




ESTUDO E DESCRIÇÃO DE ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS COM USO DO KIT COMERCIAL COMPACT DRY

 <https://doi.org/10.56238/levv15n41-110>

Data de submissão: 30/09/2024

Data de publicação: 30/10/2024

Márcia Leticia Mathara Pompilio

Aluna do Curso Técnico em Química
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) – Campus Porto Velho
Calama
E-mail: leticiamatharapompilio@gmail.com

Maria Clara Camilo da Silva

Aluna do Curso de Engenharia Química
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) – Campus Porto Velho
Calama
E-mail: mclaracamilo.s@gmail.com

Júlia Luges Cristal

Aluna do Curso de Engenharia Química
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia (IFRO) – Campus Porto Velho
Calama
E-mail: juliacristal5060@gmail.com

Nathália Kelly de Araújo

Dra. em Biotecnologia
Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Rondônia (IFRO) – Campus Porto Velho Calama
E-mail: araujo.nathalia@ifro.edu.br

Edailson de Alcântara Corrêa

Dr. em Biodiversidade e Biotecnologia
Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia de Rondônia (IFRO) – Campus Porto Velho Calama
E-mail: edailson.correa@ifro.edu.br

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo estudar e descrever ensaios microbiológicos realizados com o kit comercial Compact Dry. Os estudos e descrição de novos métodos de análises microbiológicas requerem uma descrição e caracterização da relação a um método padrão, este processo de avaliação e caracterização denomina-se validação. Os resultados dos estudos técnicos são relevantes e contribuem com as análises do desempenho do kit, bem como são satisfatórios e efetivos de acordo com os parâmetros analisados e descritos por estudos, instituições de pesquisas e órgãos de validação. Desta forma, os dados levantados e descritos contemplam critérios técnicos das análises e da descrição com o novo kit comercial - Compact Dry, mostrando ser eficiente nas análises microbiológicas de água.



Palavras-chave: Kit Cromogênico. Escherichia Coli. Análises. Água.

1 INTRODUÇÃO

De acordo com Carneiro (2022), a identificação de micro-organismos é, tradicionalmente, baseada em culturas microbiológicas e em processos bioquímicos. Os avanços tecnológicos apontam que, historicamente, a microbiologia tem sido responsável por grandes avanços de estudos fisiológicos e moleculares, dentre eles destacam-se o desenvolvimento de meios de cultura seletivos e diferenciais, virologia, genética microbiana e metabolismo microbiano (Borin; Martins; Taketani, 2021). Adicionalmente, segundo os autores, *op. cit.*, os kits de identificação de cepas vêm sendo aprimorados pela Era dos MMR -Métodos Microbiológicos Rápidos, especialmente, nas indústrias alimentícias e clínicas médicas, as quais vêm apresentando consideráveis avanços com novas tecnologias.

Segundo Brito *et al.* (2021), nas análises microbiológicas, existem os métodos de referência oficiais (padrão ouro) para detecção dos micro-organismos, bem como de seus metabólitos, para os diferentes tipos de amostras. Além disso, são em sua maioria de longa duração, envolvendo inúmeras etapas que, por vezes, demandam recurso humano qualificado e infraestrutura laboratorial.

Com o advento de novas técnicas científicas surgem cada vez mais procedimentos metodológicos que vêm possibilitando a detecção de analitos mais rápidos, práticos e de baixocusto, com igual ou superior sensibilidade nos resultados (Kumar *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021).

Normalmente, o desenvolvimento e os avanços de novas técnicas de detecção decorrem no também desenvolvimento de novos produtos comerciais como kits ou outros dispositivos, que ocasionalmente são submetidos a estudos de validação por órgãos regulamentadores do País (Brito *et al.*, 2020; Lemos *et al.*, 2020; Brito *et al.*, 2021).

