail: deborinha.barreto@hotmail.com

Recebido em: 4 de Agosto de 2014
Avaliado em: 23 de Setembro de 2014
Aceito em: 12 de Novembro de 2014
