

Capítulo 3

Bacteriologia

Joseli Maria da Rocha Nogueira

Lucieny de Faria Souza Miguel

1. Introdução

A Microbiologia (do grego: *mikros*, “pequeno”; *bios*, “vida” e *logos*, “ciência”) é o estudo dos organismos microscópicos e de suas atividades. Quando partimos para esta disciplina, devemos considerar que variados microrganismos podem provocar infecções, e que inúmeras também são as formas de diagnóstico e identificação dos agentes etiológicos destas enfermidades. Para identificá-los, devemos analisar sua morfologia, estrutura, reprodução, fisiologia e metabolismo. Dentro desta cadeira são avaliados também os conceitos de distribuição natural, suas relações simbióticas e as alterações físicas e químicas que provocam no meio ambiente.

Neste caso, os microrganismos seguem as características comuns a todos os sistemas considerados biológicos: habilidade de se reproduzir, capacidade de ingerir ou assimilar substâncias (metabolizando-as para suas necessidades energéticas e de crescimento), habilidade de excreção de metabólitos, capacidade de reagir a alterações ambientais (irritabilidade) e suscetibilidade a mutações.

A Microbiologia pode também auxiliar na demonstração dos princípios da Biologia, facilitando o estudo de sistemas específicos para a investigação das reações fisiológicas, genéticas e bioquímicas, que são a base da vida. Os microrganismos são instrumentos ideais para a pesquisa dos fenômenos biológicos, pois, além de crescerem e se reproduzirem rapidamente, com metabolismo semelhante a de outros organismos mais complexos, em tubos de ensaio ou frascos, exigem menos espaço e cuidados de manutenção.

Os principais organismos estudados em Microbiologia são as bactérias, os fungos, as algas e os protozoários. Os vírus, apesar de não serem considerados vivos, têm algumas características de células vivas e por isso são estudados como microrganismos.

Quando pensamos em desenvolver um capítulo básico de Bacteriologia geral, clínica e laboratorial, levamos em conta inicialmente os conceitos básicos, aliados à importância destes microrganismos como participantes da microbiota e como causadores de doenças. Na parte do diagnóstico bacteriano, a necessidade de comentar as metodologias simples e complexas, que permitem a obtenção de resultados corretos (já que, na maioria das vezes, o paciente depende do resultado de um exame para o início do tratamento), levou-nos não só a tratar os agravos em função do microrganismo, mas a pesquisar, de acordo com a região anatômica em que ele pode ocorrer.

2. Histórico da Bacteriologia

Uma das primeiras hipóteses, associadas à Bacteriologia, de que se tem notícia foi postulada no século XIII, por Roger Bacon, que sugeriu que as doenças eram produzidas por seres vivos invisíveis. A ideia foi novamente recomendada por Girolamo Fracastoro de Verona (1483-1553), mas a primeira observação descrita e documentada dos organismos bacterianos foi realizada pelo naturalista holandês Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723), com a ajuda de um microscópio simples de sua própria construção. Ele infor-

mou sua descoberta à Sociedade Real de Londres, em 1683, mas a Bacteriologia, como ciência, não se estabeleceu até meados do século XIX.

Apesar das tentativas iniciais de associar as bactérias às doenças, como nos antigos trabalhos do pesquisador Marcus Anton Von Plenciz (1705-1786), que procurou estabelecer a natureza do “*contagium*” e do “*miasma*” (o primeiro, derivando do organismo doente, enquanto o segundo, que era gerado fora do corpo, se espalhava pelo ar), por vários anos se acreditou que bactérias eram produzidas através de geração espontânea.

Foram requeridos os esforços de vários químicos e biólogos para provar que as bactérias, como todos os organismos vivos, só surgiam de outros organismos semelhantes. Este fato fundamental foi finalmente estabelecido em 1860, pelo cientista francês Louis Pasteur (1822-1895). Com seus trabalhos associados aos de Robert Koch (1843-1910), outro brilhante estudioso, praticamente inicia-se a era da Bacteriologia.

Em 1840, depois dos primeiros trabalhos de Pasteur, Friedrich Gustav Jacob Henle (1809-1885), em uma notável publicação, expôs as suas ideias, estabelecendo condições básicas para que um agente microscópico particular pudesse ser considerado causador de uma doença infecciosa ou infectocontagiosa. Estas condições correspondem aos “Postulados de Henle”:

- “O agente causador da infecção deve ser encontrado com constância no corpo do doente.”
- “Deve ser possível isolá-lo e, com tal agente isolado, reproduzir experimentalmente a doença.”

Os dois postulados citados seriam aperfeiçoados e mais tarde impostos aos bacteriologistas pelos trabalhos de Robert Koch (primeiro a isolar o *M. tuberculosis*):

- “Um microrganismo específico pode sempre ser encontrado em associação com uma dada doença.”

- “O organismo pode ser isolado e cultivado, em cultura pura, no laboratório.”
- “A cultura pura produzirá a doença quando inoculada em animal sensível.”
- “É possível recuperar o microrganismo, em cultura pura, dos animais experimentalmente infectados.”

Seguindo as ideias de Pasteur, que ao destruir a teoria da “geração espontânea”, John Needham 1745, afirmou estar o ar cheio de micróbios, e levando em conta que as fermentações e as putrefações são também obras de microrganismos, o médico Oliver W. Holmes (1809-1894) insistia que a febre puerperal era contagiosa e, provavelmente, ocasionada por um agente transmitido de uma mãe para outra, por intermédio dos médicos e das parteiras. Quase na mesma época, o médico húngaro Ignaz P. Semmelweis (1818-1865) introduziu o uso de antissépticos na prática obstétrica. Com base nestes estudos, o Dr. Joseph Lister (1827-1912) concluiu em 1867 que deveria ser possível evitar as infecções pós-operatórias, desinfetando previamente os instrumentos cirúrgicos, o campo operatório e as mãos do cirurgião.

O período de 1880-1900 representa a época áurea da Bacteriologia, com a descoberta de várias bactérias patogênicas. Durante um congresso internacional, ocorrido em Londres em 1881, Louis Pasteur teve a oportunidade de tomar conhecimento da introdução, por Robert Koch, dos meios sólidos (gelatina, ágar, etc.) na Bacteriologia (até então Pasteur só usava meios líquidos, o que praticamente impossibilitava o isolamento bacteriano). Koch também desenvolveu técnicas de fixação e coloração, muitas das quais utilizamos até os dias de hoje.

Nos últimos anos, com o advento da Biologia Molecular, a Microbiologia evoluiu extraordinariamente e está se mostrando, cada vez mais, uma ciência multidisciplinar. Hoje, associamos velhos conhecimentos com os novos, facilitando os diagnósticos e os tratamentos.

Com certeza, em poucos anos, teremos maiores avanços nesta área, que não para de crescer, e contamos com vocês, estudantes, para, no futuro desenvolverem novas técnicas e fazerem novas descobertas, auxiliando, assim, a evolução desta ciência.

3. Morfologia e citologia bacteriana

Para iniciarmos nossos trabalhos em Bacteriologia é importante reforçar que o tamanho das bactérias é da ordem de milésimos de milímetro, ou seja, micrômetros (μm), podendo, no entanto, serem observadas em microscopia óptica (ver capítulo 3 - item sobre Microscopia), o que não ocorre com os vírus, que, possuidores de dimensões inferiores a $0,2 \mu\text{m}$ (limite de visibilidade do microscópio ótico), não podem ser observados neste instrumento.

A maioria das bactérias estudadas nos laboratórios de Microbiologia mede de $0,5$ a $1,0 \mu\text{m}$ de diâmetro por $2,0$ a $5,0 \mu\text{m}$ de comprimento.

3.1. Morfologia

Outro dado relevante é que as bactérias podem se apresentar em três tipos morfológicos fundamentais:

3.1.1. Bastonetes ou bacilos

Bastonetes longos ou curtos com extremidade reta ou de ponta arredondada, ou ainda curvos, em forma de vírgula.

3.1.2. Espirilos

Forma de hélice, sacarroalha, ou espiralar.

3.1.3. Cocos

Podem ser esféricos, elípticos, em forma de ponta de lança, riniformes, etc.

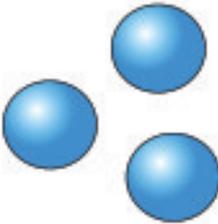
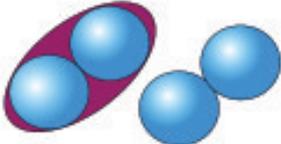
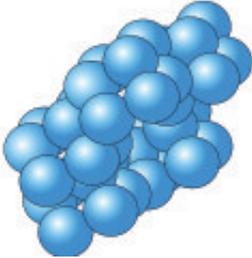
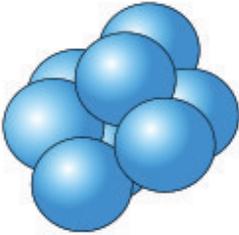
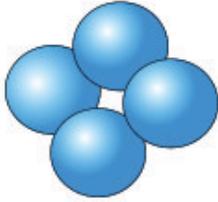
Os cocos podem formar diferentes arranjos, de acordo com a sua divisão celular (em plano único, ou em mais planos):

- Diplococos – Cocos agrupados 2 a 2 (divisão em um único plano).
- Estreptococos – Vários cocos dispostos em cadeia, similar a um cordão de pérolas. (divisão em um único plano).
- Tétrades – Grupos de 4 cocos unidos (divisão em 2 planos).
- Sarcinas – Grupos de 8 cocos unidos, de forma semelhante a um cubo (divisão em 3 planos).
- Estafilococos – Cocos agrupados de forma aleatória, semelhante ao formato de um cacho de uvas (divisão em muitos planos).

Os bastonetes (ou bacilos) não se dispõem em tantos arranjos como os cocos, sendo que, na sua grande maioria, se apresentam de forma isolada. Porém, ocasionalmente podem ocorrer aos pares (diplobacilos) ou em cadeias (estreptobacilos). Dependendo do gênero, fase de crescimento ou da composição do meio de cultura, estas bactérias podem também apresentar arranjos diferenciados, como crescimento em paliçada ou letras chinesas (*Corynebacterium*/Difteria).

Quando os bastonetes são muito curtos, podemos encontrar alguns autores denominando-os cocobacilos.

Os espirilos ocorrem, predominantemente, como células isoladas. Exibem, porém, nítidas diferenças em relação ao comprimento, largura, número e amplitude dos espirais.

	
Bacilos ou Bastonetes	Cocos
	
Espirilo	Diplococos
	
Estafilococos	Estreptococos
	
Sarcina	Tétrade

3.2. Citologia

Quanto à parte de Citologia bacteriana, não pretendemos nos estender neste assunto, porém gostaríamos de comentar que as bactérias são seres procarióticos, ou seja, desprovidos de membrana nuclear (também chamada de carioteca). Elas não possuem todas as estruturas internas das células eucarióticas, sendo mais simples em todos os níveis, menos no seu envoltório celular. Para se ter uma ideia, citaremos os principais elementos estruturais das bactérias:

3.2.1. Parede celular

Responsável pela forma, rigidez bacteriana, divisão celular e muitas vezes manutenção osmótica, com uma espessura de aproximadamente 10 a 20 nm é formada, entre outras substâncias, por um complexo macromolecular, conhecido como mucocomplexo (também chamado de peptidoglicano, mureína, mucopeptídeo ou glicopeptídeo), de importância prática na taxonomia bacteriana. Nas bactérias chamadas Gram-negativas (Figura 1), este complexo representa uma fração menor do total da parede em relação às Gram-positivas (Figura 2). A parede celular nas bactérias Gram-negativas é quimicamente mais complexa, possuindo maior quantidade de aminoácidos e de lipídeos. Sua fração de LPS (lipopolissacarídeo) externa determina sua toxigenicidade e antigenicidade. As bactérias Gram positivas possuem como porção característica os ácidos teicoicos.

Algumas bactérias com paredes estruturalmente Gram-positivas possuem uma modificação importante que pode ser utilizada na taxonomia; nestas bactérias, os lipídios estão em maior quantidade e fortemente ligados (cerca de 60% do peso seco da parede), além disso, elas possuem também em sua composição ácidos micólicos. O gênero *Mycobacterium* é o exemplo mais importante de microrganismo onde ocorre esta modificação, devido ao caráter hidrofóbico de sua parede, sua coloração pelo método de Gram é dificultada, mas ele poderá ser diferenciado pela capacidade de álcool-ácido resistência (Ver item 5.2 deste capítulo).

Figura 1. Estrutura básica da parede celular Gram-negativa

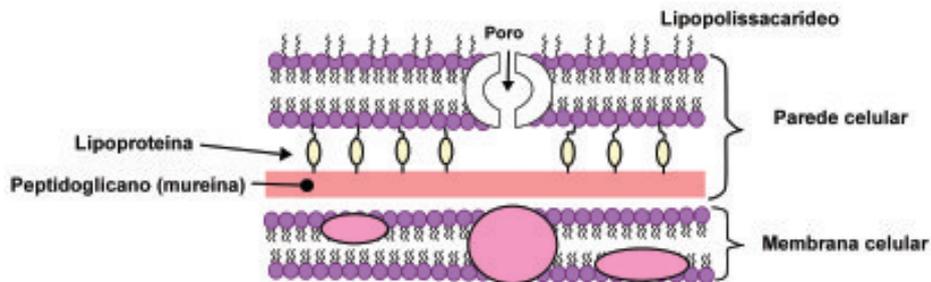
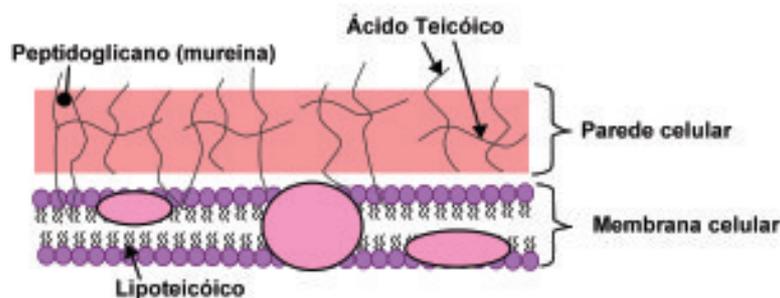


Figura 2. Estrutura básica da parede celular Gram-positiva



Existe um grupo de bactérias chamado **micoplasmas**, que não possui parede celular nem peptidoglicano, apesar de estudos moleculares os colocarem próximos das bactérias Gram negativas, estes são incapazes de serem corados pelo método clássico de Gram, já que não possuem parede. Alguns deles possuem esteróis em suas membranas, diferenciando-os mais ainda dos outros procaríotos. Outro fato interessante é que eles acabam se tornando resistentes aos antibióticos, que têm a parede bacteriana comum como alvo (ver item 10 deste capítulo).

A parede celular das arqueobactérias (ver item 4 deste capítulo) também não acompanha o mesmo esquema das bactérias comuns, podendo apresentar uma parede rígida (pseudomureína) ou uma simples camada S (geralmente glicoproteínas).

3.2.2. Membrana celular ou membrana citoplasmática bacteriana

Também chamada de membrana plasmática – constituída de fosfolipídios e proteínas, sua estrutura é semelhante a dos organismos não procarióticos, todavia, com exceção dos grupo bacteriano dos micoplasmas, não possuem esteróis. Trata-se de uma membrana semipermeável, seletiva, sede de várias enzimas, que limita o citoplasma. Importante, não só para o transporte de íons e metabólitos (ex.: enzimas permeases e porinas), ela também atua em numerosos processos biossintéticos.

A membrana celular das arqueobactérias pode conter lipídios únicos e longos, sem grupamento fosfato. O que, segundo alguns autores, pode contribuir para suas atividades em ambientes incomuns (alta concentração de sal, baixo pH ou altas temperaturas).

3.2.3. Citoplasma

A célula bacteriana apresenta no seu citoplasma diferentes regiões, que podem ser divididas didaticamente. Uma área chamada citoplasmática, de aparência granular e rica em RNA, uma área chamada de cromatínica ou nuclear, rica em DNA, e uma porção fluída, com nutrientes dissolvidos.

Na área chamada citoplasmática, temos, juntamente com o RNA, partículas proteicas, formando corpúsculos com cerca de 20 nm de diâmetro, chamados ribossomas. Estes possuem enzimas que atuam na biossíntese da célula (são responsáveis pela síntese proteica, possuindo em sua composição, aproximadamente, 60% de RNA e 40% de proteínas).

Como já dissemos, as bactérias não possuem membrana nuclear e nem aparato mitótico. Na área cromatínica, temos o chamado nucléolo ou nucleóide, composto por um cromossomo de DNA de dupla hélice, em sua grande maioria na forma de uma molécula única circular (algumas bactérias, como o *Vibrio cholerae*, podem possuir mais de um cromossomo; e outras, como a *Borrelia burgdorferi*, possuem um cromossomo linear). O cromossomo é possível

de ser caracterizado em cultura de células jovens tratadas com HCl, a fim de destruir o RNA citoplasmático, seguido de coloração, pelo método de Giemsa (Apêndice 1).

3.2.4. Outras estruturas

Alguns elementos podem estar presentes, ou não, em determinados gêneros bacterianos. Podendo, muitas vezes, além de sua função para a própria célula, nos auxiliar na taxonomia:

- Grânulos ou inclusões citoplasmáticas – Podem ser visualizados através de colorações especiais, pois geralmente são refringentes. Sua natureza varia de acordo com o organismo, porém sua função é sempre de armazenamento. Encontrando-se reservas de glicogênio, amido, fosfatos, enxofre, etc.

Alguns destes grânulos podem auxiliar na identificação presuntiva da presença de determinadas bactérias, como no caso de *Corynebacterium*, que acumulam polifosfatos. Esses grânulos são às vezes denominados grânulos de volutina ou metacromáticos, uma vez que, com corantes azuis, se diferenciam, corando-se em vermelho. Uma alternativa para realizar essa distinção é através do método de Albert Laybourn (Ver item 5.3.1 deste capítulo).

- Plasmídeo - Estrutura de DNA circular extracromossomial, de duplicação independente (*replicon*), localizada no citoplasma da célula (menor que o cromossoma), que não é responsável por características essenciais da bactéria. Geralmente se apresentam com várias cópias, não possuindo homologia com o cromossomo, mas capacidade de conferir várias vantagens seletivas (ex.: resistência a antibióticos), podendo, inclusive, ser transferidos para outras bactérias. Essas estruturas têm sido largamente utilizadas, na atualidade, na engenharia genética.
- Glicocálice – Camada externa viscosa que cerca a parede celular e pode ocorrer em muitas bactérias. Sua natureza química, na maior parte polissacarídica, é variada, e depende da espécie bacteriana. Os termos

cápsula e **camada limosa** ou *slime* são usados, frequentemente, e alguns autores os diferenciam baseando-se na organização mais ou menos definida de sua estrutura. Além de fornecer um envoltório protetor, possui seu papel ligado à virulência e à imunogenicidade, já que pode atuar na defesa da bactéria contra a fagocitose, bacteriófagos e, principalmente, auxiliar na aderência bacteriana a algumas superfícies. Um bom exemplo é o *Streptococcus mutans*, que forma a placa bacteriana dentária.

- **Flagelos** – São estruturas de locomoção formadas por apêndices muito finos, compostos de flagelina (proteína), e se encontram presentes em algumas bactérias. O flagelo apresenta três componentes: uma estrutura basal, uma similar a um gancho e um longo filamento externo à parede celular. O seu comprimento geralmente é várias vezes o da célula, contudo, seu diâmetro é uma pequena fração do diâmetro celular (10 a 20 nm). Podem ser únicos ou múltiplos, polares ou peritríquios (em todo corpo bacteriano), auxiliando, desta forma, em estudos taxonômicos. Apesar destas estruturas estarem categoricamente ligadas à locomoção bacteriana, algumas bactérias podem se movimentar por outros meios, como, por exemplo, o deslizamento provocado pelo fluxo protoplasmático.
- **Pili ou fímbria** - São apêndices filamentosos compostos de pilina (proteína) encontrados em algumas bactérias Gram-negativas, mais finos, mais curtos e geralmente mais numerosos que os flagelos. De acordo com sua estrutura, podem desempenhar duas funções de grande importância: a aderência a superfícies (através das adesinas localizadas em suas extremidades) e como pili sexuais, permitindo a fixação de células doadoras e receptoras, servindo como porta de entrada para material genético na conjugação bacteriana.
- **Esporos (endosporos)** – Essas estruturas são produtos de uma resposta ao meio ambiente e podem ser formadas em alguns gêneros bacterianos

(ex.: *Bacillus* e *Clostridium*), são refringentes aos corantes e altamente resistentes a agentes físicos e químicos. Formam-se quando o meio se torna inadequado para a sobrevivência da bactéria em sua forma vegetativa (ex.: escassez de água ou nutrientes). Cada célula forma um único esporo, que é liberado quando a bactéria morre. Sua composição se caracteriza por alto teor de cálcio associado ao ácido dipicolínico, relacionado à desidratação e à alta resistência, inclusive térmica. Essas estruturas permitem a manutenção de microrganismos em forma esporulada (latente ou em repouso), por longos anos, no ambiente, sendo consideradas notáveis estratégias de sobrevivência, já que podem reverter à forma vegetativa quando o local se torna viável novamente para sua sobrevivência.

4. Taxonomia bacteriana

Taxonomia (do grego *tassein* = para classificar e *nomos* = lei, ciência, administrar) é considerada a ciência da classificação. A classificação necessita da criação de um sistema que facilite identificar os seres. O primeiro sistema de classificação foi o de Aristóteles, no século IV a.C., que ordenou os animais pelo tipo de reprodução e por terem ou não sangue vermelho. Vários sistemas foram posteriormente criados a partir destas ideias.

Inicialmente, os seres vivos eram divididos em dois reinos: Plantas e Animais. Como muitos seres simples não cabiam nesta divisão, Ernst Heinrich Haeckel propôs, em 1866, a categoria Protista, incluindo algas, fungos, protozoários e bactérias. Posteriormente, em 1959, a classificação mais aceita passou a ser a de Robert H. Whittaker (1920-1980), composta por cinco reinos: Protista (protozoários e algumas algas), Monera (bactérias procariontes e cianobactérias ou algas azuis), Fungi, Plantae e Animalia. Em 1987, a análise filogenética molecular levou o microbiologista Carl Richard a mudar o rumo da taxonomia de procariontes e a propor em 1990 o domínio Archaea

para as arqueobactérias (consideradas representantes das formas mais primitivas de vida na terra) e mais dois outros domínios: as outras bactérias (Bactéria) e os eucariontes (Eucarya) - fungos, protozoários, plantas e animais.

Então como estamos vendo, o paradigma atual da taxonomia para as bactérias, reside no entendimento das relações evolutivas, fundamentado quase que exclusivamente na filogenia de sequências de rRNA 16S e em novas metodologias moleculares que estão surgindo a cada dia. Não há mais um consenso sobre o conceito estrito de espécie em procariontes, mas diferentes modelos evolutivos, de um lado baseados em seleção natural, e de outro na transferência genética horizontal. Para testar estes modelos, serão necessárias futuras pesquisas sobre evolução, filogenia, e genética de populações procariontes com dados obtidos através de estudos moleculares como *Multi Locus Sequence Analysis* (MLSA) (Ver capítulo 2 do volume 3) e outras técnicas que estão sendo aperfeiçoadas para essas análises.

4.1. Nomenclatura taxonômica

Considerando que todos os seres vivos, e mesmo objetos inanimados, podem estar dentro de vários tipos de classificação, todos deverão possuir um nome para que sejam reconhecidos como pertencentes àquele táxon ou categoria.

A nomenclatura taxonômica se iniciou com este objetivo, em 1735, com os estudos de um sistemático botânico sueco chamado Carolus Linnaeus (Carl Von Linné). Ele desenvolveu um sistema binominal, baseado em um plano de organização, que serviria a todos os seres vivos, incluindo os organismos bacterianos. Esse sistema possuía dois princípios básicos:

1. O uso de palavras latinas, para nomear os grupos de organismos.
2. O uso de categorias de classificação, estabelecendo uma hierarquia.

Inicialmente, as categorias propostas por Lineu foram: **reino, classe, ordem, gênero e espécie.**

Devido à evolução das técnicas taxonômicas e do grande número de organismos descritos após as propostas de Linnaeus, foi necessária uma subdivisão das cinco categorias. Assim, atualmente usamos: **reino, filo, classe, ordem, família, tribo, gênero e espécie**. Alguns especialistas sugerem que, de acordo com cada caso, podem ser adicionadas outras categorias, como subfilo, superclasse e subespécie.

A organização taxonômica havia, então, sido criada com o intuito de classificar, ordenar e identificar os microrganismos, passando a se dividir em classificação, nomenclatura e identificação:

A. Classificação - Divide os microrganismos em grupos, de acordo com as características artificiais ou naturais. As classificações artificiais são baseadas nas características fenotípicas (expressão), principalmente morfológicas e fisiológicas dos microrganismos. Já as classificações naturais, como já falamos, são baseadas nas relações filogenéticas moleculares das bactérias, através de comparações na sequência de várias macromoléculas ou genes (genotípica).

B. Nomenclatura (no nosso caso bacteriana) - Refere-se ao nome do microrganismo, seguindo o Código Internacional para Nomenclatura de Procariontes (*International Committee on Systematic of Prokaryotes*). Este contém todos os princípios e recomendações para a descrição de uma nova unidade de classificação (ou *táxon*, no plural *taxa*), em espécie, gênero ou família. As regras do código internacional baseiam-se no sistema binominal desenvolvido por Linnaeus: O nome de uma espécie bacteriana é proveniente da combinação, em latim, formada de duas partes, o nome do gênero, seguido pelo nome da espécie bacteriana. Como, por exemplo: *Escherichia coli* (*Escherichia* é o gênero, e *coli* a espécie).

Seguindo a regra, apenas a primeira letra do nome do gênero é escrita em maiúscula, e o nome completo deverá ficar em itálico ou sublinhado. Exemplo: *Escherichia coli* ou Escherichia coli.

No caso de bactérias em que os sorotipos possuem grande importância, eles são citados após o nome da espécie, mas não se muda a grafia para itálico, o que poderá causar confusão.

Exemplo: *Salmonella enterica*, subespécie (subsp.) *enterica* sorotipo Typhi. Muitas vezes encontraremos escrito *Salmonella* Typhi.

Para se estabelecer um nome de um táxon, este deverá ser avaliado pelo Código Internacional para Nomenclatura de Procariontes. Após validação, o novo nome é divulgado à comunidade científica através da revista *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB).

C. Identificação - É um processo que determina as características do microrganismo, sua relação com microrganismos similares ou diferentes, e, posteriormente, com base nesses achados, indica-lhe o nome.

Normalmente o nome da espécie determina uma característica morfológica ou bioquímica ou pode homenagear uma pessoa ou lugar.

Para citar uma espécie que não tenha sido identificada, mas que conhecemos o gênero, faz-se uso da abreviatura “sp.”, que significa “espécie”. Por exemplo, *Klebsiella* sp., ou seja, uma espécie qualquer do gênero *Klebsiella*. Se for necessário fazer referência a várias espécies do gênero, a abreviatura a ser utilizada é “spp.”, “espécies”: *Klebsiella* spp. Deve ser observado que sp. ou spp. não são escritos em itálico ou sublinhados.