Das novidades tecnológicas concebidas para a realização, em placas prontas, de ensaios técnico-científicos que visam a detecção e quantificação microbiológica em matérias-primas, alimentos e ambiente, como uma opção às práticas convencionais, destacam-se as placas Compact Dry do laboratório Cap-Lab. Nestas, a análise corresponde a um método rápido e simples, constituído por kits de material descartável (Brandão, 2015). Ademais, o meio de cultura presente nas placas, é constituído por enzimas inibidoras cromogênicas que promovam identificação dos micro-organismos em cores específicas; apresenta alta sensibilidade e proporciona uma eficiência maior quando comparada aos métodos convencionais (Cesarotti; Paula; Rossi, 2007). Diante do exposto, esta pesquisa objetivou realizar o estudo e descrição de ensaios microbiológicos utilizando o kit Compact Dry em amostras de água do córrego do Igarapé da Penal de Porto Velho – RO.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se, inicialmente, de um estudo de caráter descritivo baseado nas orientações de Bastos e Keller (1995) no que diz respeito à “pesquisa científica que é uma investigação metódica [...]” e de

Lakatos e Marconi (2003) e Gil (2002) para a pesquisa bibliográfica. Assim, os levantamentos foram elaborados em plataformas livres de pesquisas científicas disponíveis na Rede Global de Computadores Interligadas – Internet como *google* acadêmico, *Scielo*, Ministério da Saúde- MS; Revistas científicas como *Biosensors & Bioelectronics*; Plataforma Livres de Universidade e Institutos de Pesquisas, bem como a do Laboratório de Tecnologia e Inovação: Cap-Lab, disponível em: <<https://cap-lab.com.br/produto/compact-dry/>>, entre outros consultados entre os anos de 2023 a 2024.

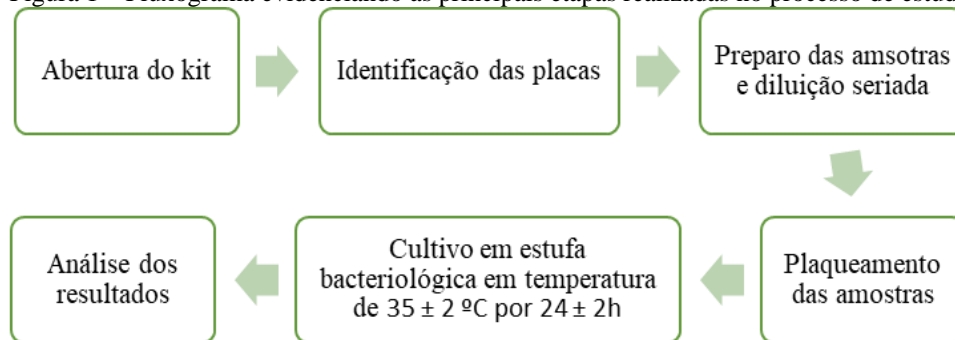
Na segunda etapa, as amostras foram conduzidas ao laboratório de microbiologia e biotecnologia – MicroBiotec do Instituto Federal de Rondônia, *campus* Porto Velho Calama, no ano de 2024, onde foram realizados ensaios microbiológicos com amostras oriundas de água do Igarapé da Penal de Porto Velho e de água deionizada produzida no laboratório do *campus*, de acordo com as normas técnicas e com uso do Kit cromogênico Compact Dry, lote:R057876121. O qual apresenta, além do substrato nutritivo, as seguintes substâncias enzimáticas: Magenta-Gal e X-Gluc, específicas para identificação de *E. coli* e coliformes, de acordo com as orientações do fabricante.

Quanto à descrição dos ensaios microbiológicos, observado na descrição e fluxograma, a seguir, realizados com amostras para análise de água, os mesmos seguiram, com adaptações, as orientações e protocolos técnicos do fabricante. Assim, nos ensaios, utilizou-se os seguintes materiais e equipamentos: garrafa de vidro transparente; caixa de isopor para o transporte da amostra; estufa bacteriológica; pipetas/ ponteiros estéreis; bico de Bunsen; Kit Compact Dry EC.

Os procedimentos técnicos realizados, já especificados e orientados pelo laboratório fabricante, foram desenvolvidos no laboratório MicroBiotec, com adaptações, seguindo as seguintes etapas:

- a- O kit foi aberto o pacote laminado contendo as placas para separá-las (Figura 2 a);
- b- Foi realizada a identificação das placas (Figura 2 c);
- c- Realizou-se a diluição da amostra conforme procedimentos técnicos do laboratório para diluição seriada;
- d- Retirou-se a tampa e foi inoculado 1mL da amostra na placa contendo o meio desidratado (Figura 2 b);
- e- Adicionou a placa do kit e incubou em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h conforme procedimento técnico específico;
- f- Após o período de incubação, supracitado, retirou-se a placa e analisou-se observando os aspectos cromogênicos das colônias.