Atualmente, a taxonomia e a nomenclatura são realizadas por determinações genéticas (homologia do DNA, análise de sequência do DNA, análise do RNA 16S ribossômico). Permitindo sistemas taxonômicos mais estáveis, onde as modificações de nomes sejam menos frequentes.

Nos últimos anos, a classificação taxonômica ganhou apoio da Biologia computacional e da bioinformática, empregando o método das árvores filogenéticas para facilitar a taxonomia dos seres vivos.

4.2. Convenção taxonômica

Sufixos usados para determinação de ordens, famílias e tribos:

- Ordens: sufixo – *ales*. Ex.: *Eubacteriales*
- Famílias: sufixo – *aceae*. Ex.: *Bacillaceae*
- Tribos: sufixo – *ae*. Ex.: *Proteae* (*Proteus*)

4.3. Regras de modificação na nomenclatura

Os nomes dos microrganismos podem ser modificados após estudos mais detalhados (Biologia Molecular), e estes devem ser registrados no IJSB, de acordo com as seguintes regras:

a. Quando se transferir uma espécie de um gênero para outro, a espécie será mantida.

Ex.: *Campylobacter pylori* mudou para *Helicobacter pylori*.

b. Quando a cepa pura (cepa tipo) pertencer a outro gênero, o gênero desta cepa deverá ser considerado nulo.

Ex.: *Enterobacter agglomerans* mudou para *Pantoeae agglomerans*.

c. Quando um microrganismo estiver em duas ou mais designações de gênero e espécie, o nome do gênero/espécie da cepa tipo deverá ser considerado como o nome válido.

5. Principais métodos de visualização e coloração comuns na prática laboratorial

Considerando o capítulo “Microscopia”, do volume 1 desta coleção, vimos que as bactérias só podem ser visualizadas com auxílio dos diferentes tipos de microscópio. Vamos tratar aqui das técnicas associadas ao microscópio ótico, forma mais simples e comum de se examinar estes microrganismos no laboratório.

De uma maneira geral, as bactérias podem ser observadas de duas formas, a primeira a fresco, através de observação de suspensão bacteriana entre lâmina e lamínula, ou pela gota pendente, e a segunda através de um esfregaço fixado e corado.

Geralmente, a observação a fresco é utilizada para visualização da mobilidade e morfologia de bactérias espiraladas (que podem ficar distorcidas se fixadas), ou mesmo em outras bactérias, para observar alterações na divisão celular e formação de esporos. Neste caso, utiliza-se geralmente um microscópio de campo escuro, pois as bactérias ao microscópio de campo claro tendem a aparecer transparentes, sendo necessária, muitas vezes, a utilização de filtros de densidade neutra para diminuir a intensidade luminosa e facilitar a visualização.

Quando utilizamos material fixado e corado, temos várias vantagens, pois além de as células ficarem mais visíveis após a coloração, podemos transportar estas lâminas sem risco (pois o material está fixado), bem como diferenciar células de afinidades distintas aos corantes e de morfologia variada.

O esfregaço do material deve ser pouco espesso e homogêneo. Deve ser feito em área de segurança biológica, a partir de um caldo preferencialmente, ou do material diluído em salina, espalhado com alça bacteriológica em lâmina de vidro limpa, desengordurada e seca. Posteriormente, a lâmina deverá ser seca ao ar. Após a secagem, o material deverá ser fixado à lâmina, através do calor ou quimicamente.

A maioria das bactérias tem afinidade por um grande número de corantes, principalmente aqueles do grupo dos derivados básicos da anilina (azul de metileno, violeta de genciana, tionina, fucsina básica, etc.). Quando fazemos uma coloração com apenas um corante e observamos a morfologia da bactéria, chamamos de coloração simples. Quando utilizamos mais de um corante ou reagente, com o intuito de evidenciar diferenças entre células bacterianas, damos o nome de coloração diferencial ou seletiva.

Através do estudo das bactérias e de seu comportamento diante de diferentes corantes, verificou-se que há diferentes reações características de determinados grupos bacterianos, o que facilita, neste caso, a identificação destes grupos, baseada na resposta da amostra ao determinado método de coloração.

Dentre os métodos diferenciais existentes, aqueles que apresentam maior importância dentro de um Laboratório de Análises Clínicas são o método de **Gram**, o método de **Ziehl-Neelsen** e o método de **Albert-Laybourn**. A seguir explicaremos estas técnicas comuns e também o método de **Fontana-Tribondeau**, que apesar de não ser diferencial, ainda é utilizado em alguns laboratórios, com certa frequência.

Existem ainda os métodos de coloração pouco usados na rotina laboratorial, mas que podem ser úteis quando se necessita corar alguma estrutura específica, como a coloração de flagelos, esporos e cápsula, que discutiremos no final deste tópico.

5.1. Coloração de Gram

Desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Joachim Gram, em 1884. Tem como fundamento o fato de que as bactérias, quando coradas por derivados próximos da rosanilina (violeta genciana, cristal-violeta, metil-violeta, etc.) e depois de tratadas pelo iodo (solução iodo-iodetada, conhecida como lugol), formam um composto de coloração escura, entre o iodo e o corante, chamado iodopararosanilina. Este composto, nas bactérias Gram-positivas, é fortemente retido e não pode ser facilmente removível pelo tratamento posterior com o álcool, ao passo que nas Gram-negativas este composto é facilmente descorado pelo álcool.

Após a ação do álcool, é feita uma segunda coloração pela safranina ou fucsina de Ziehl, diluída a 1/10. Neste caso, as bactérias Gram-negativas

aparecerão vermelhas, devido a cor do corante de fundo, e as Gram-positivas aparecerão roxas, pois conservam a cor do corante inicial (Figura 3).

Esta distinção é muito importante na sistemática bacteriana e ocorre com base nas diferenças existentes na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram negativas já estudadas em Citologia bacteriana. Todavia, é importante sempre utilizar culturas jovens para não haver falsos resultados.

Através de nossa experiência, podemos formular duas regras simples:

- Os cocos geralmente são Gram +, com exceção do gênero *Neisseria* (gonococo e meningococo).
- Os bastonetes geralmente são Gram, com exceção de *Corynebacterium*, *Listeria* (cocobacilo), *Bacillus* e *Clostridium*.

5.1.1. Método de Gram (Clássico)

A partir de um esfregaço delgado, homogêneo, seco e fixado:

- Corar por 1 minuto, com solução cristal violeta fenicada (alguns autores sugerem violeta genciana ou violeta de metila).
- Alguns autores sugerem, ainda, a lavagem da lâmina com água, para melhorar a visualização. Todavia, esta etapa é desnecessária.
- Escorrer o corante e cobrir por 1 minuto o esfregaço com solução de lugol (solução iodo-iodetada).
- Alguns autores sugerem a lavagem com água, nesta etapa. Realmente, a retirada do excesso de corante melhora a observação, contudo, esta etapa também não é obrigatória.
- Descorar com álcool absoluto (± 30 segundos)*.
- Lavar com água (obrigatoriamente).
- Corar com safranina ou fucsina de Ziehl diluída a 1/10 (± 30 segundos) – Alguns autores sugerem que ao corar organismos anaeróbios a opção seja a carbol-fucsina, que permite melhor penetração.

- Lavar com água (obrigatoriamente) e secar.
- Observar em objetiva de imersão (100 X).

* Em alguns livros, podemos encontrar modificações utilizando álcool-acetona, mas a técnica preconizada atualmente pelo Ministério da Saúde sugere a utilização de álcool 99,5°GL e, como corante de fundo, a safranina.

5.1.2. Preparação de corantes

A. Cristal Violeta Fenicada

Cristal violeta (violeta de genciana).....	1,0 g
Álcool 95°.....	10 mL
Fenol fundido	2,0 g
H ₂ O destilada.....	100 mL

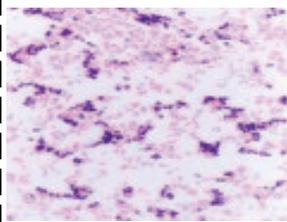
Dissolver o corante no álcool, adicionar o fenol fundido pouco a pouco e acrescentar a H₂O destilada. Filtrar após 24 horas de repouso.

B. Lugol

Iodo metálico.....	1,0 g
Iodeto de potássio.....	2,0 g
H ₂ O destilada.....	300 mL

Triturar e misturar o iodo metálico ao iodeto de potássio e adicionar a H₂O destilada aos poucos.

Figura 3. Bactérias coradas pelo método de Gram



C. Fucsina de Ziehl

Usa-se diluída a 1/10 (vide fucsina fenicada de Ziehl) ou safranina diluída em água.

Safranina.....2,5 g

Água destilada.....500 mL

Misturar bem o pó na água até a completa dissolução.

5.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Desenvolvida pelo bacteriologista Franz Ziehl e pelo patologista alemão Friedrich Carl Adolf Neelsen, em 1882. Baseia-se na propriedade de poucos gêneros bacterianos (*Micobacterium* e *Nocardia*) de resistirem ao descolorimento com uma solução de álcool-ácido, após tratamento pela fucsina fenicada aquecida, permanecendo coradas de vermelho (BAAR- Bacilo-Álcool-Ácido-Resistente), diferentemente das outras bactérias, que, por não possuírem esta propriedade, tomam a cor do corante de fundo, normalmente feita com azul de metileno ou ácido pícrico saturado (Figura 4).

A álcool-ácido-resistência está relacionada à existência na parede celular destas bactérias de lipídeos fortemente ligados (ex.: ácido micólico), que provocam hidrofobicidade, dificultando a penetração de corantes aquosos, a ação dos mordentes e dos diferenciadores, o que não ocorre em outros gêneros bacterianos.

5.2.1. Método de Ziehl-Neelsen

Esfregação homogêneo, delgado e fixado.

- Cobrir o esfregação com solução de fucsina de Ziehl, deixar agir por 5 a 10 minutos, aquecendo com chama branda (evitar a fervura), até despreendimento de vapores (essa etapa pode ser realizada em banho-maria, todavia, o tempo de aquecimento dobra para até 20 minutos).

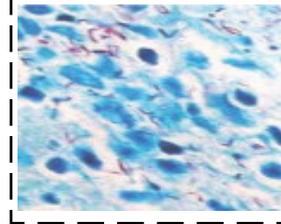
- Lavar em água corrente e descorar com solução de álcool-ácido clorídrico a 1%.
- Cobrir o esfregaço com azul de metileno, por aproximadamente 30 segundos.
- Lavar e deixar secar.
- Observar em objetiva de imersão (100 X).

5.2.2. Preparo dos corantes

A. Fucsina de Ziehl

Fucsina básica	1,0 g
Álcool absoluto (etanol).....	10 mL
Dissolver e acrescentar:	
Fenol aquoso (*)	5 mL
H ₂ O destilada	100 mL

Figura 4. *Micobacterium* spp. corado pelo método de Ziehl-Neelsen



Repousar por 48 horas e filtrar em papel de filtro de média porosidade.

B. Azul de Metileno

Azul de metileno.....	2,0 g
Álcool absoluto (etanol)	10 mL
Dissolver e acrescentar:	
Fenol (*) aquoso.....	2,2 g

Agitar e completar com:

H ₂ O destilada	100 mL
----------------------------------	--------

(*) Fenol aquoso (relação): 100 g de fenol crist. para 100 mL de H₂O.

5.3. Coloração de Albert-Laybourn

Foi sugerida inicialmente por Henry Albert, em 1920, e modificada por Ross Laybourn, em 1924. Baseia-se no fato de algumas bactérias apresentarem corpúsculos citoplasmáticos localizados nas regiões polares (corpúsculos metacromáticos ou corpúsculos de Babes Ernst), que se coram pelo Lugol forte (de cor marrom), se evidenciando, em contraste com o corpo bacilar, que se cora em verde-azulado pela solução de Laybourn (Figura 5). Tais características são observadas nas corinebactérias e sua presença é associada aos sintomas clínicos característicos da difteria, o que possibilita um diagnóstico presuntivo da doença, pela microscopia ótica.

5.3.1. Método de Albert-Laybourn

Esfregaço homogêneo, delgado e fixado.

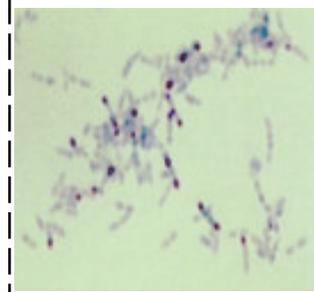
- Cobrir o esfregaço por 3 a 5 minutos, com a solução de Albert-Laybourn.
- Escorrer (sem lavar).
- Cobrir com solução Lugol forte, por aproximadamente 2 minutos.
- Lavar e secar.
- Observar em objetiva de imersão (100 X).

5.3.2. Preparo de corantes

A. Solução de Albert-Laybourn

Azul de toluidina.....	0,15 g
Verde de malaquita	0,20 g
Ácido acético glacial	1 mL
Álcool 95°.....	2 mL
H ₂ O destilada	100 mL

Figura 5. Amostra de *Corynebacterium* corada pelo método de Albert Laybourn



B. Solução de Lugol Forte

Iodo metálico.....	2,0 g
Iodeto de potássio.....	3,0 g
H ₂ O destilada	300 mL

Guardar em frasco âmbar ao abrigo da luz.

5.4. Método de Fontana-Tribondeau

Desenvolvido em 1920, não é um método de coloração verdadeiro. Na realidade, trata-se de uma técnica de impregnação pela prata usada para auxiliar a visualização de bactérias espiraladas, as quais, geralmente, são muito finas e se coram de forma insuficiente pelo Gram (ex.: *Treponema pallidum* e *Leptospira interrogans*). A partir desta técnica, as espiroquetas aparecem em cor marrom-escuro ou negra, sobre um fundo amarelo-castanho ou marrom-claro (Figura 6). Atualmente, os laboratórios têm utilizado mais a microscopia de campo escuro a fresco para visualizá-las, ou os métodos de imunofluorescência (Ver capítulo 1 deste volume).

5.4.1. Técnica de Fontana-Tribondeau

- Secar o esfregaço ao ar.
- Derramar sobre a lâmina algumas gotas da solução **fixadora** (renová-la 3x, por 30 segundos, para “desemoglobinizar” o esfregaço).
- Cobrir com solução **mordente**, aquecendo a lâmina até emitir vapores. Aguardar 30 segundos.
- Lavar em água corrente.
- Tratar pela solução **impregnadora** (nitrato de prata amoniacal), aquecendo ligeiramente a lâmina até a emissão de vapores, deixando agir por 30 segundos (a preparação toma a cor marrom).

- Lavar bem em água corrente.
- Secar com papel de filtro.
- Examinar com objetiva de imersão.

5.4.2. Preparo de corantes

A. Líquido de Ruge (fixador):

Ácido acético glacial.....	1 mL
Formalina 40%	2 mL
Água destilada.....	100 mL

B. Mordente

Ácido tânico.....	5 g
Ácido fênico (fundido).....	1 mL
Água destilada.....	100 mL

Dissolver o ácido fênico na água.

Colocar o ácido tânico em um balão, adicionar cerca de 10 mL da água fenicada e misturar bem, para dissolver o máximo possível. Acrescentar o restante da água fenicada para completa dissolução. Filtrar no dia seguinte, se necessário.

C. Nitrato de Prata Amoniacal (solução impregnadora)

Nitrato de prata.....	5 g
Água destilada.....	100 mL

Reservar 5 mL da solução acima e, aos 95 mL restantes, adicionar amônia, gota a gota (misturando sempre), até que o precipitado de cor castanho-acinzentada, que se forma, se dissipe. Adicionar, então, as



gotas da solução de nitrato de prata reservada, até desenvolver uma leve opalescência que persiste após agitação. Armazenar em frasco escuro.

5.5. Coloração para flagelos

Os flagelos são estruturas bacterianas responsáveis pela motilidade, as quais possuem, em sua constituição, moléculas proteicas denominadas “flagelinas”. O flagelo é formado por milhares de monômeros polimerizados desta proteína, dispostos de forma a compor um único flagelo (tópico 2).

Algumas dificuldades podem ser encontradas quando se deseja demonstrar este tipo de organela através de microscopia ótica, já que a produção bacteriana de flagelos não é contínua e depende de diferentes fatores, como o meio de cultura usado, a temperatura, o estágio do crescimento, etc. Outro fato importante é que, devido à sua delicadeza, os flagelos podem ser acidentalmente extraídos pela pipetagem ou homogeneização vigorosa. Contribuindo ainda para essa dificuldade, os flagelos se despolimerizam com facilidade, isto é, se dissociam em monômeros de flagelina com frequência (temperaturas acima de 60°C e pH ácido (\pm pH 4,0), quando a bactéria está em presença de solventes orgânicos, de álcalis e de ureia).

Devido a esses problemas, é necessário aplicar algumas técnicas para aumentar o diâmetro dos flagelos, de forma a torná-los visíveis pela microscopia. O ácido tânico contido no corante se ligará ao flagelo tornando-o mais espesso. A demonstração do flagelo ocorrerá devido à ligação do corante ao ácido tânico. (Semelhante ao que acontece no Fontana Tribondeau). Por aparecerem muito tênues na lâmina, não conseguimos obter nenhuma foto com nitidez suficiente para expor aqui.

5.5.1. Técnica de visualização de flagelos

- Cultivar a bactéria em estudo, de acordo com suas preferências físicas, em uma placa de ágar infusão de cérebro-coração (BHI) ou em ágar soja tripticase (com ou sem sangue).
- Coletar delicadamente uma alíquota do crescimento com uma alça de platina e transferi-la para um tubo, contendo cerca de 3 mL de água destilada. Inverter o tubo uma vez para homogeneizar a suspensão. Colocar uma gota desta suspensão sobre uma lâmina inclinada a 45° e deixar secar ao ar.
- Cobrir a lâmina com uma mistura de corantes, que inclui fucsina e ácido tânico (fórmula abaixo), e deixar por 5 minutos, até que um brilho metálico esverdeado cubra metade da área. Não deixar o corante secar sobre a lâmina.
- Retirar o corante, enxaguando com água. Secar e observar ao microscópio, com objetiva de imersão.

5.5.2. Preparo dos corantes

Solução A:

Fucsina (certificada para coloração de flagelo) 0,5 g
Álcool etílico a 95%..... 50 mL
Misturar e deixar em repouso durante uma noite, para dissolver.

Solução B:

Cloreto de sódio..... 0,75 g
Ácido tânico1,5 g
Água destilada..... 100 mL

Misturar vigorosamente as duas soluções. Esta mistura de corantes pode ser utilizada por até 2 meses, se mantida em refrigeração. Caso haja formação de precipitado, procurar não homogeneizar com o restante da solução durante procedimento de coloração.

5.6. Coloração para esporos com verde malaquita (Wirtz-Conklin)

A parede dos esporos constitui uma barreira eficaz contra a entrada e saída de materiais do esporo, mas por sua impermeabilidade, geralmente é refringente e de difícil coloração. A exposição prolongada ao corante verde malaquita, associado ao aquecimento, permite a penetração do corante e a coloração do esporo por um verde intenso. Como contraste (contracorante), utiliza-se a safranina, que cora outras estruturas em vermelho, facilitando a diferenciação dos esporos (Figura 7).

5.6.1. Técnica para coloração de esporos

- Preparar esfregaço e fixar pelo calor.
 - Cobrir o esfregaço com o corante verde malaquita;
 - Aquecer água em um béquer, até a emissão de vapores. Colocar a lâmina sobre este béquer, mantendo o corante aquecido por 5 minutos. Alternativamente, cobrir a lâmina com verde malaquita e aproximar de uma chama até que desprenda vapor, sem deixar que o corante ferva. Afastar do fogo e, após 1 a 2 minutos, repetir a operação por 3 a 4 vezes.
 - Lavar suavemente com água, evitando o choque térmico, que poderá quebrar a lâmina.
 - Adicionar a solução de safranina por 30 segundos.
 - Lavar e secar.
- Observar ao microscópio com objetiva de imersão.

5.6.2. Preparo dos corantes

Solução A: Verde malaquita a 5%

Verde malaquita..... 2,5 g

Água destilada..... 50 mL

Misturar e deixar em repouso durante uma noite para dissolver.

Solução B: Safranina

B.1 Solução estoque

Safranina50 g

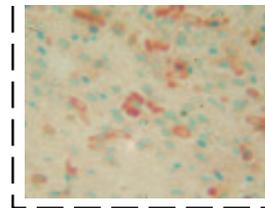
Etanol a 95%.....2.000 mL

B.2 Solução de trabalho

Solução estoque de safranina (B.1).....300 mL

Água destilada.....2.700 mL

Figura 7. Esporos colorados pelo método de Wirtz-Conklin



5.7. Coloração de cápsula

A cápsula é uma camada gelatinosa externa (polissacarídeos, glicoproteínas ou polipeptídeos) produzida por algumas bactérias e que envolve a parede celular (ver item 2.2.4 - Glicocálice).

Não existe em todos os microrganismos, todavia, os que a apresentam, possuem maior capacidade de produzir doenças, uma vez que essa estrutura protege a bactéria das atividades fagocíticas das células do hospedeiro. A cápsula constitui um mecanismo de defesa das bactérias, e está relacionada com a patogenicidade bacteriana.

A cápsula pode ser detectada por técnicas imunológicas, pois possibilita a reação de isolados bacterianos com anticorpos anticapsulares, o que vai

conduzir ao aparecimento de um entumescimento capsular (reação de Quellung), quando observada ao microscópio (ver capítulo 1 deste volume).

A coloração da cápsula não é simples, já que o material capsular é hidrossolúvel e pode ser removido com a lavagem. Por outro lado, os esfregaços não devem ser aquecidos (fixados) porque a contração da célula pode criar uma zona à volta do microrganismo e produzir um artefato que pode ser confundido com a cápsula. Todavia, é possível visualizar bactérias produtoras de cápsula pela coloração negativa (tinta da China), pois a cápsula rejeita as partículas deste corante, permitindo a observação das células descoradas sobre fundo negro. Pode-se ainda adicionar fucsina diluída aos esfregaços já secos com tinta da China, neste caso, visualizamos as células coradas em rosa, rodeadas por halos incolores (cápsulas), no fundo negro. O método de Hiss é outra alternativa para visualizar essa estrutura.

5.7.1. Técnicas de coloração de cápsula

5.7.1.1. Método da tinta da China (coloração negativa)

- Como na técnica dos flagelos, deve-se cultivar a bactéria produtora de cápsula em meio rico (BHI). Uma boa sugestão é usar a *Klebsiella pneumoniae* que produz geralmente essa camada externa em abundância.
- Colocar 1 ou 2 gotas de cultura em uma lâmina.
- Depositar na lâmina uma gota de tinta da China ao lado das gotas de cultura.
- Cobrir com uma lamínula, comprimindo-a entre folhas de papel de filtro, para se obter uma quantidade bem tênue de corante e material (não se esquecer de usar luvas e descartar o papel em local aonde será autoclavado).
- Observar ao microscópio óptico (40X).

5.7.1.2. Método da tinta da China com fucsina diluída

- Seguindo a mesma técnica, depositar na lâmina uma gota de tinta da China ao lado das gotas de cultura.
- Deslizar uma lâmina sobre a primeira, fazendo um esfregaço, e deixar secar ao ar.
- Corar com fucsina diluída, durante 2 minutos, e lavar suavemente com água.
- Secar e observar em imersão.

5.7.1.3. Método de Hiss

Neste método, desenvolvido em 1905, utiliza-se, como corante primário, o cristal violeta aplicado a um esfregaço não fixado (o material capsular aparece corado de roxo). Como descorante e corante de contraste, utiliza-se a solução de sulfato de cobre a 20%.

Ao contrário da célula bacteriana propriamente dita, a cápsula é neutra e, por isso, o corante primário, embora tenha aderido, não é absorvido. Uma vez que os constituintes da cápsula são hidrossolúveis e podem ser perdidos durante a lavagem, o sulfato de cobre é usado como descorante. Ele remove o excesso do cristal violeta que aderiu à cápsula e, ao mesmo tempo, atua como corante de contraste, pois é absorvido pelo material capsular que ele descorou. Assim, a cápsula aparece agora contrastando com o roxo da célula, como uma zona mais clara (Figura 8).

Execução prática:

- Preparar o esfregaço para corar, sem o fixar.
- Cobrir o esfregaço com cristal violeta, deixando agir por 5 a 7 minutos.
- Lavar o esfregaço com uma solução de sulfato de cobre a 20%;

- Secar com cuidado.
- Observar ao microscópio luminoso, com objetiva de imersão.

5.7.2. Preparo dos corantes

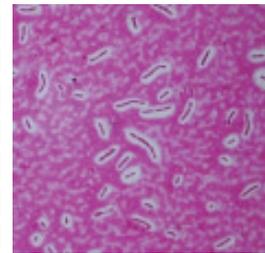
Cristal violeta e fucsina diluída (veja colorações anteriores)

Solução de sulfato de cobre a 20%:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$20 g

Água destilada.....100 mL

Figura 8. Visualização da cápsula bacteriana



5.8. Considerações

Outros métodos diferenciais podem, e são, utilizados para evidenciar diversos gêneros bacterianos, bem como modificações dos métodos aqui apresentados. Atualmente, por exemplo, em vez do cristal violeta, é preconizado pelo Ministério da Saúde a violeta de metila que, inclusive, já fixa a amostra à lâmina sem necessitar da fixação na chama do bico de Bunsen. Todas as mudanças que são implementadas a esses métodos e a criação de novas técnicas têm o intuito de melhorar e clarificar a visualização bacteriana no microscópio ótico de campo claro, porém, temos a certeza de que, na rotina diária de um laboratório de análises clínicas, estes métodos serão, sem dúvida, os de maior utilização e de aplicação mais global.

Outro fator importante é o controle de qualidade das substâncias a serem utilizadas e das técnicas. Sempre que for realizá-las, o ideal é ter em mãos bactérias-padrão, com comportamento conhecido diante dos corantes/reagentes que serão usados no teste. Elas servirão de parâmetro do funcionamento do mesmo, auxiliando também o observador na comparação do resultado esperado, com o obtido na amostra em pesquisa.

6. Meios de cultura: preparo e utilização

O cultivo dos microrganismos, em condições laboratoriais, é um pré-requisito para seu estudo adequado. Para que isto possa ser realizado, é necessário o conhecimento de suas exigências físicas e nutritivas. Estas informações resultaram no desenvolvimento de numerosos meios de cultura. Por causa da grande diversidade das exigências nutritivas das bactérias, há, também, grandes diferenças na composição dos meios utilizados.

6.1. Meio de cultura

É qualquer substância, sólida, semissólida ou líquida, que possua um conjunto de fontes de nutrientes e que seja utilizada para o cultivo de microrganismos.

6.2. Classificação dos meios de cultura

Os meios de cultura podem ser classificados segundo o seu estado físico, em função da adição de agentes solidificantes, pela sua composição e pelo seu objetivo de utilização.

6.2.1. De acordo com o agente solidificante (gelose ou ágar-ágar)

A partir de um meio líquido, pode-se adicionar gelatina (gelose) ou ágar-ágar para torná-lo mais ou menos consistente. A gelose, muito utilizada no passado, podia ser metabolizada por alguns microrganismos. Hoje, no entanto, se utiliza muito mais o ágar-ágar, que somente tem papel solidificante.

O ágar-ágar é uma substância coloidal e hidrofílica (grupo das mucilagens) extraída de algas vermelhas, que possui ponto fusão a aproximadamente 100°C e de solidificação a aproximadamente 40°C. A adição (de diferentes quantidades) ou não desta substância no meio vai conferir-lhe diferentes consistências.

- Meios Sólidos – Onde são adicionados geralmente de 1,0 g a 3,0 g % de ágar (podem ser liquefeitos se aquecidos). A maioria dos microrganismos crescem formando colônias.

Ex: Ágar nutritivo.

- Meios Semisólidos - Onde são adicionados, geralmente, de 0,1g a 0,7g% de ágar. Servem, por exemplo, para visualizar a motilidade bacteriana ou, muitas vezes, como base de meio de transporte.

Ex: Meio SIM e Cary & Blair.

- Meios Líquidos - Sem adição de ágar. São os chamados “caldos”. Sua turvação é sinal de crescimento bacteriano.

Ex: Caldo nutritivo, caldo simples e caldo Casoy.

O procedimento correto para obtenção ideal de meio contendo ágar exige, após sua adição, o aquecimento para sua dissolução em água fervente até a solução tornar-se cristalina e sem “grumos”. É importante também não refundir várias vezes o meio (alteração no valor nutritivo, percentual de água, etc.). Outro detalhe importante é que a aferição do pH, nos meios sólidos e semissólidos, deve ser feita a 50°C e, nos meios líquidos, à temperatura ambiente.

6.2.2. De acordo com a composição química

- Meios Sintéticos - A composição química de todos os seus componentes é conhecida (definidos).
- Meios Complexos - A composição química de alguns dos seus componentes é desconhecida (geralmente quando se adiciona soro, sangue ou outro componente que não se tem total conhecimento da composição química).

Os meios podem ser totalmente preparados no laboratório, seguindo formulações (receitas), ou a partir de meios dessecados (geralmente só adicio-

na-se água). Em ambos os casos, a água utilizada deve ser limpa, recém-destillada e neutra.

6.2.3. De acordo com o objetivo da utilização

- **Meios básicos** - São os de uso geral e podem ser usados como base no preparo de outros meios. O caldo simples é o exemplo mais comum.

- **Meios enriquecidos ou ricos** – Nestes meios, a adição de sangue, soro, extratos de tecidos animais ou vegetais ao caldo, ou ágar nutritivos, proporciona nutrientes acessórios, passando a permitir o crescimento de organismos heterotróficos fastidiosos (mais exigentes). Um exemplo clássico é o ágar chocolate, que permite o crescimento de diversas bactérias exigentes. Não confundir meios enriquecidos com meios de enriquecimento, como os caldos tetratoato de Kauffman e selenito, que geralmente possuem produtos seletivos ou proporcionam somente o crescimento de determinado grupo bacteriano.

- **Meios Seletivos** - A adição de substâncias químicas específicas ao caldo ou ao ágar nutritivo previne o crescimento de um grupo de bactérias sem agir sobre outro.

Ex₁: Cristal-violeta impedindo o crescimento de Gram-positivos, sem afetar o desenvolvimento dos Gram-negativos. Ex₂: Alguns antibióticos adicionados podem inibir um grupo de bactérias sensíveis e não afetar outro (resistentes).

- **Meios diferenciais ou indicadores** - A adição de certos reagentes ou substâncias no meio pode resultar num tipo de crescimento ou reação, após a inoculação e a incubação, que permite ao observador distinguir diferentes tipos de bactérias.

Ex: Incorporação de lactose e um indicador de pH: fermentadores ou não deste açúcar, lactose (+) e lactose (-) formarão colônias com cores distintas.

- **Meios de dosagem** - Meios de composição definida (meios sintéticos). São empregados para dosar vitaminas, aminoácidos e antibióticos.
- **Meios para contagem** - Tipos específicos de meios são indicados para determinar o conteúdo bacteriano de materiais, como, por exemplo, água, urina, leite, etc. (podem ser ricos, seletivos ou diferenciais).
- **Meios de estocagem ou manutenção** – Geralmente meios mínimos. A manutenção da viabilidade e características fisiológicas de uma cultura pode exigir um meio diferente do recomendado para um bom crescimento ótimo. Na preparação de um meio de estocagem, é preferível omitir a glicose e utilizar uma substância tampão, evitando variações de pH.
- **Meios de transporte** – Geralmente semissólidos, para evitar o extravasamento. São semelhantes aos meios de manutenção e devem ter o mínimo de nutrientes para a manutenção das bactérias sem que estas se reproduzam ou acidifiquem o meio.

Um ponto importante neste tópico é o controle de qualidade dos meios, onde devemos observar os possíveis erros na sua preparação e seu armazenamento de forma ideal.

6.3. Substâncias usadas no preparo de meios de cultura

Os nutrientes do meio de crescimento devem conter todos os elementos necessários à síntese biológica de novos organismos.

6.3.1. Fonte de carbono

O carbono é um elemento indispensável à síntese dos compostos celulares, e deve ser fornecido à bactéria, seja na forma de composto orgânico,

como os açúcares, ou inorgânicos, no caso, o CO_2 . As bactérias capazes de utilizar CO_2 como única fonte de carbono são **autotróficas**; enquanto as que requerem, além de CO_2 , uma fonte orgânica de carbono, são **heterotróficas**.

Em muitos casos, um mesmo composto pode funcionar como fonte de carbono, doador de hidrogênio e fonte de energia.

6.3.2. Fonte de nitrogênio

O nitrogênio também é necessário para a síntese de compostos indispensáveis à célula. Algumas bactérias necessitam de fontes orgânicas de nitrogênio, como aminoácidos ou sais orgânicos de amônio, enquanto outras são capazes de utilizar fontes inorgânicas de nitrogênio, como nitratos, amônio ou o próprio nitrogênio atmosférico.

6.3.3. Outros compostos

As bactérias necessitam ainda de fontes de enxofre e fósforo, que são geralmente fornecidos na forma de sulfatos e fosfatos. Além disso, devem estar presentes no meio, sais de sódio, potássio e magnésio, que são necessários em concentrações relativamente elevadas. Outros elementos, tais como zinco, ferro e manganês, são necessários em concentrações tão baixas que são supridos como impurezas dos demais componentes utilizados no preparo do meio.

As bactérias precisam também de vitaminas, que deverão ser também incorporadas ao meio de cultivo. Todavia, muitas podem sintetizá-las e, nestes casos, as necessidades são supridas pelo próprio microrganismo.

6.4. Fatores ambientais que afetam o crescimento de microrganismos

Além do conhecimento dos nutrientes apropriados para a cultura das bactérias, é preciso saber quais as melhores condições físicas ambientais para o desenvolvimento microbiano.

Assim como as bactérias variam grandemente, no que diz respeito as suas exigências nutritivas, também demonstram respostas diversas às condições físicas do ambiente.

Ex: Exigências atmosféricas, pH, temperatura, pressão osmótica (ver item 8 deste volume).

6.5. Seleção dos meios de cultura primários

Para um ótimo isolamento bacteriano é essencial inocular a amostra no meio de cultura primário apropriado; porém, há várias centenas de meios disponíveis no mercado. Na seleção para o uso rotineiro deve-se optar por um número relativamente pequeno de meios seletivos e não seletivos.

Um exemplo de meio não seletivo muito utilizado é o ágar sangue (permite o crescimento da maioria das bactérias). Podemos fazer outras opções mais seletivas, com base na fonte ambiental ou anatômica do material e no conhecimento das espécies bacterianas comumente encontradas nas amostras, observando sempre se há suspeita de algum microrganismo em particular.

Uma população microbiana, sob condições naturais, contém muitas espécies diferentes. Os microbiologistas devem ser capazes de **isolar, enumerar e identificar** as bactérias da amostra, para então **classificá-las e caracterizá-las**.

6.6. Isolamento e cultivo de culturas puras

Para determinarmos as características de um microrganismo, identificá-lo e apontá-lo como suspeito de causar ou não uma patologia, ele deve estar em cultura pura. Para realizar o isolamento, devemos optar pelo meio de cultura mais adequado não deixando de considerar os fatores-chave para esta escolha:

- Considerações sobre a origem do material a ser analisado.
- A espécie que se imagina estar presente nesta amostra.
- As necessidades nutricionais dos organismos.

6.6.1. Técnicas de isolamento de microrganismos

O material a ser analisado deve ser cultivado em meio sólido. Este processo pode ser feito das seguintes formas:

- Técnica de semeadura por espalhamento em superfície, onde uma quantidade definida da amostra diluída é colocada na superfície do ágar e, com o auxílio de uma alça de semeadura de vidro (alça de Drigalsky - ver capítulo 2 do volume 1), é espalhada sobre todo o meio com movimentos repetidos até absorção total do líquido. Posteriormente a placa é incubada. Essa técnica é muito usada para cálculo de bactérias, pois permite a obtenção das colônias isoladas de forma homogênea sobre o meio, facilitando a contagem.
- Método de *Pour-plate*, ou placa derramada, onde a amostra é diluída em tubos contendo meios sólidos liquefeitos (45°C). Após homogeneização, o conteúdo do tubo é distribuído em placa de Petri e após a solidificação do meio, a placa é incubada. As colônias se desenvolverão tanto acima quanto abaixo da superfície (colônias internas). Esse método também permite a contagem, já que o isolamento das colônias ocorre de forma bem distribuída na placa.
- Técnica de esgotamento por meio de estrias superficiais, onde a amostra é semeada na superfície do meio solidificado com alça bacteriológica, em movimentos de zigue-zague, para esgotar a população, assim, em algumas regiões do meio após a incubação, colônias individualizadas estarão presentes.

Em cada uma dessas técnicas o objetivo é diminuir a população microbiana, assim, as células bacterianas individuais estarão localizadas a certa distância umas das outras. As células individuais produzirão, se estiverem distantes o suficiente, uma colônia que não entra em contato com outras colônias. Todas as células em uma colônia têm o mesmo parentesco. Para isolar uma

cultura pura, uma colônia individual é transferida do cultivo inicial para um tubo de ensaio (geralmente também com meio de cultura).

6.7. Conservação das culturas puras

Uma vez que os microrganismos tenham sido isolados em cultura pura, é necessário manter as culturas vivas por um período de tempo, com o objetivo de estudá-las.

Para armazenar por um período curto, as culturas podem ser mantidas à temperatura de refrigeradores (4 a 10°C).

Para armazenar por um período longo, as culturas são mantidas congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) ou em freezers (-70 a -20°C), podendo também ser desidratadas e fechadas a vácuo em um processo denominado liofilização. Esses métodos são de grande valia para manter a cultura armazenada em uma coleção.

As coleções de culturas são bancos de microrganismos e outras células que estão à disposição de pesquisadores, professores, investigadores de patentes, e todos que necessitem estudar um tipo particular de organismo (no nosso caso, bactérias). As células são congeladas ou liofilizadas para resistirem a qualquer variação que possa destruir a identidade da célula original.

7. Reprodução bacteriana e fases de crescimento

Quando temos uma cultura bacteriana inoculada em meio adequado e incubada sob condições apropriadas vamos acabar tendo o aumento de células bacterianas que pode ser facilmente evidenciado através de diversos métodos, como turvação do meio, determinação da massa celular, contagem de células, entre outros.

○ processo mais comum e mais importante que ocorre nestes microrganismos é a divisão binária transversal ou simples, onde o aumento da popula-

ção ocorre em progressão geométrica ($1 - 2 - 4 - 8 - 16 \dots 2^n$), sendo $n = n^\circ$ de gerações. O número de gerações em um determinado tempo varia de acordo com a bactéria, podendo ser extremamente curto (*E.coli* ± 15 minutos) ou bastante longo (*M. tuberculosis* ± 932 minutos).

Através do estudo desta reprodução e de contagens praticadas a intervalos adequados, podemos traçar uma curva de crescimento bacteriano *in vitro* e estabelecer, desta forma, as várias fases deste processo:

7.1. Fase estacionária (1ª) ou fase Lag

Não há reprodução. Inicia-se após o momento da semeadura. A população permanece temporariamente inalterada. Nesta fase, as células não estão em repouso ou dormência, elas aumentam no tamanho (além do normal) e fisiologicamente estão muito ativas - podem estar deficientes em enzimas e/ou coenzimas que precisam sintetizar (Figura 9 – A).

No final desta fase, as células iniciam a divisão e aumentam gradualmente a população até o término da fase Log.

7.2. Fase logarítmica (fase Log ou exponencial)

A população passa a ter capacidade de se dividir regularmente em ritmo constante (o logaritmo resultante é uma linha reta). A velocidade de crescimento é máxima nesta fase, com a população uniforme - progressão geométrica (Figura 9 – B).

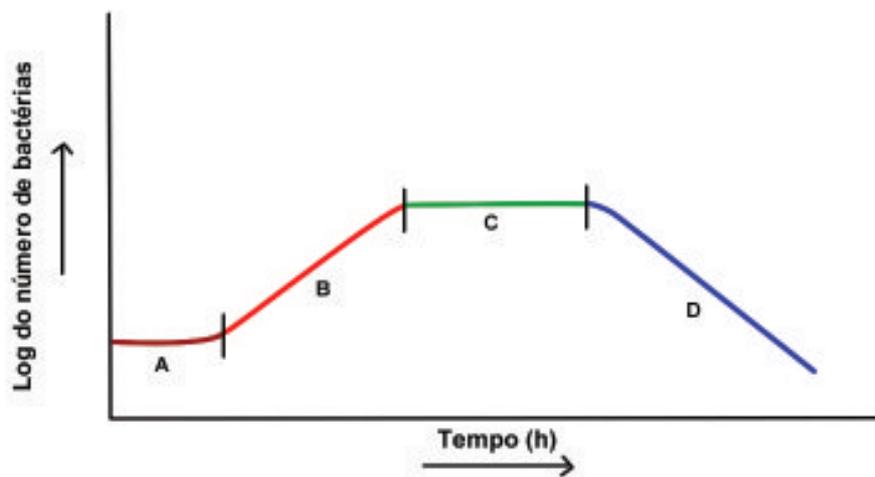
7.3. Fase estacionária (2ª) ou fase Platô

A fase log começa a decrescer (gradualmente) tendendo para o fim do crescimento. Atribuída a uma série de circunstâncias, como exaustão de alguns nutrientes e a produção de produtos tóxicos. A população permanece constante, resultado do equilíbrio entre reprodução (células neoformadas) e morte celular (Figura 9 – C).

7.4. Fase de declínio ou morte

A falta de nutrientes e de espaço, aliada a toxidez do ambiente, leva os microrganismos a morrerem mais rápido do que produzem novas células - extermínio progressivo até a cultura se tornar estéril (Figura 9 – D).

Figura 9. Faces do crescimento bacteriano *in vitro*



8. Fatores ambientais que afetam o crescimento bacteriano

Como já foi comentado, além do conhecimento dos nutrientes apropriados para o cultivo das bactérias, é necessário saber que condições físicas ambientais são melhores para o seu desenvolvimento.

Assim como existe grande variação, no que diz respeito às suas exigências nutritivas, estes organismos também demonstram respostas diversas às condições físicas do ambiente.

8.1. Temperatura

Temperatura ótima de crescimento: é a temperatura de incubação, que possibilita o mais rápido crescimento, durante menor tempo de acordo com o período de geração de cada gênero bacteriano (12 a 24 horas, para a maioria das bactérias comuns).

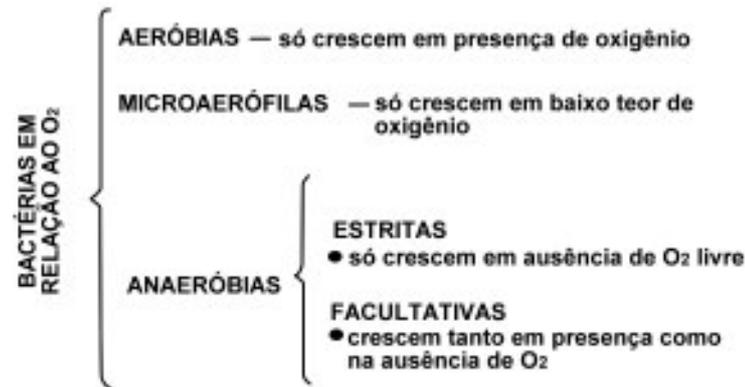
A temperatura ótima de crescimento pode não ser a temperatura ótima de outras atividades celulares. Estes valores podem ser diferentes, dependendo dos autores consultados, porém, em média, obedecem ao critério abaixo:

- **Bactérias psicrófilas** – São capazes de crescer a 0°C ou menos, embora seu crescimento ótimo esteja em temperaturas mais elevadas, 12°C ou 20°C. Diversas espécies de bactérias isoladas na Antártica podem crescer a -7°C, mas seu desenvolvimento ótimo ocorre entre 20°C a 30°C.
- **Bactérias mesófilas** – Crescem melhor de 25°C a 40°C. Neste grupo está a maioria dos patógenos bacterianos de importância clínica, já que esta temperatura coincide com a do nosso corpo.
- **Bactérias termófilas** – Crescem melhor de 45°C a 60°C. O limite de crescimento de algumas bactérias termófilas se estende para a região mesófila, recebendo a designação de **termófilas facultativas ou euritermófilas**.

Outras espécies do grupo termófilo se desenvolvem melhor em temperaturas acima de 60°C, não se desenvolvendo na faixa mesófila. São chamadas bactérias **termófilas verdadeiras, obrigatórias ou estenotermófilas**.

8.2. Oxigênio

Do ponto de vista do oxigênio, podemos dividir as bactérias conforme a chave:



- **Bactérias aeróbias estritas** - São aquelas que só crescem na presença de oxigênio, por utilizarem este composto como receptor final de elétrons.

Ex.: *Acinetobacter*.

- **Bactérias anaeróbias facultativas ou apenas facultativas** – Podem crescer tanto em anaerobiose como em aerobiose.

Ex.: *E.coli*.

- **Bactérias anaeróbias estritas** - Só crescem em anaerobiose, sendo inibidas ou mortas na presença de O₂, que não é utilizado em seu metabolismo.

Ex.: *Clostridium botulinum*.

- **Bactérias microaerófilas** - Só crescem em atmosfera contendo concentrações de oxigênio menores que as encontradas no ar atmosférico.

Ex.: *Campylobacter*

No laboratório, é muito simples cultivar bactérias aeróbias ou facultativas, visto que o oxigênio está sempre no ar, contudo, para a obtenção de atmosferas isentas ou pobres de oxigênio, usamos métodos especiais.

O emprego de meios redutores e frascos bem fechados, que são chamados comercialmente de jarras (Figura 10), juntamente com técnicas para diminuir ou eliminar o oxigênio do seu interior, possibilitarão o estudo das bactérias microaerófilas e anaeróbias.

- Pode-se gerar uma reação química, combinando o O_2 na formação de um novo composto. Isso pode ser conseguido pela simples queima de uma vela $\Rightarrow O_2 \Rightarrow$ dióxido de carbono, ou através de geradores comerciais de atmosfera vendidos na forma de envelopes, como bicarbonato de sódio e borohidreto de sódio. Essas substâncias combinadas com água liberam dióxido de carbono e

Figura 10. Jarra hermética



- hidrogênio, que a partir de um catalisador de paládio contido na jarra forma água. Além disso, o dióxido de carbono também estimula o crescimento de várias bactérias.
- Poderemos ter uma atmosfera de microaerofilia ou anaerobiose, dependendo da técnica e da forma de eliminar ou impedir a presença do oxigênio.
- Outra possibilidade é o emprego de meios especiais contendo agentes redutores, como o meio de tioglicolato, que é capaz de se combinar com o oxigênio dissolvido eliminando-o do meio de cultura. Pode-se também adicionar um indicador de presença de oxigênio, como o azul de metileno.
- Pode-se realizar a remoção mecânica do oxigênio de um frasco fechado, contendo tubos ou placas com meios inoculados \Rightarrow o ar atmosférico é aspirado e substituído por nitrogênio, hélio ou por uma mistura de nitrogênio e dióxido de carbono.

8.3. pH

A grande maioria das bactérias cresce bem em meios com pH ao redor de 6,5 a 7,5, apesar de muitas espécies tolerarem variações de pH entre 4,0 e 9,0.

Os meios de cultura são geralmente tamponados para evitar mudanças de pH, decorrentes da excreção de produtos do próprio metabolismo bacteriano.

Os tampões são compostos que podem resistir às mudanças de pH. A combinação de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 é largamente utilizada nos meios de cultivo, mas alguns ingredientes nutrientes do meio, tais como as peptonas, também possuem a capacidade de tamponamento.

8.4. Outros fatores

Pressão osmótica- Meios de cultura com pressões osmóticas menores que o interior da bactéria, geralmente não afetam sua viabilidade, uma vez que a rigidez da parede celular impede a entrada excessiva de água. Todavia, meios de cultura com pressões osmóticas maiores que a encontrada no interior da bactéria causam perda de água intracelular (efeito bacteriostático ou bactericida).

Observação: **Halofismo** - Certas bactérias isoladas de salmouras, pacotes de sal, alimentos e água do mar, chamadas bactérias halofílicas ou halófitas obrigatórias, crescem apenas quando o meio contém uma concentração inusitadamente elevada de sal (10% a 15%). Isto representa uma resposta especial do microrganismo à pressão osmótica.

Luminosidade - Alguns organismos autotróficos fotossintéticos devem ser expostos a uma fonte luminosa, pois a luz é sua fonte de energia. Outros liberam pigmentos quando expostos a luz, o que facilita na sua taxonomia.

9. Controle dos microrganismos

Para proceder adequadamente ao controle dos microrganismos, lançamos mão de processos de esterilização e desinfecção, que podem ser físicos ou químicos (ver capítulo 2 do volume 1). Outras formas de controle bacteriano (principalmente *in vivo*) podem ser realizadas utilizando quimioterápicos e antimicrobianos (tópico 9).

10. Quimioterapia e antibioticoterapia (Mecanismos de ação dos antimicrobianos)

Graças aos trabalhos do médico alemão Paul Erlich (1854 - 1915), com a descoberta de dois agentes quimioterápicos entre 1909 e 1912, o Salvarsan e Neosalvarsan (arsenobenzóis), deu-se início a era das substâncias capazes de atingir o microrganismo causador da doença, sem prejuízo ao portador (doente).

Erlich introduziu o índice quimioterápico, que era expresso pela razão entre a dose máxima tolerada e a dose mínima curativa. De acordo com seus trabalhos, um alto índice quimioterápico é alcançado pelas substâncias que apresentam um alto parasitotropismo e um baixo organotropismo.

Sintetizada em 1908 pelo químico Paul Gelmo, que estudava corantes, e pesquisada posteriormente em 1935 como substância bacteriostática pelo Nobel de Fisiologia e medicina (1939) Gerhard Johannes Paul Domagk (1895 – 1964), que batizou seu composto de prontossil, a sulfanilamida, resultou até 1945 em 5488 derivados. Utilizada até hoje, é mais conhecida com o nome de sulfa (Figura 11):

Figura 11. Configuração do Prontossil.



Sulfanilamida

A partir desta descoberta, vários outros produtos foram sintetizados, com o objetivo de se encontrar preparações cada vez menos tóxicas.

Em 1929, Sir Alexander Fleming (Nobel de Fisiologia e Medicina, em 1945) observou, por casualidade, que um fungo contaminante não só estava crescendo em uma placa de cultura que havia sido deixada aberta por descuido, como também as colônias de estafilococos, crescidas na placa, próximas a este fungo, estavam sofrendo lise. O pesquisador concluiu então que o *Penicillium notatum* (fungo que contaminou a placa) produzia uma substância bacteriolítica - o antibiótico que veio a ser conhecido como **Penicilina**, dando início a era dos antibióticos.

No ano de 1940, Selman Waksman (descobridor da estreptomicina) definiu um antibiótico como sendo uma substância química produzida por microrganismos, que tem a capacidade de inibir o crescimento de bactérias (ação bacteriostática), e até mesmo a de destruir bactérias e outros microrganismos (ação bactericida).

Atualmente, a denominação dos antimicrobianos é feita assim:

- Antibióticos – Antimicrobianos cuja produção (fabricação) se dá a partir de microrganismos (fungos, bactérias, etc.).

Ex.: Penicilina - Produzida pelo fungo *Penicillium notatum*.

- Quimioterápicos – Antimicrobianos cuja produção (fabricação) se dá através de substâncias sintetizadas em laboratório.

Ex.: Fluoquinolonas, Aspirina, etc.

Em Microbiologia, nos dedicamos aos agentes antimicrobianos, que formam um grupo especial de agentes quimioterápicos usados para tratar doenças causadas por microrganismos.

10.1. Seleção de agentes antimicrobianos

Agentes antimicrobianos são fármacos ativos no tratamento de infecções em razão de sua toxicidade seletiva (destroem o microrganismo invasor sem afetar as células do hospedeiro). Em muitos casos, a toxicidade seletiva não é absoluta, exigindo que a concentração do antimicrobiano seja controlada cuidadosamente, de modo a afetar o microrganismo em níveis toleráveis para o hospedeiro. A terapia seletiva com antimicrobianos usa como vantagem as diferenças bioquímicas existentes entre os microrganismos e os seres humanos.

Para se selecionar o agente antimicrobiano mais apropriado, deve-se ter conhecimento da identidade do microrganismo e sua sensibilidade aos agentes em particular, o sítio de infecção, os fatores ligados ao paciente e o custo da terapia.

Os antimicrobianos podem ser usados de três maneiras gerais – como terapia empírica, como terapia definitiva e como terapia preventiva ou profilática.

Na terapia empírica ou inicial, o antibiótico deverá cobrir todos os microrganismos prováveis (Gram-positivos e Gram-negativos), visto que o patógeno, ou patógenos, que estão causando a infecção, não foram identificados. Esse tipo de terapia poderá ser realizada com mais de um antimicrobiano (terapia combinada) ou com apenas um (monoterapia), e é usada frequentemente com agentes de amplo espectro. No entanto, com o microrganismo já identificado, a terapia antimicrobiana definitiva deverá ser iniciada com um esquema de espectro estreito e baixa toxicidade, baseado no resultado do antibiograma.

Quando o uso de um antimicrobiano está indicado na terapia profilática, como no caso de cirurgias ou extrações dentárias, devemos não só escolher aquele agente que seja ativo contra o microrganismo ou microrganismos, infectantes mais prováveis, mas o que possua o menor potencial de causar toxicidade ou reações alérgicas no paciente que será exposto ao risco de infecção.

10.2. Antimicrobianos usados na terapia das infecções

10.2.1. Sulfas e sulfonas

A combinação do trimetoprim com o sulfametoxazol (antimicrobiano pertencente a classe das sulfas), torna-o clinicamente eficaz, pois, quando dois fármacos atuam sobre diferentes etapas da reação enzimática obrigatória nas bactérias, o resultado de sua combinação é sinérgico. Na maioria dos países, a combinação é conhecida como cotrimoxazol, mas o trimetoprim está disponível no mercado isoladamente (Figuras 12 e 13).

A associação dos fármacos permite uma melhor ação no microrganismo do que quando administrados separados. A este fato chamamos de otimização da ação do antimicrobiano.

A ação destes antimicrobianos ocorre por inibição de duas etapas da via enzimática, para síntese do ácido tetraidrofólico: A inibição da incorporação do ácido *p*-aminobenzoico (PABA) no ácido fólico, pela sulfonamida, enquanto o trimetoprim impede a redução do diidrofolato em tetraidrofolato (folato – essencial para reações de transferência de carbono).