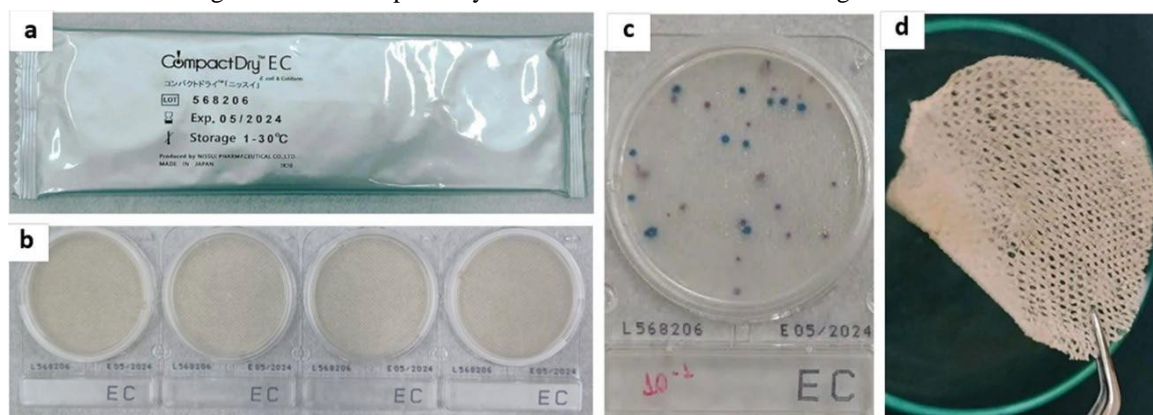
Figura 1 – Fluxograma evidenciando as principais etapas realizadas no processo de estudo



3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os estudos resultaram na caracterização do kit Compact Dry em ensaios microbiológicos amostrais. O kit comercial apresenta-se em embalagens caracterizada em sachê de polímeros sintéticos, lacradas, com tons cinza prateada, constituídas de 4 placas poliméricas rígidas com reservatórios internos de 50 mm e espaço fosco para anotações. Neste reservatório, há o meio nutritivo com dois tipos de substratos cromogênicos enzimáticos embebidos em lençóis secos, Magenta-GAL e X-Gluc (Figuras 2b, c e d).

Figura 2 - Kit Compact Dry utilizado nos ensaios microbiológicos em 2024



Fonte: Banco de imagens dos autores.

As imagens evidenciam as características do Kit Compact Dry. Em (a) sachê, em (b) placas poliméricas, em (c) placa evidenciando as atividades do substrato cromogênico e, em (d) lençóis desidratado constituinte do meio.

Considerando a relevância dos kits utilizados na identificação microbiológica, Ferreira(2017) cita que nas indústrias, em especial a farmacêutica, utilizam-se majoritariamente: um método manual que recorre a galerias API (índice analítico de perfil) e um método automatizado que utiliza o sistema Vitek. Além disso, recorre-se a estes métodos devido à fácil e rápida execução da técnica, e também porque são facilmente adaptados à rotina de um laboratório de análises microbiológicas de produtos.

Sendo assim, as observações evidenciaram um kit compacto com as seguintes dimensões: 77 mm de altura e 58 mm de largura. Possui, em sua estrutura, aparatos para os fins operacionais propostos

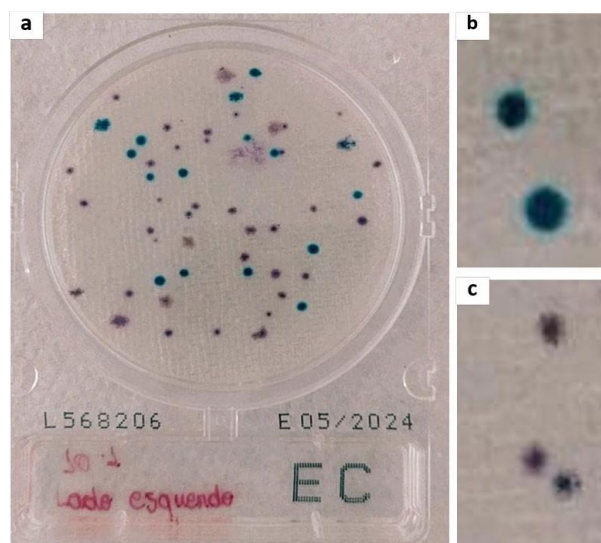
pelo laboratório fabricante. Dentre elas, ressalta-se, além da identificação do lote, validade do kit e do analito, a presença de um reservatório com bordas sutilmente elevadas, tampa para o meio de cultura e um espaço para anotações (Figura 2c).