A toxicidade seletiva destes antimicrobianos se dá através de:

- Células de mamíferos que utilizam folatos pré-formados da dieta e não sintetizam o composto.
- Trimetoprim, que é um inibidor seletivo da diidrofolato redutase encontrada somente em organismos inferiores, logo, para este fármaco inibir a enzima redutase humana, é necessária uma quantidade 100 mil vezes maior da que é usada em bactérias.

Outras sulfas também são comercializadas, como, por exemplo: sulfadiazina, sulfacetina, sulfamoxol, sulfametoxipiridazina, sulfaleno, sulfatidina, nitrosulfatiazol, etc.

Na classe das sulfonas, temos como representante principal a dapsona (Figura 14). Esta família de fármacos possui o mesmo modo de ação das sulfas (inibição da incorporação do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) no ácido fólico).

As sulfas são ativas contra algumas espécies da família *Enterobacteriaceae*, *Chlamydia*, *Pneumocystis* e *Nocardia*. Enquanto a dapsona age com ação bacteriostática em *Mycobacterium leprae*.

Figura 12. Sulfametoxazol (sulfa)

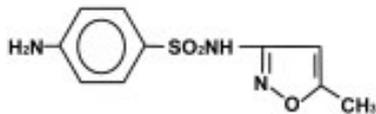


Figura 13. Trimetoprim

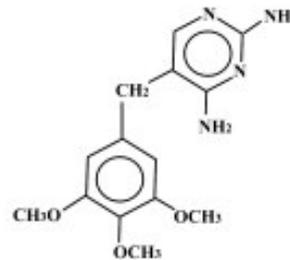
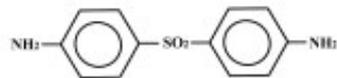


Figura 14. Dapsona (Sulfona)



10.2.2. Quinolonas

O ácido nalidíxico (Figura 15) é o membro mais antigo dessa classe de antimicrobianos sintéticos, sendo muito usado no tratamento de infecções do trato urinário. Este fármaco não possui grande importância, devido à sua limitação terapêutica e o desenvolvimento de resistência bacteriana. Por esse motivo, foi necessário adicionar, na molécula deste antimicrobiano, a 4-quinilona fluorada, dando origem a fluoquinolona. Representada pela ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, gatifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina e lomefloxacina. Este fato representou um grande avanço terapêutico, visto que as fluoquinolonas possuem uma ampla atividade antimicrobiana e grande eficácia.

cia após administração via oral no tratamento de diferentes infecções, causadas por microrganismos Gram-negativos (Figura 16).

A ação destes antimicrobianos se dá na DNA-girase (enzima responsável pela forma espiral do DNA) e na topoisomerase IV (enzima que separa moléculas-filhas de DNA interligadas (encadeadas), que são o produto da replicação do DNA) bacteriana.

As quinolonas possuem uma excelente toxicidade seletiva, pois só inibem a topoisomerase II das células eucarióticas em concentrações bastante elevadas (100 a 1.000 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 15. Ácido nalidixico (Quinolona)

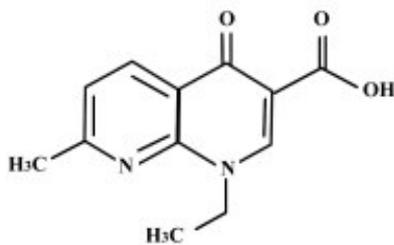
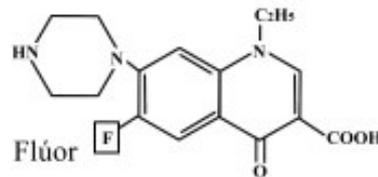


Figura 16. Norfloxacin (Fluoroquinolona)



10.2.3. Antissépticos

Em uma infecção do trato urinário, inibem o crescimento de muitas espécies bacterianas, porém não podem ser utilizados no tratamento de infecções sistêmicas, pois não se obtém concentração eficaz no plasma com a administração de doses seguras. Por se concentrarem nos túbulos renais, esses fármacos podem ser utilizados por via oral no tratamento de infecções urinárias.

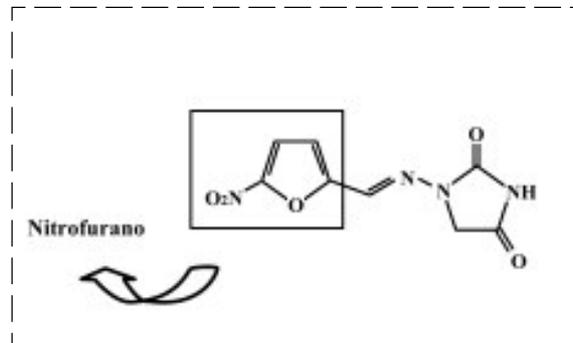
A nitrofurantoína (Figura 17), representante desta classe, é um nitrofurano sintético utilizado na prevenção e no tratamento de infecções urinárias. Inibe tanto bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas, devendo ser utilizado em microrganismos comprovadamente sensíveis a este fármaco.

O mecanismo de ação da nitrofurantoína se inicia quando as bactérias reduzem (metabolizam) o antimicrobiano, produzindo um produto que inibe várias enzimas, principalmente a acetil coenzima A (ciclo de Krebs), lesando o DNA bacteriano. Esta atividade é maior quando a urina está com pH (potencial de hidrogênio) ácido.

A nitrofurantoína pode ter ação bacteriostática ou bactericida dependendo da concentração utilizada (bactericida $\geq 100\mu\text{g/mL}$; bacteriostática $\leq 32\mu\text{g/mL}$).

As células de mamíferos não reduzem tão rapidamente a nitrofurantoína quanto às células bacterianas, logo, acredita-se que esta seja a atividade antimicrobiana seletiva deste fármaco.

Figura 17. Nitrofurantoína



10.2.4. Betalactâmicos

São antimicrobianos que possuem em sua molécula um anel β -lactâmico (Figura 18A), importantíssimo para sua atividade bactericida (ação que leva o microrganismo à morte).

- Penicilinas

Fazem parte de um dos grupos mais importantes entre os antimicrobianos (Figura 18B), possuem grande eficácia e estão entre os fármacos menos tóxicos, sendo amplamente usado em diferentes doenças infecciosas.

- Cefalosporinas

São antimicrobianos β -lactâmicos correlacionados diretamente com as penicilinas, tanto do ponto de vista estrutural como funcional, e possuem análogos estruturais, conhecidos por cefamicinas (cefalexina). A produção das cefalosporinas é semissintética (adição química de cadeias laterais - Figura 18C).

As cefalosporinas são classificadas em: primeira, segunda, terceira, quarta e quinta geração. Essa classificação foi criada levando-se em consideração os padrões de sensibilidade bacteriana e a resistência à β -lactamases (enzimas que conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas, monobactams e aztreonam). Estas enzimas foram denominadas ESBL – β -Lactamases de Espectro Ampliado – devido ao fato da maioria dessas enzimas serem codificadas por genes localizados em plasmídios, que geralmente carregam genes de resistências a outros antimicrobianos.

Os mecanismos de ação das penicilinas e cefalosporinas são:

- Inibição da transpeptidase (impedem que a última molécula de glicina se ligue ao quarto resíduo do pentapeptídeo, assim prejudicando a formação de peptidoglicana que compõe a parede celular).
- Evitam a formação do glicopeptídeo da parede celular, através de sua fixação nas proteínas de ligação da penicilina (PBP). Logo, não há alongação posterior da cadeia glicopeptídica.

De modo geral, podemos dizer que as cefalosporinas são inibidoras seletivas da síntese da parede celular bacteriana.

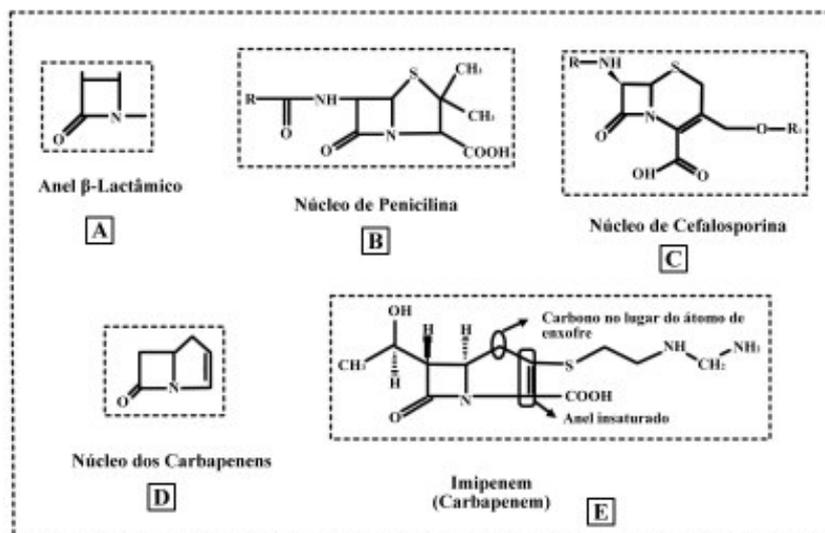
- Carbapenems

Esse grupo possui um anel β -lactâmico fundido a outro anel não β -lactâmico de cinco membros (Figura 18D), se diferenciando das penicilinas por terem o segundo anel insaturado e conter um átomo de carbono em lugar do átomo de enxofre. Esse antimicrobiano possui espectro de atividade mais amplo do que outros antibióticos β -lactâmicos.

Esta classe é representada pelo imipenem (Figura 18E), meropenem e ertapenem. Sua ação é se unir às proteínas de ligação da penicilina, interrompendo a síntese da parede celular bacteriana e provocando a morte dos microrganismos. É muito resistente à hidrólise pela maioria das β -lactamases.

No mercado, é comercializado em combinação com a cilastatina, um fármaco que inibe a degradação do imipenem por uma dipeptidase do tubular renal. Essa associação mostra-se eficaz no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas fermentadoras e não-fermentadoras, e anaeróbias.

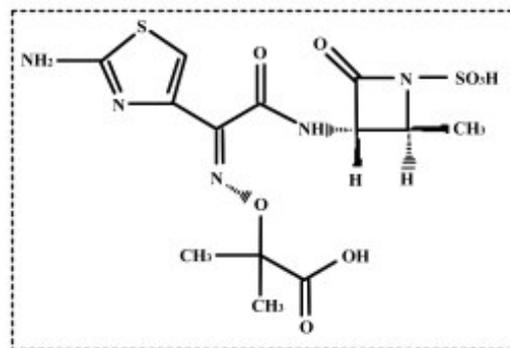
Figura 18. Betalactâmicos



- Monobactâmicos

Os representantes desta classe são o aztreonam (Figura 19), o carumonam, o tigemonam e o pirazmonam. Sendo o aztreonam um β -lactâmico isolado da bactéria *Chromobacterium violaceum*. Sua ação se dá pela interação com as proteínas ligadoras de penicilinas (PBP), interrompendo a síntese da parede celular. Possui ação contra bacilos Gram-negativos aeróbios.

Figura 19. Aztreonam (Monobactâmico).



10.2.5. Aminoglicosídeos e tetraciclina

Os aminoglicosídeos possuem aminoácidos ligados a um anel aminociclitol por ligações glicosídicas. Estes fármacos são utilizados primariamente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aeróbicas, em pacientes alérgicos a penicilina, além de tratarem infecções por *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Legionella pneumophila*. Por serem importantes drogas, amplamente utilizadas, a grave toxicidade dos aminoglicosídeos é uma das principais limitações de sua utilização. As toxidades mais comuns são a nefrotoxicidade e a ototoxicidade. Seus principais representantes são a estreptomicina (Figura 20), a neomicina, a gentamicina, a canamicina (Figura 21), a tobramicina, a amicacina e a netilmicina. Sendo estes dois últimos aminoglicosídeos sintéticos e os outros naturais.

Os antimicrobianos aminoglicosídeos caracterizam-se pelo efeito pós-antibiótico (persistência de uma atividade bactericida após a queda da concentração sérica). Agem inibindo a síntese de proteínas e reduzindo a fidelidade da tradução do mRNA no ribossomo. Apesar da rápida ação bactericida, essas substâncias não atuam sobre bactérias intracelulares, como o *Mycobacterium*, por exemplo.

As tetraciclina possuem quatro anéis fusionados com um sistema de duplas ligações conjugadas (Figura 22). Têm como representante desta classe a tetraciclina, a doxiciclina e a minociclina. Sua ação se dá pela ligação do fármaco com a subunidade 30S do ribossoma bacteriano, bloqueando o acesso do aminoacil-RNA ao complexo ribossoma RNAm, para, assim, inibir a síntese de proteína pelo microrganismo. São eficazes contra bactérias e outros microrganismos (*Corynebacterium acnes*, *Haemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*, *Rickettsia rickettsii*, *Aspergillus* spp., *Nocardia* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp., etc.).

Figura 20. Estreptomina.

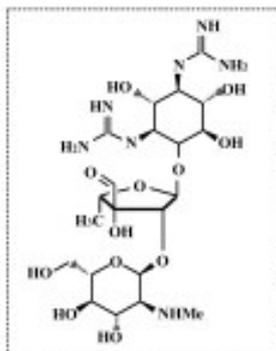


Figura 21. Canamicina.

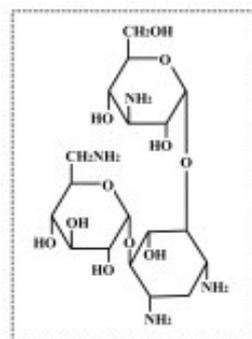
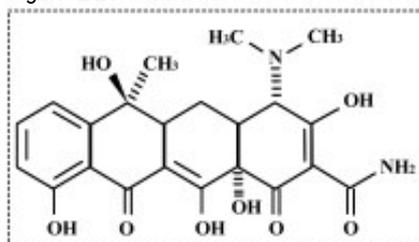


Figura 22. Tetraciclina.



10.2.6. Macrolídeos, lincosamidas e anfenicóis

Os macrolídeos são fármacos com estrutura lactônica macrolítica. Sendo a eritromicina o primeiro antimicrobiano a ter aplicação clínica, em indivíduos alérgicos aos β -lactâmicos. A claritromicina, forma metilada da eritromicina (Figura 23), e a azitromicina possuem determinadas características comuns e algumas particulares. A azitromicina possui um anel lactônico maior, o que a torna superior a eritromicina. No mercado, foi lançada também a diritromicina, que possui similaridade com a eritromicina em espectro antibacteriano, tendo como vantagem o uso da dose unitária diária.

As lincosamidas têm como representantes a lincomicina e a clindamicina. A clindamicina (Figura 24) é usada em tratamentos de infecções causadas por bactérias anaeróbias, como o *Bacteroides fragilis*. Também é muito eficaz em cocos Gram-positivos não enterocócicos.

Tanto os macrolídeos quanto as lincosamidas possuem o mesmo mecanismo de ação, fazendo ligação com a subunidade 50S do ribossoma bacteriano, que inibem a translocação de RNAt, permitindo o bloqueio da união de aminoácidos (AA) para a síntese de proteínas.

Os anfenicóis têm como principal representante o cloranfenicol (Figura 25). Este fármaco é usado em infecções causadas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas, por serem muito tóxicos, são usados somente em infecções graves para as quais não haja outro antimicrobiano. Sua ação se dá por inibir a fixação do RNAm aos ribossomos, ligando-se na subunidade 30S, além de impedir a união de aminoácidos na formação do polipeptídeo.

Figura 23. Claritomicina

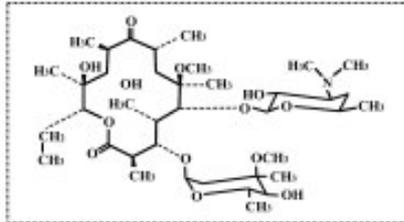


Figura 24. Clindamicina

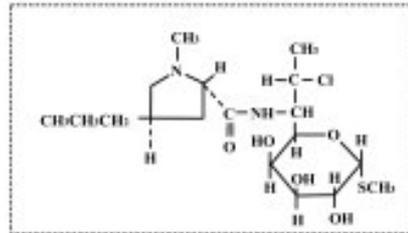
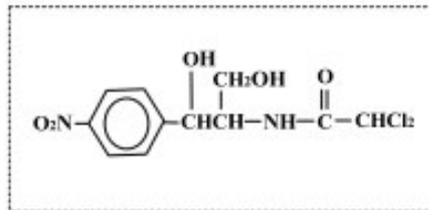


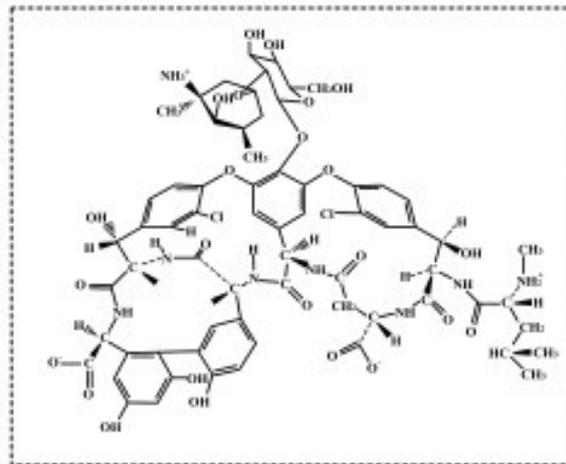
Figura 25. Cloranfenicol



10.2.7. Glicopeptídeos

Esta classe de antimicrobiano tem como principais representantes a vancomicina e teicoplanina. A vancomicina (Figura 26) é produzida pelo *Streptomyces orientalis*. Já a teicoplanina é produzida pelo *Actinoplanes teichomyceticus*. São muito utilizadas em infecções por bactérias Gram-positivas. Agem na inibição da síntese de parede celular por antagonizarem (interferência de uma substância na ação de outro composto) competitivamente a polimerização das cadeias de peptidoglicano.

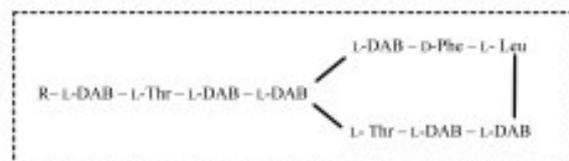
Figura 26. Vancomicina



10.2.8. Polimixinas

São antimicrobianos polipeptídicos (Figura 27) que possuem ação antimicrobiana por se ligarem a constituintes lipoproteicos da membrana plasmática, destruindo sua barreira osmótica seletiva. Estes fármacos agem em bactérias Gram-negativas (incluindo *Pseudomonas aeruginosa*), não possuindo atividade sobre bactérias Gram-positivas.

Figura 27. Polimixina.

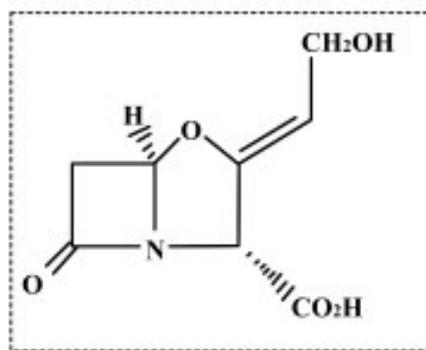


10.2.9. Inibidores da β -lactamase

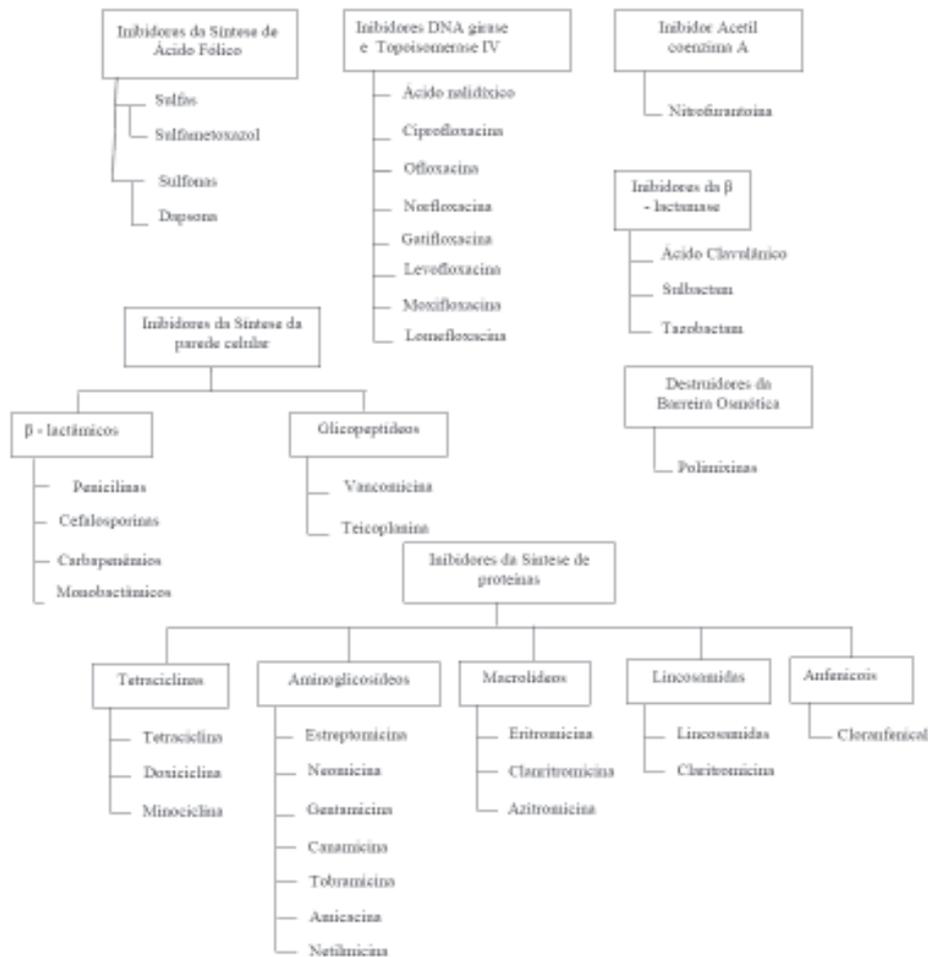
A lise do anel β -lactâmico, pode ocorrer por clivagem enzimática (por ação da enzima β -lactamase) ou por ácido, destruindo a atividade antimicrobiana.

Os fármacos que representam esta classe possuem um anel β -lactâmico, porém, destituídos da atividade antimicrobiana. São capazes de inibir a clivagem enzimática, impedindo, assim, a ação das β -lactamases e tornando-as inativas. Desta forma, estes antimicrobianos se tornam substratos para tais enzimas. No mercado estas substâncias encontram-se em formulações contendo derivados penicilínicos, que são protegidos pelos inibidores de β -lactamases. Esses inibidores são: ácido clavulânico (Figura 28), sulbactam e tazobactam.

Figura 28 – Ácido clavulânico



Como já dissemos, diversos são os antimicrobianos utilizados na terapia das infecções, e o seu uso consciente ainda é uma grande arma na batalha das infecções. Devemos, porém, evitar seu uso indiscriminado e, às vezes, desnecessário. A seguir montamos um pequeno resumo da ação dos antibióticos discutidos aqui:



11. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Em 1929, Alexander Fleming observou, por casualidade, que um fungo contaminante não só estava crescendo em uma placa de cultura que havia sido deixada aberta por descuido, como também as colônias de *Staphylococcus*, crescidas na placa próximas a este fungo, estavam morrendo. O pesquisador concluiu então que o *Penicillium notatum* (fungo que contaminou a placa)

produzia uma substância que inibia as bactérias - a substância que veio a ser conhecida como PENICILINA deu início à era dos antibióticos.

Apesar da descoberta e síntese de diferentes antimicrobianos e seu uso cotidiano hoje em dia, o que pode ocorrer é que, muitas vezes, o microorganismo que está causando determinada infecção é resistente ao antimicrobiano prescrito, tornando a terapia inadequada.

A partir dos estudos de Fleming, vários métodos foram criados para testar se os microorganismos isolados de uma doença são ou não sensíveis ao tratamento com determinado antimicrobiano.

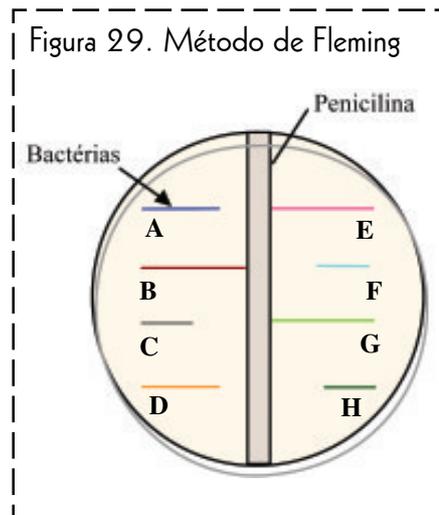
a) Método de Fleming da escavação em valeta (Figura 29)

Remove-se uma tira de ágar, de modo a formar uma valeta na placa, e coloca-se nela um meio de cultura contendo extratos de fungos (penicilina). A seguir, inocula-se os organismos em estudo em forma de estrias múltiplas perpendiculares ao sulco (A, B, C, D, E, F, G, H).

- Este foi um dos primeiros testes a serem processados, porém, só se testava um antimicrobiano; nenhum tipo de padronização ou determinação de concentração.

b) Foster & Woodruff (1943)

Comunicaram pela primeira vez o uso de tiras de filtro impregnadas com uma solução de antibióticos.



- Assim, poderia ser testado mais de um antibiótico para cada microrganismo isolado.

c) Vicent & Vicent (1944)

Introduziram os discos de papel, aumentando ainda mais o número de antibióticos.

d) Morely (1945)

Demonstrou que os discos de papel com solução antibiótica podiam ser secos e posteriormente utilizados sem perder sua atividade.

Na atualidade, utilizamos basicamente dois métodos, cada um com seus pontos, positivos e negativos:

• **Métodos usados para a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos:**

- **Testes de diluição** – Fornecem uma estimativa quantitativa da suscetibilidade ao antibiótico. São utilizadas diferentes concentrações do antibiótico em caldo.
- **Testes de difusão** – Envolvem o cultivo dos organismos em uma placa com ágar e a aplicação de discos de papel de filtro contendo os antibióticos.

• **Siglas usadas no teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA):**

- **Concentração inibitória mínima (CIM)** – Menor concentração de antibiótico em $\mu\text{g/mL}$ que inibe o crescimento *in vitro* das bactérias (ação bacteriostática).
- **Concentração bactericida mínima (CBM)** – Menor concentração de antibiótico em $\mu\text{g/mL}$ que mata a bactéria em estudo (ação bactericida).

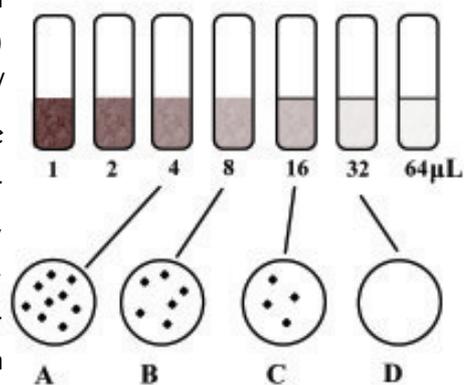
11.1. Provas de sensibilidade por diluição em caldo

11.1.1. Teste da macrodiluição em tubos

Uma das primeiras técnicas utilizadas para a avaliação da sensibilidade dos antimicrobianos, e que até hoje tem utilidade, é o teste que envolve a preparação de diluições seriadas e logarítmicas (\log_2) de antimicrobianos (ex: 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$) em um meio de cultura líquido (com volume final de 1 a 2 mL por tubo), semeado com a bactéria teste.

Os tubos contendo antimicrobianos, após inoculação com uma suspensão bacteriana padronizada em torno de 5×10^5 UFC/mL (UFC – Unidade Formadora de Colônia), passarão por um período de incubação de 16 a 20 horas, a $35^\circ\text{C} \pm 2$, dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado. Passado este tempo, os tubos deverão ser observados para se visualizar o crescimento bacteriano (presença de turbidez). Um tubo límpido demonstrará que não houve crescimento bacteriano, e o primeiro tubo da série com esta característica representa a CIM, ou seja, a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (Figura 30).

Figura 30. Teste de macrodiluição em tubo – A figura ao lado mostra que a concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano testado é de 16 $\mu\text{g/mL}$. Após as diluições de 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/mL}$ serem inoculadas em placas, respectivamente com as letras A, B, C e D, e incubadas por 16 horas, foi observado que não houve crescimento bacteriano na placa D. Logo, a concentração bactericida mínima (CBM) é de 32 $\mu\text{g/mL}$.



Vantagens:

- Determinação de resultado quantitativo, a CIM.

Desvantagens:

- A quantidade de reagentes utilizada.
- O espaço necessário para o armazenamento dos tubos.
- A possibilidade da ocorrência de erros durante a preparação das concentrações antimicrobianas.
- O trabalho manual dispendioso na preparação do teste.

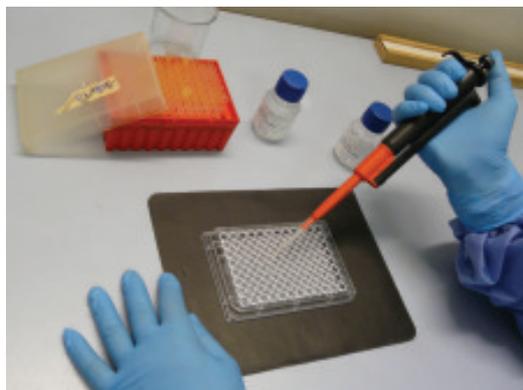
11.1.2. Teste da Microdiluição em caldo

Esta técnica corresponde à miniaturização da técnica de macrodiluição em tubos.

Em vez de se utilizar vários tubos com meio de cultura e antimicrobianos, usamos microdiluição em caldo, que são inoculados em placas plásticas estéreis, com 96 cavidades e fundo em forma de “U”, para melhor visualização do crescimento bacteriano.

Na placa de microdiluição, pode ser colocado um número variado de até 12 antimicrobianos, em diferentes concentrações (4 a 8 diluições logarítmicas). As placas podem conter o antimicrobiano liofilizado ou congelado, ou o próprio operador deverá realizar a distribuição. Tanto os antimicrobianos como as bactérias a serem testadas são inoculadas com o auxílio de uma micropipeta (Figura 31), com o propósito de se obter uma concentração bacteriana final de aproximadamente $5 \times 10^4 - 10^5$ UFC/mL por poço. Os painéis de microdiluição devem ser incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 16 a 20 horas (dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado). Após esse tempo, a leitura da placa será realizada visualmente e, de preferência, com luminosidade ambiente, para facilitar a leitura.

Figura 31. Microdiluição em caldo



Vantagens:

- A economia de espaço e de reagentes.
- A possibilidade de preparar uma grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições de antimicrobianos.
- A geração de um resultado quantitativo (CIM).
- Utilização de placas pré-fabricadas e sistemas computadorizados, fornecidos pelos fabricantes.

Em alguns sistemas atuais automatizados é permitido que se faça a identificação da espécie bacteriana paralelamente com o teste de sensibilidade, pela incorporação de provas bioquímicas às placas de microdiluição.

Desvantagens:

- A inflexibilidade na escolha dos antimicrobianos a serem testados, quando se utilizam as placas pré-fabricadas.
- O custo de cada placa de microdiluição.

11.2. Prova de sensibilidade com discos de papel em meio sólido

11.2.1. Método de Anderson

A partir deste método, iniciou-se a ideia de “standartizar” (padronizar) os métodos, permitindo a reprodutibilidade dos testes.

Este método é realizado dispensando-se os discos de antimicrobianos sobre a placa e seguindo algumas recomendações:

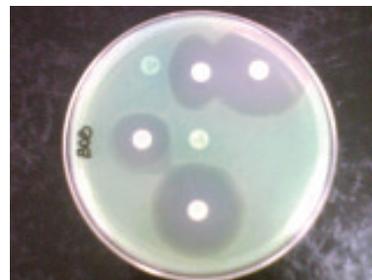
- Padronização dos discos com antibiótico - Utilizou-se um único disco com antibiótico em concentração conhecida.
- Padronização do meio - Ágar tripticase soja.
- Padronização do inóculo - Concentração de 10^8 organismos/mL.
- Padronização do tempo de incubação – 18 horas.
- Medição do diâmetro das zonas de inibição – Através de paquímetro ou régua milimezeada padronizada. Os resultados são interpretados de acordo com uma tabela de conversão.

11.2.2. Prova de Bauer-Kirby

Com a mesma normatização para padronização que o anterior. Este método serviu de base para a maioria das padronizações atualmente adotadas por organismos internacionais.

- Com uma alça microbiológica, tocar a superfície de quatro a cinco colônias bacterianas de uma cultura pura, isoladas em um meio de ágar.

Figura 32. TSA em placa



- Transferir este inóculo para um tubo contendo 4 a 5 mL de salina, para obter turvação equivalente ao do padrão 0,5 de Mac Farland. (escala de turvação correspondente ao crescimento bacteriano em caldo).
- Inocular o caldo com auxílio de um *swab* estéril, em placa de ágar Müller-Hinton. Recomenda-se estriar o inóculo por induto contínuo (semeadura próxima e contínua), em pelo menos três direções.
- Esperar pelo menos de 5 a 15 minutos para a secagem do ágar, antes da colocação dos discos com os antibióticos, que deverão ter uma distância mínima, para que não haja dificuldade na leitura posterior dos halos.
- Incubar a 37°C por 24 horas.
- Medição do diâmetro das zonas de inibição com régua milimetrada e os resultados interpretados de acordo com uma tabela de conversão.
- Paralelamente, usam-se organismos-padrão, como o *S.aureus* (ATCC 25923), o *E.coli* (ATCC 25922) e o *P.aeruginosa* (ATCC 27853).

Como, atualmente, existem diversas padronizações baseadas nesta prova, é importante comentar que várias modificações foram implementadas para melhoria da qualidade do teste, mas que vários parâmetros ainda são usados.

Considerando a técnica e o que sabemos hoje, reforçamos que a aplicação do inóculo bacteriano é realizada com aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. As placas são incubadas por 16 a 24 horas, podendo ser mantidas a 5% de CO₂ a 35 ± 2°C (dependendo do gênero bacteriano e do antimicrobiano testado). Os diâmetros dos **halos de inibição** do crescimento bacteriano ao redor de cada disco, medidos em milímetros, são relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar.

Atualmente, os **resultados** do teste de disco-difusão são interpretados comparando o valor do halo de inibição com os critérios publicados pelo CLSI

(*Clinical and Laboratory Standards Institute*), que a cada ano atualiza suas edições. Desta maneira, as amostras bacterianas são categorizadas em sensíveis (S), resistentes (R) ou intermediárias (I).

Vantagens do método de disco-difusão em ágar:

- Execução fácil.
- Reprodutibilidade.
- Utilização de reagentes de baixo custo.
- Resultados de fácil interpretação.
- Flexibilidade de escolha dos antimicrobianos e sem exigências especiais para leitura e interpretação.

Limitações:

Este método não é aplicável a microrganismos de crescimento lento. Se for necessária uma incubação prolongada para alcançar o crescimento suficiente e obter uma zona de inibição detectável, o antibiótico pode deteriorar a ponto de fornecer leituras imprecisas. Também é inadequado em antibióticos que se difundem lentamente em ágar, tais como a polimixina B.

O método de Bauer-Kirby não é útil na determinação de sensibilidade dos anaeróbios, pois estes possuem crescimento lento, tornando difícil estabelecer esquemas interpretativos confiáveis.

Muitos antimicrobianos são ativos contra os anaeróbios (ampicilina-sulbactam, cloranfenicol, imipenem e ticarcilina-clavulanato), apesar disso, outros podem não ter a mesma atividade, sendo interessante realizar o TSA (Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos) concomitantemente com o início do tratamento.

11.2.3. Fatores importantes que influenciam no resultado da prova de sensibilidade em placa por difusão

Numa prova de sensibilidade por difusão com disco, a velocidade de difusão de uma droga no ágar e o tamanho da zona de inibição do crescimento depende de vários fatores associados ao meio:

- **Concentração do ágar** - 1,5% a 2,0% de ágar é adequado para as exigências técnicas da prova e permite a livre difusão da droga no meio.
- **pH** - Alteram a zona de inibição. Para a medida de controle de qualidade, o pH de cada lote do Müller-Hinton deve ser determinado, devendo estar entre 7,2 e 7,4. A incubação da prova não deve ser realizada sob concentrações elevadas de CO₂ e os carboidratos fermentáveis não devem ser adicionados.
- **Concentrações de íons no ágar** - Concentrações de cátions Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ alteradas influenciam na prova de sensibilidade da *P. aeruginosa* diante de aminoglicosídeos. Recomenda-se o ajuste da concentração final de Mg⁺⁺ para 25 a 30 mg/L e Ca⁺⁺ para 50 a 100 mg/L de caldo Müller-Hinton para obter valores próximos dos níveis fisiológicos *in vivo*.
- **Características nutritivas** - Resultados insatisfatórios podem ocorrer, em meios contendo altas concentrações de timidina usando trimetoprim ou combinações de trimetoprim e sulfametoxazol. Pode ser adicionado ao meio de Müller-Hinton timidina fosfocilase, para inativar a timidina presente neste meio. ○ importante é observar se pode haver alteração no crescimento dos microrganismos.
- **Altura da camada do ágar depositado na placa de Petri** - ○ meio deve alcançar uma espessura de 4 mm. Em meios com espessura menor que esta, os antibióticos tendem a difundir mais em direção lateral, aumentando o tamanho das zonas de inibição. ○ inverso também pode ocorrer.

11.2.4. Outros fatores importantes que devem ser considerados

- **Inóculo** - Controlar a concentração bacteriana para não produzir variações diárias no tamanho das zonas de inibição dos organismos. Quando a concentração é muito baixa, torna-se necessário um período maior para as células proliferantes formarem uma massa suficientemente grande para resistirem ao efeito do antibiótico na borda da zona de inibição. Períodos prolongados resultam em uma zona de inibição grande e inóculo denso, além de fornecer zonas falsamente pequenas.
- **Temperatura** - Os diâmetros das zonas de inibição aumentam à medida que a temperatura de incubação sofre uma elevação dentro da faixa fisiológica. Isso acontece devido a uma diminuição da viscosidade do ágar e um aumento intrínseco da sensibilidade dos microrganismos a certos antibióticos.
- **Discos com antibióticos** - Os discos devem ser colocados a aproximadamente 20 mm um do outro e 15 mm da parede da placa, para evitar que as zonas de inibição de crescimento se sobreponham ou se estendam até a margem do ágar.

11.2.5. Realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco-difusão na atualidade

Método de suspensão direta da colônia:

- Inicialmente, a cultura deverá ter um crescimento de no mínimo 24 horas e as bactérias devem estar isoladas.
- Com o auxílio da alça bacteriológica, transferir 3 a 4 colônias com a mesma morfologia e inoculá-las em 3 a 4 mL de caldo de *Trypticase Soy Broth* (TSB), solução fisiológica a 0,9%, ou caldo de Müller-Hinton.
- Comparar o inóculo com tubo 0,5 da escala de McFarland.

Observação: Para obter o inóculo desejado, incubar o *Trypticase Soy Broth* (TSB) ou o caldo Müller-Hinton $35 \pm 2^\circ\text{C}$ até a turbidez da cultura no caldo atingir 0,5 da escala de McFarland, o que geralmente ocorre entre 2 a 6 horas.

Inoculação da placa

- Dentro de 15 minutos após o ajuste do inóculo, proceder à semeadura, introduzindo um *swab* estéril na suspensão bacteriana, ajustada a 0,5 da escala de McFarland. Comprimir o *swab* contra a parede interna do tubo para retirar o excesso do inóculo e semear a superfície do ágar em três direções diferentes.

- Deixar a placa semeada secar por 5 minutos à temperatura ambiente, para que o inóculo seja completamente absorvido pelo ágar antes de aplicar os discos. Não ultrapassar o período de 15 minutos entre a semeadura e a colocação dos discos. Caso o disco seja colocado com a placa ainda muito molhada, poderá ocorrer o deslizamento deste no Ágar (Figura 33).

Figura 33. A seta mostra a deformação na zona de inibição do disco, causada pelo deslizamento do disco no meio



Aplicação dos discos

- Placas de 150 mm: colocar no máximo 12 discos.
- Placas de 90 mm: colocar 5 discos.
- Para alguns microrganismos, como, por exemplo, *Haemophilus* spp., *Streptococcus* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, colocar no máximo 9

discos nas placas de 150 mm, pois o diâmetro dos halos de alguns antibióticos pode ser muito grande.

- Somente retirar os discos da geladeira ou do congelador uma a duas horas antes da sua utilização.
- Após a colocação dos discos, pressionar levemente, com um auxílio de uma pinça, a superfície de cada disco.
- Não remover do lugar o disco que já foi colocado (ou caiu) no ágar, pois a difusão da droga é imediata.

Incubação das Placas

- Incubar as placas invertidas no máximo 15 minutos após a colocação dos discos.
- A temperatura máxima da estufa deve ser $35 \pm 2^\circ\text{C}$.
- O tempo de incubação deve ser de 16 a 18 horas, com exceção da avaliação da sensibilidade à oxacilina, à vancomicina para *Staphylococcus* spp., e à vancomicina para *Enterococcus* spp., que deve ser de 24 horas.
- As bactérias são incubadas em estufa aeróbia, com exceção de alguns microrganismos que precisam de uma atmosfera de 5% CO_2 .

Leitura das placas

- Após o período de incubação, realizar a leitura das placas pelo fundo da placa.
- No ágar Müller-Hinton sangue, abrir a placa e ler, com o auxílio de uma régua ou halômetro, o mais próximo possível do crescimento, utilizando uma fonte de luz sobre a placa.
- A leitura de oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus* spp., e da vancomicina para *Enterococcus* spp., deve ser feita com auxílio

de uma fonte de luz. Quando há colônias pequenas dentro dos halos, estas devem ser verificadas antes de ser liberadas como cepas resistentes a estes antimicrobianos, pois podem ser clones resistentes ou contaminação.

- Considere os halos de inibição a partir do ponto onde não se observa o crescimento bacteriano a olho nu.

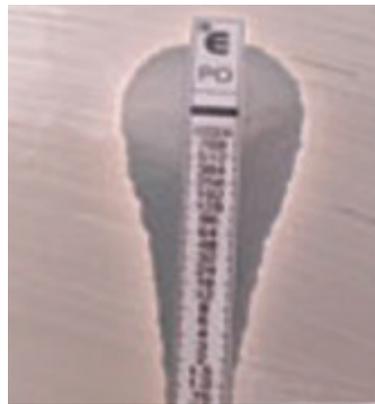
Interpretação dos Resultados

- Os halos de inibição para cada antimicrobiano testado devem ser interpretados, de acordo com as categorias do CLSI, em sensível, intermediário ou resistente.

11.2.6 - E-Test

○ E-test é uma fita plástica que se encontra disponível no mercado. Ela é impregnada por concentrações crescentes de antimicrobiano na face ventral e marcada, na face dorsal, com a escala das concentrações testadas, a fim de facilitar a leitura do resultado. A base deste teste está fundamentada no gradiente de difusão do antimicrobiano existente na fita no ágar, determinando, assim, a sensibilidade da amostra bacteriana ao antimicrobiano testado (Figura 34). ○ preparo do inóculo desta técnica é o mesmo para o teste de disco difusão.

Figura 34. Gradiente de sensibilidade do E-Test.



Vantagens

- A flexibilidade na escolha dos agentes antimicrobianos a serem testados.
- A fácil execução e o fornecimento de um resultado quantitativo (CIM).

Desvantagens

- ○ alto custo das fitas.
- ○ número limitado de antibióticos testados por placa.

Resultados atípicos

- Organismos móveis podem produzir crescimento invasivo quando cultivados em superfícies de ágar, formando um véu fino que penetra nas zonas de inibição ao redor dos discos. Esta zona de invasão deve ser ignorada, devendo-se medir a borda externa (ex. *Proteus*).
- A presença de colônias definidas dentro da zona de inibição não representa invasão. Estas colônias podem representar mutantes mais resistentes ao antibiótico do que a maior parte da cepa, onde esta não é pura e as colônias separadas são de uma espécie diferente.
- Pode ocorrer dificuldade da leitura dos diâmetros quando existe uma superposição de zonas de inibição ou quando estas se estendem para além da borda do ágar.
- Se uma placa é deficientemente inoculada e as estrias são irregulares, deixando espaços entre as áreas de crescimento e tornando as bordas das zonas de inibição não nítidas, elas não devem ser lidas.

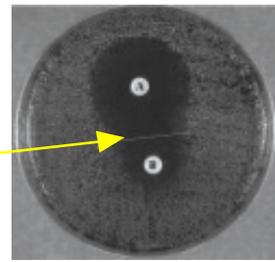
11.3. Combinações de agentes antibacterianos

Muitas vezes, dois antimicrobianos podem ter uma combinação interessante ou desinteressante *in vivo* ou *in vitro*. É importante o conhecimento deste fato, pois, no caso do antibiograma, dois agentes sinérgicos ou antagonísticos entre si podem dificultar a leitura dos halos de inibição. O mesmo pode ocorrer *in vivo*, quando tratamos o paciente com antimicrobianos diferentes.

SINERGISMO - Os antimicrobianos tornam-se mais eficazes do que quando utilizados em separado - aumento dos efeitos individuais (Figura 35).

Reparem o aumento da espessura do halo

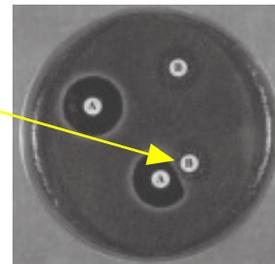
Figura 35. Sinergismo



ANTAGONISMO - Menos efetivos do que quando usados individualmente. Um pode prejudicar o efeito do outro (Figura 36).

Observem a inibição da sensibilidade próximo ao antimicrobiano B

Figura 36. Antagonismo



11.4. Controle de qualidade dos testes

O TSA, assim como toda técnica realizada em laboratório, deverá seguir padrões de controle da sua qualidade, permitindo a confiança nos resultados obtidos. No caso do antibiograma, são utilizadas periodicamente cepas padrão, com sensibilidade e/ou resistência conhecidas, que semeamos

seguindo as normas já determinadas para esse ensaio. O resultado da leitura é obtido após a incubação necessária e comparado com uma tabela padronizada para este fim. Qualquer modificação do resultado esperado significa uma não conformidade no teste.

As cepas padrão para controle da qualidade de discos para TSA por difusão em ágar são: *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923 e *P.aeruginosa* ATCC 27853.

As cepas controle para testes com anaeróbios são: *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *C.perfringens* ATCC 13124 e *Eubacterium lentum* ATCC 43055.

12. Genética bacteriana

O conjunto das características de todos os seres que conhecemos é influenciado por dados hereditários através dos genes. A informação genética, na maioria dos organismos, é armazenada na forma de sequência de bases nitrogenadas, chamada de DNA (ácido desoxiribonucleico). Ocasionalmente, organismos como os vírus podem armazenar as informações da forma de RNA, isso será tratado no capítulo 2 deste volume.

Quando pensamos em evolução e genética, temos pensar em diversidade, já que esta é uma condição prévia para a evolução. Estudaremos, neste capítulo, as bases deste processo, já que a mutação e a recombinação de genes aumentam a diversidade dos organismos e a seleção natural permite a manutenção dos mais bem adaptados a determinados ambientes.

12.1. Genótipo e fenótipo

O genótipo de um organismo é determinado pelo seu arcabouço genético (informações genéticas) que não necessariamente estão ou estarão todas expressas. O fenótipo, todavia, é a sua manifestação, ou seja, as propriedades

genéticas que podem ser evidenciadas naquele momento. Em outras palavras, o genótipo é a coleção dos genes e o fenótipo baseia-se direta ou indiretamente nas proteínas que foram formadas. A informação genética do DNA é transcrita em mRNA, permitindo sua tradução em proteínas, que vão gerar o que anteriormente chamamos de fenótipo.

12.2. Genes e reprodução

Os organismos procariontes (com fitas duplas de DNA), na sua maioria, possuem os dados genéticos codificados no cromossoma (disperso no citoplasma). Sendo que aproximadamente 90% destes genomas consistem em uma única molécula de DNA circular bastante torcida e espiralada, que ocupa quase 10% do volume celular. Algumas poucas exceções, como já comentado, podem ocorrer em algumas bactérias, como, por exemplo, *Brucella* e *Burkholderia*, que podem possuir mais de uma molécula de DNA, ou então *Streptomyces coelicolor* que apresenta o cromossoma em forma linear. Além disso, muitas bactérias poderão possuir genes adicionais em plasmídeos (tópico 1), que podem apresentar mais de 30 cópias em uma única célula bacteriana. Outro dado interessante é a variação do tamanho do cromossoma bacteriano, que pode conter de 580 kbp até mais de 5220 kbp, enquanto o DNA plasmidial tem no máximo uns 100 kbp.

As informações contidas nos plasmídeos, apesar de não serem essenciais ao crescimento bacteriano, podem ser extremamente importantes para o sucesso do espécime, podendo mediar desde resistência antimicrobiana até as próprias informações que possibilitam a transferência, aquisição e rearranjo de DNA entre bactérias.

A replicação do DNA possibilita o fluxo de informações genéticas para as novas gerações. Geralmente, os organismos bacterianos reproduzem-se assexuadamente por divisão binária transversa. Inicialmente ocorre a replicação do cromossomo, que se inicia em determinado ponto, prosseguindo em ambas

as direções (replicação bidirecional). No processo, as duas fitas de DNA original são separadas e usadas como modelo para a síntese de novas fitas (replicação semiconservativa). Os nucleotídeos livres presentes no citoplasma são pareados com as bases expostas do DNA de fita simples, seguindo sempre a ordem da adenina se ligando a timina e da guanina se ligando à citosina. Todo este processo, inclusive de correção, caso uma base errada seja encaixada, é mediado por enzimas, incluindo a do DNA polimerase, que age “colando” às bases correspondentes. O ponto em que a replicação ocorre é chamado de “forquilha de replicação” e, já que a replicação é bidirecional, teremos nos cromossomos circulares duas forquilhas ocorrendo ao mesmo tempo.

Logo após o princípio da replicação, inicia-se o desenvolvimento de uma invaginação na membrana plasmática e na parede celular (mesossoma), que posteriormente dividirá a bactéria original em duas novas células. Quando a nova parede formada não se separa completamente em duas paredes, pode-se formar uma cadeia (ou filamento) de bactérias. A fissão binária não é o único método reprodutivo entre as bactérias, mas outras formas são menos comuns: O gênero *Streptomyces* pode produzir vários esporos reprodutivos ao mesmo tempo, cada um originando um novo indivíduo; bactérias filamentosas do gênero *Nocardia* podem aumentar seu filamento e fragmentá-lo em pequenas células bacilares ou cocoides; espécies do gênero *Hyphomicrobium* podem reproduzir-se por brotamento.

12.3. Mutações

Como comentamos no início deste tópico, os mecanismos que levam às mutações genéticas são de grande importância evolutiva, aumentando a diversidade dos organismos. A mutação nada mais é que uma alteração na sequência de bases nitrogenadas do DNA, modificando o produto codificado. Essas mutações ocorrem espontaneamente ou são induzidas com a presença de um

agente mutagênico (radiação ou agentes químicos). Muitas das mutações que ocorrem acabam não causando nenhuma modificação e são chamadas de neutras. Outras, porém, poderão ser desvantajosas ou benéficas, dependendo do produto gerado.

Pares de bases do DNA podem ser deletados ou adicionados ao DNA, causando uma mutação chamada de “troca de fase de leitura”. Outro tipo de mutação é aquela que acaba por causar a substituição de um aminoácido ou que cria um códon de finalização, já que um par de bases pode ser substituído por outro diferente. É claro que várias enzimas trabalham na reparação do DNA alterado, mas, apesar da eficiência destes sistemas, os erros, embora raros, na replicação natural existem e podem ser aumentados por exposição a agentes mutagênicos em até mil vezes. Esses agentes podem ser utilizados em engenharia genética para fins comerciais. Um exemplo clássico pode ser evidenciado através das mutações induzidas pela exposição do fungo *Penicillium* (produtor de penicilina) aos mutagênicos, resultando numa variante produtora de quantidades mil vezes maiores de penicilina que o fungo original.

12.4. Recombinação genética

Além destas possibilidades, direcionadas ou não, algumas bactérias podem realizar troca de informações genéticas. Tal recombinação genética pode ocorrer por conjugação, transformação ou transdução.

Na **conjugação**, duas bactérias geneticamente diferentes trocam DNA diretamente, ou seja, é necessário o contato entre os dois organismos, o que implica a transferência de DNA plasmidial. A bactéria *Escherichia coli* tem servido de modelo para estudar esse fenômeno, já que possui linhagens F- e F+. As células F+ possuem pili e contêm um plasmídeo conhecido como fator F (fertilidade). Quando uma célula F+ entra em contato com uma célula F-, os pili organizam um tubo de conjugação oco (Pili sexual ou pili F), que

conecta a célula F⁺ à célula F⁻, permitindo que o DNA migre de uma bactéria para outra.

Na **transformação**, a célula bacteriana incorpora fragmentos de DNA livres, em “solução”, geralmente liberados por outra bactéria que se rompeu. Este mecanismo tem sido usado experimentalmente para mostrar que os genes podem ser transferidos de uma bactéria para outra e que o DNA é a base química da hereditariedade. Para que isso ocorra, a célula precisa estar “competente” para assimilar o DNA livre, e isso ocorre não só devido ao ambiente, mas a uma série de fatores fisiológicos da própria célula que induzem esse processo. Esse processo foi demonstrado pela primeira vez em *Streptococcus pneumoniae*, mas não ocorre naturalmente em muitos gêneros bacterianos.

Na **transdução**, genes bacterianos são carregados de uma bactéria para outra, dentro de um bacteriófago (vírus que possui como alvo um organismo bacteriano). Quando o bacteriófago entra numa célula bacteriana, o DNA do vírus mistura-se com uma parte do DNA hospedeiro, de modo que o vírus ao sair da célula passe a carregar parte do DNA bacteriano. Se o vírus infecta uma segunda bactéria, o DNA da primeira pode incorporar-se com o DNA da segunda. Esta nova informação genética é então replicada a cada nova divisão (ver vírus líticos e lisogênicos, no capítulo 2 deste volume). A transdução pode ser especializada (onde ocorre a transferência de genes específicos) ou generalizada (onde qualquer gene pode ser transferido).

Além das formas de recombinação descritas, outros mecanismos podem levar a alterações genéticas, como os plasmídeos, já estudados anteriormente (item 3.2.4), e os transposons, também chamados de “genes saltadores”.