Um dos aspectos relevantes dos kits está, além da economia e operacionalidade, na identificação microbiana. Dados mostram que, nestes conjuntos de substratos, é possível classificar uma cepa isolada de acordo com sua família, gênero e espécie, bem como realizar investigações mais completas, determinando a sua origem, a natureza de eventos específicos de descontaminação e conhecer a biocarga presente naquele processo para tomada de medidas necessárias de acordo com o cumprimento dos requisitos regulatórios e legais (Easter, 2005; Brito, 2019; Challener, 2019).

No que se refere aos aspectos morfológicos e cromogênicos observados nas colônias nos testes realizados, tanto para coliformes totais quanto para *E. coli*, as mesmas apresentaram sua maioria formas arredondadas com dimensões aproximadas de 0,41 mm a 1,48 mm de diâmetro e cores que variaram em tons predominantemente vermelhos, magenta e azuis (Figura 3a). As colônias identificadas como *E. coli* são caracterizadas pela coloração azul para púrpura (Figura 3b) e as de coliformes totais com cor avermelhada e/ou magenta (Figura 3c).

As colônias de coliformes totais e *E. coli* normalmente são observadas em função da associação dos processos metabólicos mediadas pelo substrato cromogênico enzimáticos, substâncias orgânicas caracterizadas como quimiorganotróficos, podem expressar-se em cores diferentes, em condições de cultivo adequado, dependendo da espécie, como citado por Bouzon, Gargioni e Ouriques (2010) e indicado nas referências para outros testes (BRASIL, 2013).

Figura 3 - Placa apresentando colônias de *E. coli* e coliformes totais com cores e características observadas nos ensaios com amostras de água bruta



Fonte: Banco de imagens dos autores.

Nas figuras 3a, b e c, na placa do kit, acima, são observados o crescimento de colônias de *E. coli* e coliformes totais obtidas com diluição seriada a 10^{-1} . Dados da literatura indicam que os

resultados com testes convencionais podem ser ligeiramente diferentes daqueles obtidos com sistemas de testes bioquímicos rápidos devido ao uso de outros indicadores mais sensíveis, como os já descritos nos trabalhos de Över, Tüç e Söyletir (2000).

No entanto, nos kits recentes, como o utilizado neste estudo e disponibilizado pelo laboratório Cap-Lab (2024), citam que o método permite uma perfeita absorção das amostras inoculadas, o qual possibilita identificar e quantificar a maioria das bactérias de interesse para a indústria alimentícia. Adicionalmente, no substrato há dois tipos de compostos cromogênicos enzimáticos, Magenta-GAL e X-Gluc, que atuam permitindo a expressão de aglomerados de bactérias com cores em tons avermelhado (Magenta-GAL) e azulado (X-Gluc). Sendo assim, além das colorações já descritas, no processo de contagem das unidades formadoras de colônia

- UFC, o autor (*op. cit.*), descreve que o número total de aglomerados de coliformes é a somatória do total de colônias vermelhas e azuis combinadas, como observado nos ensaios realizados nas análises de água desse estudo.

Quanto ao Magenta-Gal (C₁₄H₁₅BrClNO₆), caracteriza-se por ser um composto usado como alternativa ao X-Gal. Normalmente, no processo metabólico, é hidrolisado pela β -galactosidase para produzir um precipitado vermelho que é insolúvel em álcool e xilenos, tornando-o adequado para ensaios de imunotransferência e imunocitoquímicos. Desta maneira, colônias bacterianas, como as de coliformes totais, contendo β -galactosidase ativa produzem tons vermelhos quando cultivadas em placas contendo Magenta-Gal, como descrito por GoldBio (2024) e observado nos resultados dos ensaios realizados (Figuras 3a e c).