Os transposons são pequenos segmentos de DNA, que podem se deslocar em baixa frequência, para diferentes posições dentro do genoma de uma única célula, ou mesmo para um plasmídeo num processo chamado transposição. Neste processo, há um intercâmbio de material genético, podendo causar mutações e modificar a quantidade de DNA no genoma. Eles foram

descobertos por Barbara McClintock (Nobel em 1983). Como são capazes de se transportar para plasmídeos, podem também ser levados a outras células ou vírus, sendo considerados hoje como potenciais mediadores da evolução entre organismos.

Todos estes conhecimentos atuais sobre a genética de procariotos levou a Bacteriologia e toda a Microbiologia a um patamar mais alto. Devemos lembrar que vários dos alimentos que consumimos são produzidos por microrganismos, bem como antibióticos, diferentes substâncias químicas e enzimas utilizadas em processos industriais. Na atualidade, técnicas de Biotecnologia propiciam, através do DNA recombinante, que uma bactéria *Escherichia coli* seja capaz de produzir interferon gama, uma proteína humana usada na medicina. Outros avanços estão ligados ao diagnóstico molecular de várias doenças, como a técnica da PCR e vários outros processos comentados no capítulo 2 do volume 3, desta coleção.

13. Mecanismos de patogenicidade e defesa bacteriana

A capacidade que tem um agente infeccioso tem de, uma vez instalado no organismo do homem e de outros animais, produzir sintomas em maior ou menor proporção, chama-se **patogenicidade**. Portanto, microrganismos **patogênicos** são aqueles capazes de causar enfermidades em condições apropriadas. O grau de patogenicidade dentro de um determinado gênero ou espécie é chamado de **virulência**. A virulência não está atribuída a um único fator, e sim, dependerá de vários fatores relacionados com o microrganismo, ao hospedeiro e à interação entre os dois. A virulência envolve duas características de um microrganismo patogênico: **infecciosidade** (capacidade de poder iniciar uma infecção) e a **gravidade** de condição da infecção. Podemos caracterizar as cepas em: com alto grau de virulência, com médio grau de virulência ou sem virulência (avirulentas), dentro de um gênero ou espécies de microrganismos que na maioria das vezes são considerados patogênicos.

13.1. Como se inicia a patogenicidade?

Para se estabelecer um processo infeccioso, o microrganismo deverá penetrar no hospedeiro e iniciar uma infecção. A capacidade do microrganismo de se aderir e sobreviver nas superfícies das mucosas do hospedeiro leva ao primeiro contato. A união dos microrganismos em superfícies epiteliais, muitas das vezes não invade os tecidos mais profundos. Nesses casos, uma ou mais toxinas produzidas pelo patógeno são responsáveis pela patologia. Os microrganismos aderem às células das mucosas epiteliais e em seguida atravessam esta barreira, posteriormente à multiplicação em tecidos subepiteliais, causando a destruição dos tecidos. Há organismos altamente invasivos que podem aderir e atravessar a superfície epitelial, multiplicando-se e invadindo tecidos mais profundos, podendo eventualmente chegar à corrente sanguínea e causar infecção generalizada. Existem bactérias que se aderem, invadem, multiplicam-se, e se adaptam para continuarem no hospedeiro, mas normalmente dentro das células do sistema reticuloendotelial.

Ex.: Micobactérias.

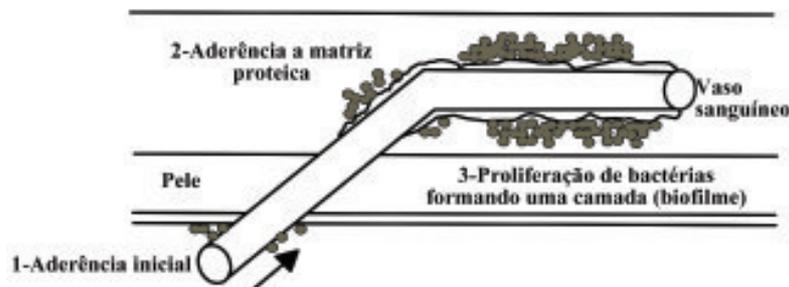
Há algumas bactérias que são específicas, pois infectam um determinado tipo de tecido. O *Streptococcus pneumoniae*, por exemplo, pode habitar a garganta e a nasofaringe, mas quando causa doença, infecta preferencialmente o trato respiratório inferior. A afinidade tecidual pode estar relacionada com a presença de receptores específicos para aderência bacteriana ou à presença de nutrientes. Temos como exemplo da dependência nutricional, a *Brucella abortus*, que causa abortos contagiosos no gado. Esta bactéria necessita do álcool-açúcar eritritol, que está presente em elevadas concentrações nos tecidos uterinos e placentários bovinos, logo, esse microrganismo poderá habitar o trato genital bovino devido a essa preferência nutricional.

13.2. Fatores de virulência

13.2.1. Adesão

Capacidade das bactérias de se fixar nas células e tecidos do organismo. A adesão se dá pela presença de estruturas da superfície da célula bacteriana, definida como adesinas. As adesinas funcionam quando interagem com os receptores que existem no organismo. Estes receptores se localizam na superfície da célula ou são proteínas da matriz extracelular. As adesinas bacterianas incluem fímbrias, componentes da cápsula, ácidos lipoteicoicos (item 3 deste capítulo) das bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, ou outro antígeno de superfície celular.

As bactérias podem se aderir, por exemplo, a superfícies de vasos sanguíneos ou a diferentes dispositivos plásticos usados em medicina, onde formam os chamados **biofilmes**. Estes são microcolônias ou agregados bacterianos que são envolvidos por uma película de exopolissacarídeos produzida pela bactéria que se forma na superfície dos dispositivos plásticos, quando colocados no organismo. Funcionam como uma fonte permanente de bactérias que podem causar infecção em órgãos distintos. Nos biofilmes, as bactérias estão bem resguardadas das defesas do organismo e da ação dos antimicrobianos. Estes podem se formar tanto em superfícies plásticas quanto em mucosas (fibrose cística), nos dentes (placa dentária) e nas tubulações em geral. Observe a figura abaixo, que mostra a formação de biofilme por uma bactéria em um vaso sanguíneo.



13.2.2. Invasão

Além de aderir, as bactérias também podem invadir diferentes células do nosso organismo para causar infecção. A penetração bacteriana nas células do organismo se dá pelo processo que chamamos de fagocitose (defesa inata mais eficiente – (ver capítulo 1 deste volume). Há dois tipos de fagocitose: uma é exercida por células fagocitárias e a outra pelas células epiteliais ou células não fagocitárias. A fagocitose exercida pelas células fagocitárias é um processo que acontece naturalmente, com o objetivo de proteger o organismo da bactéria. A fagocitose causada por células epiteliais ou por células não fagocitárias é induzida pela bactéria, e tem como objetivo protegê-las das defesas do organismo. Quanto aos mediadores das duas fagocitoses, temos, na fagocitose natural, o auxílio de anticorpos e do complemento. Já na fagocitose induzida, temos a ação de diferentes proteínas, chamadas de invasinas. As invasinas podem se localizar na membrana externa da bactéria ou podem ser introduzidas no citosol. Podemos dizer que ambos os tipos de fagocitose envolvem o citoesqueleto de actina, tanto nas células fagocitárias como nas não fagocitárias, com projeções de extensões celulares chamadas pseudópodos, que envolvem a célula bacteriana em vacúolos. Cada bactéria invasora é dotada de diferentes mecanismos próprios de invasão e estes servirão ao propósito de cada uma delas.

As respostas das células do nosso organismo podem ser várias, as que mais conhecemos incluem a produção de citocinas e prostaglandinas.

As citocinas, também chamadas de **interleucinas**, são produzidas por macrófagos ativados e estimulam o amadurecimento do linfócito. Já as prostaglandinas podem causar morte celular por necrose (diminuição de nutrientes) ou por apoptose (morte celular programada).

Com relação às bactérias, o mais importante é a necessidade de regular a expressão dos seus genes de virulência para se adaptarem aos organismos onde vivem.

Bactérias intra e extracelulares

O crescimento e a multiplicação de células bacterianas podem ocorrer dentro (intracelular) ou fora (extracelular) das células do nosso organismo. Algumas bactérias são classificadas como intracelulares obrigatórias, por precisarem de nutrientes produzidos pela célula hospedeira. Sua localização intracelular permite que sejam protegidas de anticorpos, da fagocitose e de alguns antimicrobianos.

Sideróforos

Íons metálicos, como o ferro, estão entre as necessidades do metabolismo bacteriano. Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular que têm grande afinidade por ferro e formam complexos importantes para as células. Dentro das células, o ferro é reduzido a uma forma solúvel (Fe II). O complexo sideróforo-ferro é necessário porque Fe é insolúvel no pH fisiológico e, portanto, não pode ser transportado entre células por meio de canais de íons. A produção de sideróforos é uma estratégia bastante interessante para as bactérias presentes em nosso corpo. Para que este processo não ocorra, o nosso organismo criou um mecanismo para retirar o ferro dos líquidos corpóreos. Assim, o ferro que existe no sangue está quase que todo ligado à hemoglobina nas células vermelhas (eritrócitos), à transferrina no plasma e à lactoferrina no leite e em outras secreções (lágrima, muco, etc.). Quando se inicia uma infecção, nosso organismo aumenta a produção de proteínas que sequestram a maior quantidade de ferro, tornando-o pouco disponível para a bactéria. Desta forma, bactérias que não competem eficazmente com o hospedeiro pelo ferro disponível são pouco patogênicas e as que secretam os sideróforos (com ferro ligado) possibilitam sua internalização pela célula bacteriana, após ligarem-se a receptores específicos.

13.2.3. Toxinas

É o termo usado em Microbiologia para nomear qualquer substância de origem bacteriana capaz de causar danos no organismo animal. As toxinas bacterianas são classificadas, desde o século XIX, em: endotoxinas e exotoxinas.

13.2.3.1. Endotoxinas

O LPS (lipopolissacarídeo) é a endotoxina presente principalmente na membrana externa de membros da família *Enterobacteriaceae*. Sua estrutura é composta por três partes: lipídeo A (glicopeptídeo composto de dissacarídeo que se liga aos ácidos graxos), cerne (pequeno número de açúcares comuns, como o ácido deoxioctanoico (KDO) e a heptose) e antígeno O (composto formado por uma variedade de resíduos oligossacarídicos, que protegem a bactéria da ação de substâncias hidrofóbicas). O lipídeo A é a parte toxigênica das bactérias Gram-negativas, como, por exemplo, *Neisseria* spp.

O LPS induz a liberação de substâncias vasoativas, ativa o sistema complemento pela via alternativa, através da ação sobre o componente C3 (ver capítulo 1 deste volume), e ativa a cascata de coagulação, provocando obstrução intravascular. Todos estes processos podem resultar em instabilidade cardiovascular e hemodinâmica, levando a uma septicemia. Manifestações semelhantes podem ser causadas por bactérias Gram-positivas, devido a componentes de sua parede bacteriana.

13.2.3. Exotoxinas

As exotoxinas podem ser divididas em três grupos ou tipos: I, II, III. Essa divisão é de acordo às interações com as células do hospedeiro.

- Grupo I

As toxinas pertencentes a este grupo correspondem aos superantígenos e às toxinas da família ST (termoestáveis).

Os superantígenos não sofrem a ação dos macrófagos, mas possuem a capacidade de se ligar às moléculas de MHC da superfície dos macrófagos e aos receptores na superfície dos linfócitos. Isso permite que haja a produção de grandes quantidades de interleucinas, interferons e outras citocinas por outras células além dos linfócitos. Um exemplo de bactéria que produz superantígeno é o *Staphylococcus aureus*.

Assim como o superantígenos, as toxinas ST agem somente na superfície das células. As toxinas ST compreendem uma família de pequenos peptídeos não imunogênicos produzidos por algumas bactérias, como, por exemplo, a *Escherichia coli*.

- Grupo II

As toxinas deste grupo têm como característica lesar a membrana citoplasmática, através da formação de poros, que leva a morte da célula. Como os glóbulos vermelhos (hemácias) são as células mais estudadas em relação a essas toxinas, estas receberam o nome de hemolisinas, mas isso não quer dizer que outras células não possam ser lesadas. A virulência dessas toxinas é demonstrada, principalmente, pela capacidade de matarem os fagócitos, rompendo a membrana dos fagossomas, e lisar as hemácias para captura do ferro da hemoglobina. Outros mecanismos também podem estar envolvidos, como a presença de toxinas que retiram o fosfato dos fosfolípidos (fosfolipases), desestruturando a membrana.

- Grupo III

Este grupo possui o maior número de toxinas e fatores de virulência, por esse motivo acreditamos ser o grupo mais importante. As toxinas deste grupo possuem uma característica comum entre elas, que é a presença das subunidades A e B em sua molécula. A subunidade A corresponde à porção enzimática e ativa da toxina, penetrando na célula e exercendo os efeitos biológicos da toxina (na maioria das vezes, remove a ADP-ribose da NAD e as transfere

para diferentes proteínas das células, que perdem as suas funções normais). A subunidade B (vem de *binding*) é responsável pela ligação da toxina ao seu receptor celular. Essas toxinas também recebem o nome de toxinas A-B.

13.2.3.3. Enzimas hidrolíticas

Enzimas como hialuronidase, colagenase e proteases são hidrolíticas, sendo capazes de degradarem componentes da matriz extracelular, desorganizando toda a estrutura dos tecidos. Esta degradação forma vários nutrientes que são utilizados pelas bactérias. Dificilmente se consegue distinguir o papel desenvolvido pelos fatores bacterianos daquele desenvolvido pelo processo inflamatório, visto que os fagócitos também produzem enzimas hidrolíticas.

14. Microbiota autóctone

O conceito de microbiota autóctone ou, como antigamente era conhecida, “flora normal” se refere aos microrganismos que habitam a pele e as mucosas de pessoas normais e saudáveis.

A microbiota normal se origina inicialmente do ambiente, no momento do nascimento e da alimentação, podendo haver relativa variação entre indivíduos com o passar do tempo, mas que geralmente engloba microrganismos frequentemente encontrados em determinado local, e numa determinada idade, entre indivíduos saudáveis. Sua presença não é essencial à vida, porém, ela desempenha um papel bem definido na manutenção da saúde e das funções normais.

Os microrganismos membros da microbiota podem ser extremamente benéficos existindo como **mutualistas**, protegendo o hospedeiro, competindo pelos nichos onde se encontram e pelos nutrientes, de forma mais eficiente que os microrganismos externos, inibindo e dificultando a colonização de outros microrganismos, produzindo nutrientes importantes (síntese de vitamina K e B) e também contribuindo para o desenvolvimento do sistema imunológico.

Na grande maioria, a microbiota se compõe de **comensais**, quando mantém associações aparentemente neutras sem benefícios ou malefícios detectáveis. Contudo, em algumas ocasiões, esses microrganismos podem agir como **oportunistas**, quando causam doenças em indivíduos imunocomprometidos (portadores de AIDS, pessoas que utilizam terapia imunossupressora, quimioterapia, radioterapia, que possuem queimaduras extensas, etc.). Ainda existem os casos em que se os microrganismos normais forem retirados por algum motivo do local onde são considerados comensais, e introduzidos em outro ambiente corpóreo, eles poderão agir como patogênicos, já que neste outro nicho eles não fazem parte da microbiota.

A microbiota normal pode ser classificada em dois grupos: A microbiota residente, que é considerada fixa de uma determinada área em determinada idade, e que, se perturbada, prontamente se restabelece. E a microbiota transitória, proveniente do meio ambiente, que pode permanecer no indivíduo por algumas horas ou até mesmo semanas. Geralmente, se a microbiota residente se mantém intacta, a microbiota transitória não apresenta maiores problemas, principalmente porque ela não se mantém de forma permanente. Porém, se houver algum distúrbio com a primeira, os microrganismos transitórios poderão colonizar o local e, posteriormente, caso sejam patogênicos ou oportunistas, virem a produzir doenças.

A existência de microrganismos residentes em determinado local do corpo vai depender de diversos fatores ambientais, como temperatura, umidade, pH, secreções, presença de lisozima, oxigênio, etc.

Existem ainda os locais de nosso corpo desprovidos de microbiota, como o cérebro, a medula espinhal, os rins e os pulmões, onde qualquer microrganismo detectado deve ser considerado com cuidado.

14.1. Cavidade oral

A composição da microbiota oral se altera com a idade, hábitos alimentares, hormônios, fluxo salivar, condições imunológicas e outros fatores, como higienização e ingestão de álcool. Todavia, de um modo geral, a alta umidade, o pH próximo da neutralidade, a temperatura constante (entre 34 e 36°C) e a disponibilidade de nutrientes da boca possibilitam o estabelecimento de uma microbiota bacteriana bastante complexa que habita as diversas áreas da cavidade oral. Entre as bactérias mais comuns, podemos identificar os *Lactobacillus* spp., os *Streptococcus* spp., os anaeróbios e as espiroquetas. Muitas dessas bactérias podem estar associadas à formação de cáries e à ocorrência de doenças periodontais.

14.2. Nasofaringe

A faringe aprisiona a maioria das bactérias que são inaladas. Muitas bactérias orais também podem ser encontradas neste local. O trato respiratório superior é a porta de entrada para a colonização inicial por muitos patógenos. Na nasofaringe podemos encontrar portadores sadios de vários gêneros bacterianos de importância médica, com *Staphylococcus* e *Neisseria*. Já o trato respiratório inferior (brônquios e alvéolos) é normalmente estéril, porque partículas do tamanho de bactérias não conseguem atingi-lo prontamente.

14.3. Esôfago

Quando está anatomicamente normal e sadio, o esôfago é um órgão praticamente estéril e, se presentes, as bactérias da saliva e alimentos são apenas transitórias. Apesar disso, condições patológicas podem alterar a anatomia do esôfago e predispor o órgão ao estabelecimento de uma microbiota residente constituída de microrganismos potencialmente patogênicos.

14.4. Trato gastrointestinal

Devido às rigorosas condições ambientais, no estômago, os microrganismos são comumente transitórios e sua densidade populacional é mantida baixa. A quantidade de bactérias imediatamente após as refeições é estimada em aproximadamente 10^3 a 10^6 bactérias por grama do conteúdo estomacal, sendo após a digestão praticamente indetectável. Todavia, quando consideramos as porções posteriores desse trato, sabemos da existência de grande quantidade e variabilidade de espécies bacterianas habitando esses ambientes. A quantidade e o número de espécies presentes em dado segmento do trato gastrointestinal são afetados pelo pH e pelo tempo de retenção de seu conteúdo.

Como já foi dito, o baixo pH do conteúdo estomacal e o fluxo rápido de conteúdo do intestino delgado tende a inibir o crescimento de muitas bactérias. Por outro lado, o pH relativamente neutro e a prolongada manutenção do conteúdo ingerido no intestino grosso permitem o desenvolvimento da grande diversidade microbiana comentada anteriormente.

As bactérias residentes do trato gastrointestinal contribuem para a dieta fermentando carboidratos indigeríveis, como a celulose em ácidos graxos, que são fontes de energia para as células do epitélio intestinal e facilitam a absorção de sódio e água, além de sintetizarem proteínas e vitaminas K e B.

14.5. Vagina

A microbiota vaginal varia de acordo com o indivíduo, a idade, o pH local e os níveis hormonais. As maiores alterações acontecem quando ocorre uma infecção bacteriana vaginal. As bactérias que colonizam a vagina formam um grupo multi-específico e complexo de Gram-positivos e Gram-negativos, com predominância de anaeróbios.

Prevalecem, no primeiro mês de vida, as bactérias do gênero *Lactobacillus*, mantendo o pH vaginal ácido em torno de 5. A partir deste estágio até o

início da puberdade, a acidez vaginal diminui elevando o pH para 7, onde predominam *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*. Entre a puberdade e a menopausa, devido à ação do hormônio estrogênio, ocorre produção de glicogênio e a microbiota passa a ser predominantemente de membros dos gêneros *Lactobacillus*, *Corinebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Bacteroides*. Devido à prevalência da espécie *Lactobacillus acidophilus*, o pH do trato vaginal decresce novamente e se estabelece em torno de 5. Após a menopausa, com a diminuição da produção de estrogênio, a secreção de glicogênio diminui e o pH vaginal se eleva novamente para chegar em torno de 7, neste período a composição da microbiota volta a ser aquela característica da pré-puberdade.

14.6. Pele

Vários nichos ecológicos diferentes estão disponíveis na superfície da nossa pele já que possuímos regiões mais secas e mais úmidas, apresentando menores ou maiores quantidades da microbiota. Nas regiões mais secas predominam *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*. Nas áreas mais úmidas, como virilhas, axilas, espaços interdigitais, genitália e períneo, predominam *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium* sp. Nesses locais, as condições ambientais, como umidade, maior temperatura e abundância de lipídios cutâneos, favorecem o crescimento bacteriano. De modo geral, ocorre a predominância das bactérias Gram-positivas na superfície corporal, já que estas possuem um alto grau de especificidade na adesão às superfícies epiteliais e nem todas as bactérias possuem esta habilidade.

14.7. Conjuntiva

A região da conjuntiva, apesar da sua constante exposição ao ambiente externo e, consecutivamente, à contaminação microbiana, apresenta mecanismos de proteção bastante eficazes. A ação de remoção da sujeira e dos

microrganismos que entram em contato com a conjuntiva pelas lágrimas através dos movimentos das pálpebras é um deles. A lágrima, além de ser um meio de cultura pobre, possui em sua composição imunoglobulinas (IgG), que inativam vários microrganismos; além disso, possui lactoferrina, que atua sequestrando o ferro (essencial para o metabolismo bacteriano). A lágrima possui também lisozima, que é uma enzima que dificulta a formação de paredes celulares bacterianas. Como já explicamos, quando ocorre o desequilíbrio entre a microbiota residente e a transitória, pode haver o desenvolvimento de doenças. No caso da conjuntiva, o uso indiscriminado de colírios contendo agentes antimicrobianos ou corticoides pode levar a esse problema.

15. Seleção, coleta, transporte e processamento de líquidos biológicos

A coleta para o laboratório de análises clínicas é não só o ponto de partida do trabalho do bacteriologista, como também o mais importante. Se não fizermos uma coleta correta, todo restante do trabalho terá sido em vão. Portanto, é necessário que observemos alguns parâmetros básicos, que devem ser seguidos, sempre que possível, na obtenção de fluídos biológicos para análise.

15.1. Parâmetros básicos para uma coleta correta

- Coletar as amostras **direto** do sítio de infecção

A amostra deverá ser colhida do local real da infecção, tendo o cuidado de não contaminá-la nos sítios adjacentes, a assepsia neste caso é muito importante (existem algumas exceções a esta regra quando a coleta se torna prejudicial ao paciente, como no caso de sinusite – seios da face – e nos casos de suspeita de Difteria, que comentaremos posteriormente).

- Coletar no **momento ideal**

Para seguir esse parâmetro, é importante conhecer a fisiopatologia da doença, considerando quando e onde, de acordo com a rota esperada de aquisição e disseminação do microrganismo, devemos coletar o material para conseguirmos realizar o diagnóstico com maior facilidade. Um exemplo clássico é a coleta de material suspeito de Leptospirose, que deverá ser feita por coleta de sangue no início da doença (pesquisa pela PCR e pela hemocultura), e após a primeira semana a pesquisa, passa para o soro onde detectaremos anticorpos.

- Obter **quantidades suficientes**

○ volume de material colhido deverá ser suficiente para realizarmos todas as técnicas necessárias ao cultivo. Aproveitando este tópico, é importante comentar que, em alguns casos, o excesso de material também pode prejudicar o exame.

- Utilizar **dispositivos adequados**

Devem ser utilizados recipientes estéreis, que permitam uma colheita fácil, e adequados a suspeita indicada. Como um bom exemplo, o uso de swabs com hastes bem finas e de material atóxico é indicado para coletas de uretrite, não sendo necessários para coleta comum de orofaringe (custo X benefício). Outro excelente exemplo é no caso de suspeita de microrganismos anaeróbios, em que devemos utilizar dispositivos de coleta direcionados à preservação destes agentes.

- Obter amostras **antes** da administração de antimicrobianos (se possível)

○ antibiótico poderá, em alguns casos, dificultar ou inviabilizar o isolamento do microrganismo. É claro que também não se pode descartar qualquer amostra, principalmente aquelas de difícil coleta, como, por exemplo, o líquido cefalorraquidiano. Nestes casos, o profissional deve usar sempre o bom-senso.

- Rotular (especificar **suspeita**)

Além da rotulagem normal, em que deverão constar o nome do paciente, data e forma da coleta, a especificação da suspeita é extremamente importante, principalmente quando houver a possibilidade de isolamento de um microrganismo com exigências especiais (ex.: anaeróbio). Devemos lembrar que, em boa parte das vezes, o pessoal do laboratório não tem contato com o paciente, mas somente com a amostra. Se não houver indicação da suspeita, fica muito mais difícil realizar o diagnóstico.

15.2. Sítios anatômicos

De um modo geral, devemos sempre nos preocupar, em primeiro lugar, com o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) adequados a estas atividades, como luvas, máscaras e material estéril. O jaleco, ou guarda-pó, somente deve ser utilizado no ambiente de trabalho, não devendo ser portado fora deste local para evitar contaminação cruzada (ver capítulo 1 do volume 1 desta coleção).

15.2.1. Trato respiratório superior

A microbiota da boca, garganta e nasofaringe é bem numerosa. Na maioria dos casos, os swabs de orofaringe são realizados para isolar estreptococos β -hemolíticos do grupo A que causam faringite.

Nestes casos, deve-se dirigir um foco de luz brilhante para a cavidade oral aberta e tentar visualizar o foco de infecção, instruir o paciente para que respire profundamente, e abaixe a língua suavemente com um abaixador. Neste momento, tocar com o *swab* delicadamente no local visualizado. Nos casos em que não houver nenhum indício visual, desliza-se o *swab* entre os pilares tonsilares e atrás da úvula. Após a coleta, o *swab* deve ser colocado em um tubo estéril adequado ao seu transporte para o laboratório.

Quando a infecção de orofaringe possui suspeita clínica de Difteria, alguns cuidados na coleta devem ser destacados, pois nestes casos não se deve coletar direto do sítio de infecção (pseudomembrana), já que a toxina poderá difundir-se no organismo do paciente agravando muito seu quadro (ver item 16 deste capítulo).

Existem ainda procedimentos um pouco diferenciados para colheita de material do trato respiratório superior, como no caso de suspeita de portadores de alguns microrganismos, como *Neisseria meningitidis* (Meningite) e *Staphylococcus aureus* (MARSA entre outros), onde o material é coletado da nasofaringe.

15.2.2. Trato respiratório inferior

Escarro e coleta direta das vias respiratórias inferiores:

A coleta do escarro deve ser feita preferencialmente pela manhã, quando o paciente se levanta, e em jejum. De um modo geral, há muita dificuldade na coleta deste material, pois a contaminação das amostras pelos próprios microrganismos pertencentes à microbiota é muito comum.

Os gargarejos com água, imediatamente antes da coleta, ajudam a diminuir esta contaminação, todavia, não se recomenda o uso de antissépticos bucais ou dentifrícios antes deste procedimento.

Em casos onde a produção de escarro é insuficiente ou o paciente não tem condição de prover este material, lança-se mão de outras técnicas, como, por exemplo, a nebulização, a aspiração translaringeana ou mesmo a broncoscopia fibrótica (técnica da escova bronquial).

15.2.3. Trato urinário

Para uma coleta correta nas mulheres, deve-se lavar a área periuretral e o períneo com água e sabão e enxaguar completamente (de preferência com água

ou salina estéreis). Enxugar bem a região. Os lábios devem ser separados e o primeiro jato da urina desprezado. Colhe-se então o jato médio da micção em recipiente estéril. Este deve ser mantido no gelo até a entrega no laboratório.

Em certas ocasiões é necessária a obtenção de uma amostra de urina para cultura de outras formas. Para exemplificar estes casos, temos a coleta por aspiração suprapúbica e as amostras obtidas através de cateterismo (ver item 18.2 deste capítulo).

15.2.4. Trato genital

As culturas de amostras vaginais podem muitas vezes não apresentar resultados significativos. Em caso de vaginite supurativa, deve-se montar lâminas a fresco logo após a coleta e examinar. Geralmente não são boas amostras para detecção de agentes bacterianos, mas podem servir para visualização de protozoários ou fungos (*Trichomonas vaginalis* ou *Candida albicans*).

Nos casos suspeitos de endometrite, o médico ginecologista deve obter amostras visualizando o local diretamente, através de um espéculo vaginal e introduzindo a ponta de um *swab* para cultura, através de um cateter de luz estreita colocado na abertura cervical (redução da contaminação).

15.2.5. Sangue

A maior chance de detecção de positividade para hemocultura ocorre quando o exame é realizado no momento da bacteremia (presença da bactéria no sangue). Nos casos de septicemia, esse cuidado é menos importante, pois os microrganismos estão disseminados e se reproduzindo. Existe uma latência de aproximadamente uma hora entre a ocorrência do pico febril e da bacteremia (os microrganismos e seus produtos tóxicos atuam como pirogênio exógeno e nossa resposta imune produz pirogênio endógeno. Estas substâncias, associadas a vários processos fisiológicos, irão estimular a produção de febre cerca de 60 a 90 minutos após o desencadeamento do processo). Quando ocorre a

febre, nosso organismo já está se defendendo, daí a coleta ideal ser aquela anterior a este momento.

As hemoculturas podem ser obtidas utilizando-se agulha e seringa ou métodos de vácuo, como o sistema fechado. O local da punção deve ser descontaminado de forma adequada. A execução de pelo menos três hemoculturas em um período de 24 horas é satisfatória, devendo ser obtidas de diferentes locais de punção com no mínimo 1 hora de diferença, colhendo sempre dois frascos, um aeróbio e outro anaeróbio, com o volume de 10 mL de sangue em adultos e 1 a 5 mL em crianças. Este sangue deve ser adicionado de caldo na proporção de 1:10 ou 1:5, dependendo da técnica.

15.2.6. Líquido cefalorraquidiano (líquor)

Obtido por um médico neurologista, por punção lombar, após desinfecção conveniente da pele e anestesia local. É colhido um volume total máximo de 10 mL (adultos) dividido em 3 tubos, o primeiro para Bioquímica, o segundo para bacteriologia e o terceiro hematologia. O tubo enviado para bacteriologia deverá ser mantido à temperatura ambiente ou na estufa, pois a refrigeração é fatal para os microrganismos que mais comumente causam Meningite (*Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*).

15.2.7. Lesões cutâneas

As superfícies das feridas geralmente não refletem a verdadeira causa do processo infeccioso, já que, frequentemente, estão colonizadas por bactérias do ambiente. Por esta razão, o método mais aconselhável é a aspiração do material purulento localizado nas profundidades da ferida com agulha e seringa estéreis. As margens da lesão devem ser, sempre que possível, descontaminadas com álcool 70%. Se houver atraso no procedimento, o material deve ser transferido para recipiente anaeróbio. No caso da impossibilidade de obten-

ção do material pela técnica descrita, pode-se utilizar um *swab* de forma profunda, tendo o cuidado de separar as bordas da ferida (luvas), e transportá-lo em reagente anaeróbio.

15.2.8. Olhos e ouvidos

○ material supurativo ocular deve ser colhido do fundo do saco inferior ou do canto interno, realizando sempre coloração de Gram para determinar a presença e o tipo da bactéria, antes da cultura.

As culturas de material do canal auditivo externo dificilmente refletem a causa de uma otite média, a não ser que tenha havido rompimento da membrana timpânica. Nos casos agudos, o microrganismo causador pode ser cultivado a partir de material da nasofaringe posterior.

A punção do material proveniente dos seios frontais não é comum. Geralmente, o tratamento é empírico. ○ material, se extremamente necessário, é colhido por aspiração do pús, e as culturas realizadas, buscando bactérias aeróbias e anaeróbias. Nos casos de sinusite crônica podem ocorrer infecções polimicrobianas, incluindo espécies anaeróbias.

15.2.9. Trato gastrointestinal

A confirmação laboratorial de uma infecção intestinal efetua-se, usualmente, pela detecção de ovos e parasitas, por montagens de material fecal com solução salina ou iodada, ou isolando-se bactérias de amostras de fezes.

○ material deve ser colhido em recipientes estéreis de boca larga e com tampa hermética, ou mesmo *swabs* retais e processadas o mais rápido possível. Se for previsto atraso no transporte, o material deve ser colocado em conservante ou geladeira, dependendo do caso.

15.3. Transporte da amostra

O objetivo primário do transporte é manter a amostra o mais próximo possível do estado natural e com mínima deterioração, evitando condições ambientais adversas de temperatura, pressão ou ressecamento.

São recomendados meios mínimos, tais como o meio de Stuart, Amies e Cary-Blair, que preservam as bactérias sem multiplicação dos microrganismos durante o transporte.

O tioglicolato de sódio é adicionado como agente redutor para melhor isolamento de anaeróbios, e o ágar fornece consistência, evitando a oxigenação e o extravasamento.

Para o envio de materiais biológicos pelo correio, existe uma série de normas recomendadas pelo Departamento de Aviação Civil, pela Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos, pela Divisão de Saúde dos Portos e demais órgãos competentes, que devem ser seguidas. Recomendações que vão desde o uso de recipiente à prova de choque e às alterações de pressão, até a correta rotulagem desta embalagem em que deverão constar o nível de risco do microrganismo, o símbolo do risco biológico, advertência ao transportador e recomendações quanto à manutenção (ex.: temperatura).

15.4. Processamento da amostra

Cada amostra recebida pelo laboratório de Microbiologia deve ser analisada, micro e macroscopicamente, para avaliar se está adequada ao processamento. Se houver evidência de coleta ou transporte inadequados, quantidade insuficiente, recipiente impróprio ou atraso na remessa, deve ser colhida uma segunda amostra.

Existem critérios de exclusão para as amostras biológicas. É claro, porém, que determinados materiais de difícil coleta, como o líquido, não podem ser excluídos com os mesmos critérios que um de fácil coleta. Para tal, é

necessário que o profissional encarregado de receber os espécimens biológicos seja devidamente treinado para agir nestas situações, inclusive dando todas as informações necessárias do porquê de o material estar sendo rejeitado e explicando como a segunda amostra deve ser colhida e transportada adequadamente.

16. Noções sobre as principais bactérias de importância clínica

Neste tópico, abordaremos sucintamente os principais grupos bacterianos, importantes para o homem e os animais. Separamos os grupos de acordo com a morfologia e a coloração (baseada na estrutura da parede celular).

Apesar de muitas vezes vocês encontrarem os nomes dos grupos bacterianos escritos de forma cotidiana (ex.: estafilococos), prestem atenção nos nomes dos gêneros e espécies que deverão sempre estar escritos em itálico (ou então sublinhados).

16.1. Cocos Gram-positivos

- *Staphylococcus*

São esféricos, imóveis, possuem aproximadamente 1 μ de diâmetro e são encontrados predominantemente sob a forma de cachos irregulares. Alguns representantes destes microrganismos compõem a flora normal da pele e das mucosas do homem, enquanto outros são responsáveis por vários tipos de infecções, podendo levar a septicemias fatais.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* e possui, atualmente, mais de 30 espécies, sendo que três delas aparecem com frequência como agentes importantes em bacteriologia médica (*S.aureus*, *S.epidermidis* e *S.saprophyticus*). Alguns exemplares destas bactérias podem desenvolver resistência a antimicrobianos, sendo responsáveis por grande par-

cela de multirresistência em infecções hospitalares e criando problemas terapêuticos de difícil solução.

Os estafilococos podem ser cultivados em grande parte dos meios de cultura, em condições de aerobiose. A temperatura ideal para o seu crescimento é de 37°C. As colônias em meio sólido são esféricas e brilhantes, podendo haver formação de várias tonalidades de pigmentos.

O *Staphylococcus aureus*, a espécie considerada como mais patogênica do gênero, é geralmente hemolítica, podendo produzir um pigmento amarelo. Caracteriza-se pela produção da enzima coagulase e fermentação do manitol. Por produzir várias enzimas e toxinas extracelulares é causa de várias doenças, desde intoxicações de fundo alimentar a síndromes gravíssimas, como a do choque tóxico.

A característica da lesão causada por esta bactéria é o aparecimento de abscessos localizados e de supurações focais. A partir do foco, o microrganismo pode se disseminar por via linfática e sanguínea para outras partes do corpo. Doenças como osteomielite, pneumonia, meningite e endocardite, podem ter associação com este microrganismo (mais informações no item 22.1.1).

- **Streptococcus**

Os microrganismos pertencentes a este gênero estão dentro dos integrantes da família *Streptococcaceae*. São esféricos, com aproximadamente 1 a 2µ de diâmetro, agrupando-se geralmente em cadeias, sendo o comprimento da cadeia variável em função das condições ambientais. Crescem bem em meios sólidos, principalmente contendo sangue ou extratos de tecidos. A temperatura ideal da sua incubação é de 37°C, formando colônias esféricas de 1 a 2 mm de diâmetro.

São considerados anaeróbios tolerantes ao oxigênio, pois apesar de crescerem em ambiente aeróbio, só processam fermentação e nunca respiração.

São ainda responsáveis por várias doenças humanas, desde cárie dentária, até febre puerperal, erisipela, escarlatina e mesmo septicemias.

É um grupo muito diversificado de bactérias. Sua capacidade de produzir hemólise em diferentes escalas constitui um dado importante na sua classificação laboratorial.

- β -hemolíticos – Formação de hemólise total em torno da colônia (lise dos eritrócitos de carneiro a 5%). Considerados os principais patógenos do gênero, são responsáveis por várias doenças (faringites, infecções dos tecidos moles e sérias complicações). Estas cepas são ainda subclassificadas em grupos, de acordo com diferentes polissacarídeos de parede celular (A a V). Sendo as do grupo A, as mais importantes na clínica humana (*Streptococcus pyogenes*), envolvidas em diferentes enfermidades; seguidas das do grupo B (*S. agalactiae*), envolvidas, principalmente, em meningites, septicemias neonatais e infecções pós-parto (ver diferenciação no tópico 20 e pelo hipurato no apêndice).
- α -hemolíticos – Hemólise parcial em torno da colônia (a hemoglobina dos eritrócitos adquire coloração esverdeada). Podem causar, entre outros problemas, pneumonia, meningite (*Streptococcus pneumoniae*) e endocardite subaguda (grupo viridans).
- γ -hemolíticos ou anemolíticos – Não formam hemólise.

Mais informações sobre este gênero poderão ser estudadas no item 22.2.2.

- **Enterococcus**

Anteriormente descrito dentro do gênero *Streptococcus* (grupo D de Lancefield), este microrganismo elevou-se a categoria de novo gênero – *Enterococcus* e hoje faz parte da família *Enterococcaceae*. Conforme indica sua

denominação, estes organismos fazem parte da microbiota entérica e muitas vezes do trato genitourinário, podendo ser encontrados como causadores de problemas nas vias urinárias (principalmente em pacientes com anomalias ou manipulados), ou mesmo em feridas e bacteremias, principalmente em imunodeprimidos.

Podem apresentar diferentes tipos de hemólise (α , β e γ) e são considerados microrganismos extremamente resistentes, podendo crescer em condições de alta salinidade (pH 9,6) e temperaturas de 10 a 45°C, bem como em detergentes e bile. Possuem uma resistência intrínseca aos antimicrobianos, sendo, diferentemente dos estreptococos, somente inibidos pela penicilina e não mortos por ela. São resistentes as cefalosporinas e alguns também a aminoglicosídeos, quando administrados em monoterapia. Na década de 1980, começaram a aparecer algumas cepas com resistência a vancomicina – o que causa até hoje grande preocupação em hospitais, pois, apesar de ser considerado um patógeno de baixa virulência, ele possui a capacidade de transferir sua resistência através de plasmídeos para outros gêneros bacterianos, como, por exemplo, o *S. aureus*.

16.2. Cocos Gram-negativos

- ***Neisseria***

Gênero pertencente à família *Neisseriaceae*. Apesar de compreender várias espécies, que podem ser diferenciadas por meio de provas bioquímicas, enfatizamos duas espécies patogênicas para o homem: a *Neisseria meningitidis*, conhecida também como meningococo (meningite) e a *Neisseria gonorrhoeae*, conhecida como gonococo (Gonorreia). Ambas se apresentam como diplococos Gram-negativos, com morfologia semelhante a rins (riniformes) ou a grãos de feijão. Alguns autores sugerem, ainda, semelhança a grãos de café. Medem

aproximadamente $0,8\mu$ de diâmetro e são imóveis. As colônias apresentam-se convexas, brilhantes e mucoides, com 0,5 a 1 mm de diâmetro.

Substâncias como sangue e proteínas animais estimulam seu crescimento, sendo que uma atmosfera com 10% de CO_2 é ideal para seu total desenvolvimento. Ambas as espécies possuem resistência natural à vancomicina e à polimixina, o que facilita a seleção de contaminantes quando adicionados ao meio de cultura para seu isolamento (meio de Thayer-Martin).

O Meningococo, responsável pela meningite, pode ser dividido em 10 grupos sorológicos, sendo a maioria das infecções causadas pelos grupos A, B, C, Y e W/35. Ele inicia sua colonização, geralmente, pela nasofaringe (onde pode ser encontrado em elevado percentual de indivíduos normais) de onde pode ganhar a circulação e migrar para as meninges ou até causar outras infecções.

O Gonococo, responsável pela gonorreia, doença sexualmente transmissível, tem na uretrite sua principal forma clínica no homem. Na mulher, apresenta principalmente cervicite, mas, eventualmente, pode causar em ambos proctite, faringite gonocócica e conjuntivite neonatal. Ocasionalmente, pode invadir a circulação, causando artrites, endocardites, meningites e lesões cutâneas.

16.3. Bastonetes Gram-positivos

- ***Clostridium***

O Gênero pertence à Família *Clostridiaceae*. São anaeróbios formadores de esporos resistentes, tendo como habitat natural o trato intestinal de animais e do homem.

De maneira geral são bastonetes móveis, Gram-positivos, grandes e longos, com comprimento variando entre 3 a 8μ . Os esporos são geralmente mais largos e de difícil coloração.

- *Clostridium botulinum*

Responsável pelo botulismo, doença que, na maioria das vezes, é causada pela ingestão de alimentos contaminados com toxina botulínica (termolábil), que causa paralisia flácida. O tratamento consiste em aplicação de soro antitoxina, e o diagnóstico se baseia na demonstração da toxina.

- *Clostridium tetani*

Responsável pelo tétano, doença cuja causa é a infecção de ferimento por esporos deste microrganismo, provenientes de solo ou poeira.

Trata-se de uma bactéria que produz potente toxina neurotrópica chamada tetanospamina, que causa paralisia espática (trismo) e pode levar à morte. O tratamento consiste, principalmente, em aplicação de soro antitoxina, remoção cirúrgica do tecido necrosado e administração de antibióticos.

No diagnóstico, a bacterioscopia com visualização da formação de esporos terminais facilita sua identificação (forma de raquete). O agente causador pode também ser isolado em culturas anaeróbias a partir da ferida, porém, o tratamento não deve esperar esta confirmação.

- *Clostridium perfringens*

Também formador de toxina, este microrganismo, que se apresenta isolado ou aos pares, pode produzir várias toxinas, causando quadros clínicos diversos. Entre eles, intoxicação alimentar, gangrena gasosa (mionecrose), infecções intra-abdominais, cutâneas e subcutâneas.

Na gangrena gasosa, o microrganismo é introduzido sob forma de esporos em uma ferida. A infecção se alastra em 1 a 3 dias, com desprendimento de gases nos tecidos que circundam o ferimento.

○ diagnóstico e o tratamento procedem da mesma forma que no caso anterior.

- *Clostridium difficile*

Podendo ser encontrado como habitante normal do intestino humano, este microrganismo é agente de doença entérica, associada a antibiótico. Com quadros que variam de diarreia autolimitante a colite pseudomembranosa, é capaz de produzir três fatores principais de virulência. Uma enterotoxina, uma citotoxina e uma substância inibidora da motilidade intestinal. ○ diagnóstico é feito por coloscopia e também por isolamento e demonstração de toxina nas fezes. ○ tratamento se baseia em antimicrobianos, com chance de recidivas de 30%.

- ***Bacillus***

○ gênero *Bacillus* é a espécie tipo da família *Bacillaceae*, compreende espécies facultativas e formadoras de esporos. Sua maioria é saprófita, sendo apenas duas espécies consideradas importantes clinicamente para o homem.

- *Bacillus anthracis*

Causador do antraz ou carbúnculo (doença primária do gado), a contaminação se processa via contato com animal doente. A infecção é adquirida via introdução de esporos através da pele ou mucosas lesadas e raramente inalação, causando, na fase vegetativa, edemas, congestão de tecidos, e se disseminando pelas vias linfáticas.

No homem, a forma mais comum é a pústula maligna, uma mácula inflamada com vesícula no centro, circundada por um edema. A evolução é

lenta e possui letalidade de 20% em casos não tratados. A forma pulmonar é bastante rara e mais grave, com elevada taxa de mortalidade pela dificuldade do diagnóstico. A inalação de esporos que inicia com quadro gripal, evolui rapidamente para a disseminação, levando à ação sistêmica da toxina, choque e morte.

O diagnóstico é feito por esfregaços das lesões corados pelo Gram que revelam estes bacilos, se forem feitos quando a lesão ainda é recente. Quando não forem evidenciados, recorre-se ao cultivo deste material. No caso, disseminado, pode-se proceder à cultura de sangue ou testes de ELISA.

- *Bacillus cereus*

Este organismo pode estar associado de forma eventual a diferentes patologias, como infecções cutâneas, bacteremia e septicemia, entre outras. Porém, a sua importância clínica, mais frequente é relatada em casos de intoxicação alimentar. Por serem capazes de resistir à cocção dos alimentos e em condições de má conservação, os esporos desta espécie podem germinar e produzir enterotoxinas.

Existem duas síndromes distintas. Uma ocorre geralmente após a ingestão de carnes, vegetais, massas, bolos e leite, com período de incubação de 8 a 16 horas; e apresenta dores abdominais e diarreia (toxina produzida pela multiplicação bacteriana). A outra ocorre com período de incubação curto ($\cong 5$ hs), ocorrendo náusea e vômito após ingestão de arroz, massas, leite e derivados (toxina termoestável pré-formada).

Seu isolamento é feito em alimentos e fezes, com base em estudos quantitativos (10^5 UFC/Mg).

- *Corynebacterium*

Este grupo, de bastonetes Gram-positivos, pertence à família *Corynebacteriaceae* e mede de 0,5 a 1 μ de diâmetro, tendendo a se apre-

sentar em paliçada ou letras chinesas, e em forma de clava, devido a grânulos metacromáticos em seu interior. O gênero compreende um número relativamente grande de espécies, entre elas, muitos membros da microbiota humana. Algumas espécies podem ter correlação clínica para os seres humanos, principalmente como oportunistas. Todavia, somente uma espécie possui grande patogenicidade para o homem, o *Corynebacterium diphtheriae*, causador da Difteria.

- *Corynebacterium diphtheriae*

Também conhecido como bacilo de Klebs-Loeffler, esta bactéria se localiza nas amídalas, garganta e nariz, causando reação inflamatória local, e podendo formar “falsas-membranas” (bactérias, células epiteliais, leucócitos e fibrina) e se estender à traqueia e brônquios. Este microrganismo elabora potente exotoxina, codificada por um fago lisogênico. Esta exotoxina circulando no organismo pode lesar células do músculo cardíaco, sistema nervoso e renal.

O diagnóstico final, após testes de coloração, cultivo e provas bioquímicas, está na comprovação da atividade toxigênica (teste de ELEK).

- *Mycobacterium*

Apesar de sua composição de parede, sugerir que este gênero seja estudado entre as bactérias Gram-positivas, estes bastonetes finos, variando entre 0,3 a 0,6 μ por 0,5 a 4,0 μ , não se coram com facilidade por métodos comuns, possuindo a característica de ser álcool-ácido resistentes (BAAR), devido a presença de ácido micólico e outros lipídeos complexos em sua parede (Figura 4). Além disso, não formam esporos e são aeróbios. O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* e contém grande número de espécies, porém a maioria só apresenta importância clínica como oportunistas de imunocomprometidos. Duas espécies, em especial, são responsáveis por duas doenças importantes, a Hanseníase e a Tuberculose.

- *Mycobacterium tuberculosis*

Causadora da tuberculose, doença infecciosa, crônica de longa duração, causa de mortalidade em muitos países, que pode ser pulmonar, renal, óssea, cutânea, meníngea ou genital. Esta bactéria, também conhecida como bacilo de Koch, se apresenta de formas retas e delgadas, dispostas isoladamente ou em pequenos grupos.

O ponto de partida para seu diagnóstico é sua detecção do escarro, líquido, lavados gástricos e outros, pela coloração de Ziehl-Neelsen. A cultura também pode ser feita concomitantemente, mas seu crescimento é muito lento, portanto, o tratamento deve ser processado antes mesmo do microrganismo ser cultivado.

- *Mycobacterium leprae*

Causador da Hanseníase (ou Lepra, como antigamente era chamada), doença que provoca desfigurações na pele, caracterizada por lesões crônicas, às vezes mutilantes. Este bastonete, também conhecido como bacilo de Hansen, é semelhante ao de Koch em sua morfologia, podendo dispor-se em aglomerados chamado “globias” que caracterizam este tipo de micobactéria.

O diagnóstico é principalmente pautado em exame clínico e provas bacterioscópicas, a partir da coleta de material proveniente de muco nasal e lesões cutâneas. Este material deve ser fixado em lâminas e corado pelo método de Ziehl-Neelsen.

Até o momento, esta bactéria ainda não foi cultivada *in vitro*, sendo utilizado o tatu e o coxim plantar do camundongo para sua proliferação.

- *Listeria*

Gênero pertencente à família *Listeriaceae*. São bastonetes curtos, de 0,5 por 0,8 a 2,5 μm , considerados por muitos autores como cocobacilos, podem variar morfológicamente, tendendo algumas vezes para formas cocoides

ou mesmo filamentosas. Não formam esporos, são catalase positivos, oxidase negativos e fermentam a glicose produzindo ácido, mas não gás. Das diferentes espécies que constituem o gênero, atualmente, a mais importante é a *Listeria monocytogenes*.

- *Listeria monocytogenes*

Por ser ubiqüitária, é encontrada em diferentes *habitats*, incluindo microbiota normal de diferentes animais e homem, bem como fontes ambientais, como água e solo. Sua transmissão ao homem ocorre pelo contato direto com o animal ou fezes infectadas, ou pelo consumo via alimentos como, por exemplo, verduras, queijos e leite. Pode causar infecções assintomáticas em indivíduos sadios, que podem se tornar portadores por curtos períodos de tempo. A ingestão de *Listeria* pode levar a casos de infecção alimentar, com índice considerável de morte em casos não tratados, podendo causar ainda quadros de meningoencefalite, meningite e septicemia, principalmente em pacientes com doença de base ou imunossuprimidos. No caso de mulheres grávidas, a listeriose pode afetar a placenta e o feto, levando ao aborto. O microrganismo cresce bem em ágar sangue e outros meios gerais, mas a conservação do material clínico a baixas temperaturas aumenta o percentual de isolamento, o que demonstra uma possibilidade real de manutenção e crescimento, em alimentos mantidos sobre refrigeração.

16.4. Bastonetes Gram-negativos

16.4.1. Entéricos

- *Enterobacteriaceae*

Esta família engloba vários gêneros e espécies de bastonetes Gram-negativos, com muitas propriedades comuns. Embora possam ser encontrados de forma ampla na natureza, a maioria é habitante do intestino de

animais e do homem. Seu diagnóstico é pautado na coprocultura, identificação bioquímica e sorologia de um modo geral. Sua prevenção, de um modo geral, está na manipulação e preparo correto de alimentos, bem como a ingestão de água fervida e filtrada.

Devido à riqueza de membros desta família, optamos por somente assinalar as principais espécies que podem estar envolvidas nas patologias humanas.

- *Escherichia coli*

Habitante constante do intestino normal humano, sua presença em água, pode indicar contaminação fecal. A doença mais comum causada pela *E. coli* está relacionada ao trato urinário, como no caso da UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica). Sua ocorrência é maior em crianças e mulheres grávidas. Quando a bacteriúria acusar contagem superior a 100 mil UFC por mL de urina é confirmada a infecção urinária. Além disso, também podem estar envolvidas em septicemias, meningites e outros tipos de infecção.

Alguns biossotipos de *E. coli* podem também causar problemas de ordem intestinal, como as ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica), EIEC (enteroinvasora), EHEC (entero-hemorrágica), EA_ggEC (enteroagregativa) e DAEC (aderência difusa).

- *Shigella*

Aeróbios e imóveis, podendo ser encontrados no trato intestinal do homem, não formam cápsula ou esporos. Suas colônias são transparentes, circulares, com até 2mm após 24 horas. Causam, a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados, a chamada shigelose ou disenteria bacilar, através de lesões no íleo e do cólon, caracterizada por reação inflamatória. Devido à invasão e destruição da mucosa, o paciente pode apresentar disenteria de início súbito, espasmos abdominais seguidos de diarreia e febre, com sangue e muco nas fezes.

- *Salmonella*

Não esporulados, móveis, aeróbios facultativos, com cerca de 0,5 a 0,7 μ , por 1 a 3 μ . Atualmente, o Gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *S.bongori* e *S.enterica*, mas os estudos de hibridização molecular demonstraram que existem sete grupos evolutivos. A maioria dos sorovares que infectam humanos são classificados no grupo I e raros no IIIa e IIIb. A *Salmonella enterica* é dividida em várias subespécies e sorotipos importantes com base na composição antigênica com relação aos antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar).

Baseado na nomenclatura atual, os nomes dos sorotipos de *Salmonella* da subespécie *enterica* não são mais escritos em itálico e aparecem com a primeira letra maiúscula (ex.: *Salmonella* Typhi). Os sorotipos das outras subespécies de *Salmonella enterica* e aqueles de *Salmonella bongori* são designadas apenas por sua fórmula antigênica.

A *Salmonella* Typhi causa a febre tifoide e é a mais importante das Salmonelas causadoras de “febres entéricas”. Caracterizada por febre contínua e grave hemorragia intestinal a febre tifoide, se não for tratada, pode ser fatal. O diagnóstico compreende o isolamento do agente nas fezes ou sangue do paciente e também sorologia diante do antígeno em questão.