Para o substrato cromogênico X-Gluc (X-Glucuronide CHA Salt), este é utilizado em diversas aplicações para a detecção da enzima β -glucuronidase, identificando o gene GUS (β -glucuronidase), um indicador preciso da presença de *E. coli* em amostras de água potável, seu nome completo é sal de ciclohexilamônio do ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico (C₂₀H₂₆BrClN₂O₇). É um composto aceito internacionalmente na identificação de *E. coli* e reportado como um bom redutor de falsos positivos e negativos encontrados com outros métodos. Além disso, o substrato detecta a β -glucuronidase e que, pelas características bioquímicas do substrato e das células, após a redução, o X-Gluc, produz uma cor localizada tornando-o útil na identificação da presença do gene GUS, como já caracterizado pelo X-GlucDirect (2024) e observado a sua expressão fenotípica no presente estudo.

Os estudos e os ensaios amostrais operacionais realizados possibilitaram a descrição técnica dos procedimentos com kit Compact Dry. O mesmo foi estruturado, a partir das orientações e especificações técnicas do fabricante, com propriedades já especificadas nos trabalhos de Ferreira Júnior (2002), Cesarotti, Paula e Rossi (2007) e com resultados característicos aos presentes em outros estudos como o de Hosakawa e Kodaka (2010) e Cardoso *et al.* (2019).

O substrato cromogênico notadamente trata-se de uma opção de método para a realização dos exames bacteriológicos da água e recai sobre um dos procedimentos que melhor se adequa às condições do laboratório (Brasil, 2013). Deve-se, no entanto, adotar como padrões metodologias, frequências e interpretação de resultados estabelecidas e recomendadas pela legislação em vigor.

Dessa maneira, o kit apresentou-se como um recurso promissor nas avaliações amostrais de efluentes, com a identificação de coliformes totais e enterobactérias, em especial a *Escherichia coli*.

4 CONCLUSÃO

Este estudo e descrição de ensaios microbiológicos utilizando o kit Compact Dry EC estruturou dados com características dimensionais operacionais, bem como demonstrou que o passa-a-passo para a realização dos testes é eficiente.

No kit, o substrato cromogênico presente no meio de cultura possibilitou de maneira eficiente a identificação e contagem de *E. coli* e do mesmo modo de coliformes totais, compatíveis com os dados presentes na literatura.

Nos ensaios, não houve a necessidade do uso de equipamento complementares ou auxiliares para testes secundários ou complementares. Além disso, o tempo de cultivo indicado pelo fabricante (24 ± 2 h), foi o suficiente para as análises.

Desta forma, conclui-se que os ensaios com o Kit Compact Dry EC utilizam uma tecnologia recentemente desenvolvida com uso de substratos cromogênicos embebidos em lençóis secos, sendo uma alternativa para análises microbiológicas de rotina em água.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal Rondônia – IFRO, ao DEPESP, DAPE e DEPEX do *Campus* Porto Velho Calama e à todos os membros do Laboratório de Microbiologia e Biotecnologia – MicroBioTec, pelo apoio e colaboração.

REFERÊNCIAS

- BORIN, I. C.; MARTINS, V.; TAKETANI, N. F. Implementação de Métodos Rápidos Microbiológicos na Indústria Farmacêutica. *Revista Ensaios Pioneiros*, v. 5, n. 2, p. 20-34, 2021.
- BOUZON, Z. L., GARGIONI, R., OURIQUES, L. *Biologia celular*, 2 ed., Florianópolis: BIOLOGIA/EAD/UFSC, 2010. 238 p.
- BRANDÃO, M. A. R. Avaliação da qualidade microbiológica da ostra *Crassostrea rhizophorae* provenientes do Litoral Sul da Bahia. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. – Ilhéus, BA: UESC, 2015.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde – 4. ed. – Brasília: Funasa, 2013. 150 p.
- BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde – 4. ed. – Brasília: Funasa, 2013. 150 p.
- BRITO, F. A. E., BEZERRA, C. R., FURTADO, R. F., MELO, A. M. A., MACHADO, T. F., OLIVEIRA, M. A., & FIGUEIREDO, E. A. O. Pre-collaborative validation of an amperometric immunosensor for *Salmonella*. *Proceedings*, 4, 2020. Doi.: <http://dx.doi.org/10.3390/IECB2020-07031>
- BRITO, F. A. E., BEZERRA, L. C. R., MELO, A. M. A., FURTADO, R. F., BORGES, M. F., & FIGUEIREDO, E. A. T. Validation of alternative microbiological methods: an overview. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24, e2020023, 2021. Doi.: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02320>
- BRITO, F. A. E.; BEZERRA, L. C. R.; MELO, A. M. A.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Validação de métodos microbiológicos alternativos: uma visão geral. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 24, p. e2020023, 2021.
- BRITO, N. M. R. Identificação rápida de contaminantes microbianos em produtos farmacêuticos. 2019. Tese (Mestrado) - Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo – SP, 2019.
- CAP-LAB - Tecnologia e Inovação para Laboratórios: Compact Dry - Placas prontas para análises microbiológicas. 2024. Disponível em: <https://cap-lab.com.br/produto/compact-dry-coliformes-e-e-coli-ec/>. Acesso em: 11/06/2024.
- CARDOSO, C. V., BARBOSA, E. V., RIBEIRO, A. G. P., SOUZA, R. M., MAGALHÃES, H., CASTRO, H. C., LIBERAL, M. H. T. Caracterização Fenotípica de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Isoladas em Meios Cromogênicos Oriundos de Leite de Vacas com Mastite Subclínica. In: SILVA Neto, B. R. (org). *Inventário de Recursos Genéticos*: Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.
- CARNEIRO, M. S. Ferramentas alternativas para identificação microbiana, determinação de suscetibilidade e detecção de mecanismos de resistência. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRS, Porto Alegre, BR – RS, 2022.
- CESAROTTI, S. N., PAULA, A. T., ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 3, 2007.



CESAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; ROSSI, D. A. Correlação entre métodos cromogênicos eo método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 66, n. 3, 2007.

CHALLENGER, C. A. Estratégias de identificação microbiana para controle de biocarga. Pharmaceutical Technology Edição Brasileira, v.23, n. 2, pp.24-26, 2019.

EASTER, M. C. Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. Interpharm/CRC, 1 ed., pp. 28-39, 2005.

FERREIRA JÚNIOR, L. G. Monitoramento e avaliação da contaminação de água potável através do método do substrato definido-cromogênico a nível municipal do SUS. [Rio de Janeiro], 2002 v, 117p. (FIOCRUZ/ENSP, M.Sc., Engenharia Sanitária e Saúde Pública, 2002). Dissertação - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. 1.FIOCRUZ/ENSPII.

FERREIRA, J. A. Detecção e identificação rápidas dos principais contaminantes microbiológicos em fármacos por espectroscopia de infravermelho, 2017, 75f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Farmacêutica) - Faculdade de Farmácia Universidade de Lisboa, Lisboa - PT, 2017.

GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. São Paulo, SP: Atlas, 2002.
Goldbio: Ouro Biotecnologia®. Magenta-Gal < <https://goldbio.com/product/556/magenta-gal> >; Acesso em: 05/06/2024.

HOSAKAWA, S., KODAKA, H. Efficacy of Compact Dry EC for Coliform Detection in Seafood. Jpn. J. Food Microbial; v.27, n.2: p.80-85, 2010.

JIANG, H., SUN, Z., GUO, Q., & WENG, X. Microfluidic thread- based electrochemical aptasensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. Biosensors & Bioelectronics, 182,113191, 2021. PMid:33780852. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2021.113191>

KUMAR, N., WANG, W., ORTIZ-MARQUEZ, J. C., CATALANO, M., GRAY, M., BIGLARI, N., HIKARI, K., LING, X., GAO, J., VAN OPIJNEN, T., & BURCH, K. S. Dielectrophoresis assisted rapid, selective and single cell detection of antibiotic resistant bacteria with GFETs. Biosensors & Bioelectronics, 156, 112123, 2020. PMid:32174552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112123>

LAKATOS, E. M.; MARCONI, M. A. Fundamentos de Metodologia Científica. São Paulo,SP: Atlas 2003.

ÖVER U, TÜÇ Y, SÖYLETİR G. Catalase-negative *Staphylococcus aureus*: a rare isolate of human infection. Eur Soc Clin Infect Dis. v. 6, p. 681–2, 2000.

X-Gluc Direct, X-Gluc DIRECT - X-Glucuronide CHA EU (X-Gluc). 2024. Disponível em: < <https://www.x-gluc.com/xgluc/> > Acesso em: 05/06/2024.

YANG, E., LI, D., YIN, P., XIE, Q., LI, Y., QINGYU, L., & DUAN, Y. A novel surface-enhanced Raman scattering (SERS) strategy for ultrasensitive detection of bacteria based on three-dimensional (3D) DNA walker. Biosensors & Bioelectronics, 172, 112758, 2021.PMid:33157406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112758>