De um modo geral, os demais sorotipos de *Salmonella* causam no adulto normal apenas uma enterocolite que geralmente é de origem alimentar. Mas, em crianças, podem invadir a corrente sanguínea (ex.: *Salmonella* Typhimurium), provocando infecção em outros órgãos.

- *Yersinia*

Bastonetes pequenos, considerados por muitos autores como cocobacilos, trata-se de um gênero facultativo, que compreende várias espécies. Sendo as espécies *pestis*, *enterocolitica* e *pseudotuberculosis* as principais envolvidas nas infecções humanas.

- *Yersinia pestis* – Agente etiológico da peste (zoonose). Tem como seu reservatório, roedores silvestres e domésticos. Sua principal via de transmissão ocorre pela picada de pulgas infectadas (peste bubônica), mas também pode ser transmitida pessoa-a-pessoa, via inalação direta de aerossóis de pessoa infectada nos pulmões (peste pneumônica), podendo ou não ter proliferação sistêmica (septicêmica). É um microrganismo considerado de alta letalidade.
- *Yersinia enterocolitica* – Pode causar diferentes doenças no homem, como conjuntivite e osteomielites, mas tem na infecção intestinal sua síndrome mais comum e importante, caracterizada por febre e dor abdominal. Apresenta, algumas vezes, quadro semelhante a apendicite aguda, decorrente de intensa inflamação do íleo terminal e gânglios mesentéricos (enterocolite). Em casos de debilitados, a bactéria pode ter disseminação sistêmica, levando o paciente após a cura da infecção intestinal a artrite e outras complicações.
- *Yersinia pseudotuberculosis* – Embora primariamente considerada um patógeno animal, também pode estar envolvida em infecção intestinal, causando diarreia e linfadenopatia com necrose, podendo levar ao desenvolvimento de nódulos esbranquiçados no fígado, baço e pulmões. A forma septicêmica, embora não muito comum pode levar à morte em até dois dias.

- Outras *Enterobacteriaceae*

Como já foi dito anteriormente, este grupo possui diversos gêneros bacterianos, sendo muito difícil descrever todos em apenas um tópico. Entre

aqueles considerados de média importância, que fazem parte da microbiota humana, mas que eventualmente apresentam-se como oportunistas, podemos citar os gêneros: *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella* e *Providência*.

- ***Vibrio***

O gênero *Vibrio*, pertence à família *Vibrionaceae*, é constituído de bacilos Gram-negativos que diferem de outros bastonetes pela sua morfologia, lembrando uma vírgula. Crescem melhor em meios alcalinos, com comprimento aproximado de 2 a 4 μ . Este gênero compreende várias espécies, sendo a mais importante o *Vibrio cholerae*, responsável pela cólera. Outra espécie bastante importante é o *Vibrio parahaemolyticus*, que possui papel bastante definido nas toxinfecções alimentares.

- *Vibrio cholerae*

Bactéria causadora da cólera, doença sem febre ou cólicas, caracterizada por náuseas, vômitos e diarreia profusa, que pode levar em pouco tempo à morte por desidratação, requerendo reidratação contínua do paciente. Esta patologia ocorre geralmente onde não há higiene, já que é proveniente da ingestão de bactérias contidas na água ou alimentos contaminados por fezes. Seu período de incubação varia de 2 a 3 dias, e a diarreia pode levar até 7 dias. Já causou diversas pandemias e hoje se apresenta sob forma endêmica, em vários locais da terra.

O diagnóstico se baseia na coprocultura inicial em água peptonada alcalina (APA) e posterior isolamento em meio de cultura próprio (TCBS), seguido de bioquímica e sorologia.

- *Vibrio parahaemolyticus*

Encontrado geralmente em água e frutos do mar, pode causar infecção intestinal quando do consumo destes alimentos sem a cocção necessária. Seu período de incubação varia de 8 horas a 2 dias, e a diarreia leva em média 3 dias. Diferentemente da cólera, na diarreia por *V.parahaemolyticus* o paciente pode apresentar cólica e febre, sendo a frequência de eliminação muito menor. O diagnóstico é feito da mesma forma que o anterior.

- *Aeromonas*

Pertencente a família *Aeromonadaceae*, esse gênero é comumente encontrado em corpos d'água, solo, verduras, animais de sangue frio e aves, este gênero engloba microrganismos fermentadores da glicose, anaeróbios facultativos, oxidase positivos, que podem causar infecções intestinais e extra-intestinais. Possui cinco espécies de importância clínica: *A.hydrophila*, *A.sobria*, *A.caviae*, *A.veronii* e *A.schubertii*, sendo as duas primeiras mais implicadas em doenças humanas.

- *Pseudomonas*

Pertencente a família *Pseudomonadaceae*, compreende várias espécies, com aproximadamente 25 destas com alguma implicação humana, o grupo se divide em diferentes gêneros, sendo que o gênero *Pseudomonas* tornou-se bastante conhecido, através do isolamento hospitalar constante de uma de suas espécies.

- *Pseudomonas aeruginosa* – Encontrada em pelo menos 70% dos casos de infecção por *Pseudomonas*, é um patógeno tipicamente oportunista, podendo causar várias doenças, principalmente em imunodeprimidos. Sua patogenia engloba desde infecções localizadas (processos cirúrgicos ou queimados) até septicemias

severas. Atualmente, é considerado um patógeno alerta em infecções nosocomiais, devido a sua característica de manutenção em locais úmidos e elevada resistência a muitos antibióticos e anti-sépticos, sendo possível sua transmissão nestes ambientes hospitalares, por desinfetantes, respiradores, cateteres, alimentos, etc. Podendo ser isolada facilmente pela cultura, a diferenciação é feita com base em provas bioquímicas (não fermenta glicose e é oxidase positiva) e na capacidade de algumas cepas produzirem um pigmento azul-esverdeado chamado piocianina.

- *Burkholderia*

Anteriormente pertencente ao gênero *Pseudomonas*, a *Burkholderia* pertence hoje a uma família distinta (*Burkholderiaceae*), tendo como espécie mais importante a *B. cepacia*. É um organismo oxidase e catalase positivos, móvel, aeróbio, não fermentador, multirresistente e oportunista, geralmente associada a surtos intra-hospitalares. Já foi relatada causando septicemias em neutropênicos e desmineralização óssea em pacientes com fibrose cística. Outra espécie de alta morbidade e letalidade para os equídeos e que pode acometer o homem é a *Burkholderia mallei*, causadora do mormo, doença que causa lesões nodulares nos pulmões e outros órgãos, assim como danos ulcerativos na pele e em mucosas da cavidade nasal.

- *Campylobacter*

Constituído de várias espécies, este gênero pertence à família *Campylobacteraceae* e apresenta-se incapaz de proliferar em presença do ar atmosférico ou na ausência de oxigênio, sendo considerados microaerófilos estritos (crescem em 5% a 6% de O_2) e muitas vezes termofílicos. Morfologicamente, são bastonetes curvos ou em forma de "S". Existe um grande reservatório de *Campylobacter* em animais, principalmente aves, o que

associa as infecções por esse patógeno, na maioria das vezes, ao consumo de alimentos contaminados. Este organismo tem a capacidade de causar diarreia do tipo disenteriforme, com sangue e muco, febre e dores abdominais, que pode evoluir para invasão e bacteremia, especialmente em recém-natos e debilitados. Entre as espécies termofílicas que acometem o homem, podemos destacar *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

O diagnóstico é feito pelo isolamento (microaerofilia) em meios seletivos e identificação por base na sua morfologia e propriedades bioquímicas (ver prova do hipurato no apêndice).

16.4.2. Não entéricos

- *Brucella*

O gênero *Brucella*, pertencente à família *Brucellaceae*, congrega parasitas obrigatórios do homem, imóveis, não formadores de esporos, e que, morfologicamente, se apresentam como bastonetes curtos. Estes microrganismos causam a Brucelose ou febre ondulante, que pode ser adquirida, principalmente, pela sua penetração através de lesões ou pelo trato alimentar (ingestão de leite ou queijos contaminados).

É considerada uma zoonose, por sua associação a animais como fonte primária. As espécies mais importantes para o homem são a *B. melitensis* (caprinos), a *B. suis* (suínos) e a *B. abortus* (bovinos). São parasitas intracelulares, podendo se multiplicar no interior de macrófagos; sua disseminação após a infecção é linfática, podendo localizar-se nos rins, baço ou fígado.

O diagnóstico pode ser sorológico (aglutinação em lâmina ou tubo) ou bacteriológico (hemocultura no pico febril ou materiais obtidos por biópsia, que devem ser incubados em 10% de CO₂).

- *Bordetella*

O gênero pertence a família *Alcaligenaceae* engloba três espécies, sendo a mais importante para o homem a *Bordetella pertussis* (agente da coqueluche).

A coqueluche é uma infecção aguda transmitida por gotículas aéreas, com colonização dos cílios das células do trato respiratório e liberação de diferentes toxinas, levando inicialmente a tosse catarral, que evolui para tosse seca e paroxística (tosses curtas com produção intensa de muco), seguida de sibilos. Ocorre principalmente em crianças com até 10 anos, podendo complicar para anoxia do SNC, exaustão e pneumonias secundárias. O diagnóstico geralmente é clínico, devido a característica da tosse, mas a cultura pode ser feita por placa de tosse ou material da nasofaringe.

- *Legionella*

Pertencente a família *Legionellaceae*, esse gênero engloba espécies aeróbias, móveis e oxidase negativas. De difícil cultivo em meios rotineiros de laboratório, esses organismos podem ser isolados em meios seletivos incubando-se a 5% de CO₂ com umidade relativa elevada. Considerada uma bactéria ambiental, este gênero pode ser adquirido por inalação do ar e poeira ou de água contaminada. A espécie principal, *L. Pneumophila*, pode acometer o homem com síndromes semelhantes a gripe ou mesmo pneumonias atípicas (doença dos Legionários), dependendo principalmente do estado imunitário do hospedeiro.

- *Helicobacter*

Esse gênero, atualmente, pertence a família *Helicobacteraceae* e constitui-se de bastonetes móveis, curvos ou helicoidais, com 0,3 a 1 µm de largura por 1,5 a 5 µm de comprimento, não esporulam e, em culturas velhas, podem se tornar cocoides.

Capaz de resistir à acidez estomacal, a espécie tipo *H. pylori* reside na camada de muco que reveste a mucosa gástrica, pois produz urease, convertendo ureia em amônia, o que aumenta o pH local. Pode causar um enorme espectro de problemas gastroduodenais, inclusive câncer de estômago, porém só causa doença clínica em 5% a 10% dos indivíduos infectados. É diagnosticado por exame histológico, cultura, testes de detecção de urease e testes sorológicos. Sendo tratado por combinação de antimicrobianos e drogas ácido-redutoras.

- *Haemophilus*

Gênero pertencente à família *Pasteurellaceae*. Possui células pequenas a médias, podendo apresentar pleomorfismo, exigentes no crescimento de fatores X e/ou V (ágar chocolate) e ótimo de temperatura de 37°C, compreende várias espécies, sendo o *Haemophilus influenzae* principalmente relacionada ao homem. As principais doenças causadas por esta bactéria estão ligadas ao trato respiratório, já que esta se encontra normalmente na nasofaringe.

O *H. influenzae* é ainda a principal causa da meningite precedida de otite em crianças de 3 meses a 2 anos. O diagnóstico é feito por esfregaços corados pelo Gram e pela cultura precedida de identificação sorológica do tipo capsular. Outra espécie de importância humana é o *Haemophilus ducreyi*, causador da doença sexualmente transmissível cancro mole, caracterizada por ulcerações genitais necróticas dolorosas, acompanhadas ou não de adenopatia inguinal.

16.5. Espiroquetídios

Bactérias que ocorrem isoladas e possuem morfologia espiral, graças à conformação do peptidoglicano da parede que, de um modo geral, não se coram bem pela técnica de Gram.

São móveis, geralmente girando em seu eixo. Em virtude da dificuldade de observação dos espiroquetas no microscópio comum, aconselha-se o emprego da microscopia de campo escuro com preparação a fresco, permitindo a observação da motilidade característica e facilitando o diagnóstico. Sua visualização ao microscópio luminoso é feita pela impregnação da prata (método de Fontana Tribondeau).

- *Leptospira*

Principal gênero da família *Leptospiraceae* possui uma divisão fenotípica em duas espécies, *Leptospira biflexa* e *L.interrogans*, sendo a segunda espécie, patogênica para o homem. Através de estudos moleculares, podemos decompor o gênero em várias espécies com potencial patogênico, e subdividi-los em diferentes sorogrupos e sorovares, causadores da leptospirose, zoonose adquirida através do contato com a urina de animais infectados, principalmente ratos (portadores assintomáticos). A doença pode variar muito no que diz respeito aos sintomas, podendo ocorrer estados semelhantes aos gripais, meningites, danos hepáticos e renais (doença de Weill) e até problemas hemorrágicos graves, dependendo da virulência do sorovar envolvido e do estado imunitário do hospedeiro.

Seu diagnóstico é realizado com base na técnica da PCR (ver capítulo 2 do volume 3 desta coleção), no cultivo bacteriano e nas reações sorológicas com as amostras dos pacientes suspeitos.

- *Treponema*

Gênero pertencente à família *Spirochaetaceae*. Entre as espécies patogênicas, destacamos o *Treponema pallidum*, causador da sífilis. Esta doença, de aquisição por contato sexual, pode se manifestar em lesões no pênis ou locais geniturinários mais profundos, havendo a possibilidade da

transmissão horizontal e vertical, já que este microrganismo é capaz de ultrapassar a barreira placentária.

Este microrganismo não é cultivável em meio de cultura. O diagnóstico vai depender da fase da doença. Se a sífilis é primária, o agente pode ser demonstrado na secreção da lesão (cancro duro), por microscopia de campo escuro ou imunofluorescência. Após este estágio, o diagnóstico é sorológico (VDRL).

- *Borrelia*

Pertencente a mesma família do gênero anterior, este possui uma espiral irregular de 10 a 30 μm de comprimento e 0,3 μm de largura, altamente flexível e com movimento rotatório. Engloba duas espécies de importância na clínica humana, a *Borrelia recurrentis* e a *B. burgdorferi*.

A primeira é o agente da febre recorrente, que tem este nome devido a sua característica recidivante. Antigamente ocorriam surtos, mas na atualidade são registrados apenas casos esporádicos, sem praticamente nenhuma ocorrência no Brasil. É transmitida pelo piolho humano e carrapatos que picam roedores e depois transmitem as bactérias para o homem. O diagnóstico pode ser feito pelo cultivo e pela demonstração bacterioscópica da bactéria no sangue do paciente.

A segunda é o agente da doença de Lyme (cidade americana onde foi descrita). As principais manifestações da doença são o eritema migratório e a artrite, podendo haver comprometimento neurológico e cardíaco. Possui também um animal invertebrado como vetor, o carrapato, que pica camundongos e cervídeos infectados e transmite depois os microrganismos para o homem. O diagnóstico geralmente é sorológico através do ELISA (Ver capítulo 1 deste volume).

16.6. Outras bactérias

- *Mycoplasma e Ureaplasma*

Pertencentes à família *Mycoplasmataceae*, estes microrganismos não apresentam parede celular verdadeira, nem rigidez, porém muitas espécies contêm colesterol na membrana (não existe em outras bactérias).

Espécies mais importantes para o homem:

- *Mycoplasma pneumoniae* – Espécie causadora de pneumonia atípica.
- *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* (ambos causadores de infecções no trato genital, como uretrites não gonocócicas).

A transmissão, em geral, é interpessoal, sendo o *M. pneumoniae* de aquisição aerógena e outros mycoplasmas e ureaplasmas por contato sexual.

Possuem células variáveis na morfologia e tamanho (100 a 250nm), não se corando, devido à ausência da parede, pelo método de Gram. Usa-se o corante Diene ou Romanovsky (Giemsa) para visualização (vide apêndice), porém, o diagnóstico está pautado na sorologia, pois são microrganismos exigentes, necessitando de meios complexos para seu cultivo, o que dificulta a cultura.

- *Rickettsiae*

São bactérias pleomórficas, parasitas intracelulares estritas, que geralmente são transmitidas ao homem por artrópodes (com exceção da febre Q). O gênero *Rickettsiae* pertence à família *Rickettsiaceae* e geralmente não é trabalhado em laboratório clínico comum, necessitando de maiores requisitos de cultivo (cultura de células e/ou ovo embrionado) e normas mais rígidas de biossegurança na sua manipulação. São responsáveis por doenças como o tifo, a febre maculosa e a febre Q, sendo na maioria das vezes seu diagnóstico sorológico.

- *Chlamydia*

Pertence à família *Chlamydiaceae*. Este gênero se compõe de seis espécies que também não possuem peptídeoglicano em suas paredes. Além de não se corarem pelo método de Gram, são parasitas intracelulares estritos e imóveis, que se reproduzem no interior do citoplasma da célula infectada. Podem ser cultivadas em ovos embrionados e culturas de células. Muitas vezes o diagnóstico é feito sorologicamente ou através de biologia molecular. O gênero *Chlamydia*, possui três espécies de importância humana:

- *C. trachomatis* – Espécie causadora de infecções oculares, genitais e respiratórias.
- *C. pneumoniae* – Infecções nas vias respiratórias.
- *C. psittaci* – Psitacose, pneumonia.

17. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas no trato respiratório

Apesar de o trato respiratório ser um sistema contínuo e muitos agentes infecciosos poderem se instalar em toda a sua extensão, geralmente o que percebemos é que, em muitos casos, existe um local preferencial para o microrganismo ser encontrado. Deste local, ele pode ou não se disseminar, dependendo de diversos fatores, como sua virulência, até características de resposta do próprio hospedeiro.

Para facilitar nosso estudo, consideraremos o trato respiratório superior e inferior em separado, lembrando que o trato superior (orofaringe, fossas nasais, nasofaringe, laringe e traqueia) possui microbiota autóctone, que eventualmente pode agir como oportunista ou mesmo causar alguma confusão no momento do diagnóstico.

Outro fato importante para lembrar é que algumas infecções respiratórias (principalmente virais), podem se iniciar neste sistema e posteriormente se disseminar pelo corpo, como no caso da caxumba, rubéola e sarampo.

Como dificilmente em laboratório clínico diagnosticamos viroses, vamos dar maior ênfase às infecções bacterianas encontradas neste trato.

17.1. Trato Respiratório Superior (TRS)

17.1.1. Faringite e tonsilite

Na maior parte das vezes não há necessidade de se fazer diagnóstico laboratorial destas doenças, já que 70% delas são de origem viral, e mesmo as de origem bacteriana (Figura 37) tendem a não apresentar gravidade suficiente para que se recorra ao exame. Porém, em alguns poucos casos em que isso é necessário, o problema maior, não está na doença primária, e sim nas possíveis complicações que podem ocorrer após esta infecção.

Figura 37. Tonsilite bacteriana



As bactérias associadas a essas doenças são:

- ***Streptococcus pyogenes*** (β -hemolítico do grupo A) - Bastante comum nestes casos (10% a 20% dos casos de faringite aguda), seu diagnóstico é necessário devido às complicações que podem ocorrer como febre reumática, escarlatina, glomerulonefrite, otite e sinusite. Manifesta-se repentinamente, principalmente em crianças (veja tópico 20).
- ***Corynebacterium diphtheriae*** - Já citada no tópico 14.3, esta bactéria causa uma faringite branda, mas, se for produtora de toxina

diftérica, poderá causar uma doença chamada difteria, que produz obstrução da orofaringe e da nasofaringe, impedindo a respiração normal. A disseminação da toxina pelo corpo pode comprometer outros órgãos e evoluir para forma fatal. Felizmente não ocorre com frequência, principalmente após as campanhas de vacinação, onde há a imunização com o toxoide diftérico.

- ***Haemophilus influenzae*** (tipo B) – Além das doenças citadas, as complicações causadas por esse microrganismo podem se associar a epiglotites graves e até mesmo a casos de meningite em crianças pequenas (veja item 21 deste capítulo).

- ***Borrelia Vincenti*** – (*Borrelia* estirpe Vincenti) Essa espiroqueta, que ocorre principalmente em adolescentes e adultos, forma um complexo fusoespiralar em associação com bacilos fusiformes. Pode causar úlceras na garganta ou gengiva, mas geralmente não tem maiores complicações.

17.1.2. Otite e Sinusite

Como no caso anterior, estas doenças são frequentemente de origem viral, podendo estar associadas secundariamente a agentes bacterianos. Apesar das otites não estarem diretamente associadas ao trato respiratório, por sua localização e ligação anatômica, bem como os agentes associados vamos considerá-las neste tópico.

- **Otite média aguda** – Comum em crianças, devido ao fato de a trompa de Eustáquio ainda estar muito aberta, facilitando a invasão viral e de bactérias residentes na nasofaringe. Os sintomas são bem gerais, como febre, mas pode ocorrer até mesmo vômito e diarreia. Os vasos do tímpano podem estar dilatados e ocorrer secreção no ouvido médio. O processo, se não tratado, pode levar ao rompi-

mento do tímpano e prejuízo à audição (otite média crônica supurativa). As bactérias mais comumente envolvidas nesse processo são: *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *S.pyogenes* e *S.aureus* (todas já citadas anteriormente).

- **Otite externa** – O canal externo do ouvido (orelha externa) possui microbiota bacteriana semelhante a da pele. Como o ambiente é úmido, favorece a colonização por *S. aureus* e também pela levedura *Candida albicans*. Eventualmente pode ocorrer também a presença de bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus*. Geralmente, problemas causados por estes microrganismos são facilmente tratados com preparados oto-oftálmicos contendo polimixina ou outro antibiótico na fórmula.
- **Sinusite aguda** – Clinicamente a Sinusite se associa a dor e sensibilidade facial. Etiologicamente, é semelhante à Otite média. Geralmente o tratamento é empírico ou feito com base no material colhido da nasofaringe, já que a aspiração do sinusóide não é uma prática comum.

17.2. Trato Respiratório Inferior (TRI)

Os principais órgãos do trato respiratório inferior são os pulmões, os brônquios e os alvéolos. Geralmente as infecções do TRI são mais graves, podendo ser classificadas em infecções agudas e crônicas.

17.2.1. Agudas

- **Coqueluche** – Esta é uma doença aguda do TRI, causada pela bactéria *Bordetella pertussis* (ver item 16.4). O quadro clínico inicial é duvidoso, mas, após a manifestação da tosse seca e curta (estágio paroxístico), geralmente não há dúvidas. Os organismos

podem ser isolados de *swab* de garganta ou em “placas de tosse”, no meio de Bordet-Gengou ou ágar-sangue-carvão, incubando-se por 3 a 5 dias em atmosfera úmida. O antibiótico de escolha é a eritromicina, mas a prevenção ocorre pela vacinação (tríplice DPT).

- **Bronquite aguda** – É uma inflamação aguda dos brônquios, geralmente causada por uma infecção. Resulta, geralmente, em tosse.

Diversos vírus atuam neste tipo de patogenia, porém, bactérias como o *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*, também podem possuir importante papel nesta condição. Devido a esse fato, muitas vezes é recomendado o uso de antimicrobianos.

- **Bronquiolite** – Doença exclusiva da infância, causada frequentemente por vírus (75% são causadas pelo vírus respiratório sincicial – VRS e 25% por outros vírus – ocasionalmente pode-se ter envolvimento de *M.pneumoniae*). Devido ao diminuto tamanho dos bronquíolos infantis, qualquer edema celular obstrui a passagem de ar nos alvéolos. Uma complicação comum deste tipo de doença é a pneumonia intersticial.

- **Pneumonia** – É uma infecção do parênquima pulmonar. Variados microrganismos como bactérias, vírus e fungos podem causar pneumonia logo, ela não é uma doença única e sim um conjunto de infecções específicas, cada uma com sua epidemiologia, patogênese, apresentação clínica e curso clínico.

A Identificação etiológica do microrganismo causador da pneumonia é um elemento de extrema importância, visto que ele é a chave para um tratamento antibiótico apropriado. Entretanto, devido à natureza séria da infecção, os pacientes necessitam receber antibioticoterapia empírica, principalmente em casos de pneumonia grave, antes dos resultados

laboratoriais estarem disponíveis. Além disso, em cerca de um terço dos casos, o agente etiológico não consegue ser evidenciado.

As pneumonias virais são mais comuns em crianças e as bacterianas, em adultos, podendo ser causadas, na maioria das vezes, por *S.pneumoniae* e *H.influenza*. Podem ser ainda resultantes de alguns oportunistas pós-virais, como *S.aureus* e *K.pneumoniae*. Existem também as chamadas pneumonias atípicas bacterianas que são causadas por diversos outros agentes bacterianos, como, por exemplo, *Mycoplasma pneumoniae*, espécies de *Chlamydia* e *Legionella*.

17.2.2. Crônicas

- Tuberculose – Doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (ver item 14.3). Apesar de ser uma doença primária dos pulmões, pode disseminar-se para outros locais do organismo ou mesmo evoluir para uma infecção generalizada (tuberculose miliar).

Muito séria em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento devido a problemas sociais como miséria, desnutrição e moradias inadequadas. Torna-se extremamente grave em indivíduos imunocomprometidos. O bacilo de Koch se localiza intracelularmente nos macrófagos, o que possibilita sua persistência por longos períodos no organismo.

O diagnóstico com base no teste cutâneo de tuberculina não é útil em países como o nosso, onde a maioria dos indivíduos recebeu a vacina BCG.

O diagnóstico realizado inicialmente por bacterioscopia (método de Ziehl-Neelsen - ver item 5.2) e confirmado posteriormente pela cultura (Loewenstein-Jensen - ver apêndice) é o mais confiável.

18. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas do trato urinário

A infecção urinária é uma infecção em qualquer parte do trato urinário, quer seja nos rins, ureteres, bexiga ou uretra. Pode atingir pessoas de qualquer sexo e qualquer idade, mas é mais frequente em mulheres e bebês do sexo feminino. Há uma estimativa de que 10% a 20% das mulheres contraem infecção urinária em alguma época de suas vidas, sem considerar um número significativo de infecções recidivantes. A maioria das infecções é aguda e de curta duração, porém contribui para taxa significativa de morbidade na população. Quando ocorrem infecções graves podem resultar em perda da função renal e sequelas graves permanentes.

Nas mulheres, pode-se fazer distinção entre o tipo de infecção, entre cistite, uretrite e vaginite, porém o trato é contínuo e os sintomas podem aparecer superpostos.

O trato urinário é dividido em rins, ureteres, bexiga e uretra. Sendo que somente na uretra devemos encontrar microbiota normal.

Quanto à aquisição e etiologia, as infecções do trato urinário são causadas principalmente por bactérias, mas, ocasionalmente, outros microrganismos, como vírus, fungos e parasitas, podem estar envolvidos.

18.1. Patogênese das Infecções do TU

Um dos fatores predisponentes à infecção urinária é ser do sexo feminino, pois a uretra feminina é mais curta que a masculina e está mais próxima ao ânus. Além disso, as relações sexuais facilitam o movimento de microrganismos até a uretra. Nas mulheres, há também a ocorrência de mudanças hormonais, afetando a mucosa do trato genitourinário, sendo que na gravidez ocorre dificuldade de esvaziamento pela conformação anatômica da mulher.

- **Infecções urinárias não bacterianas**

Infecções Virais são bastante raras, mas os vírus podem ser isolados na ausência de doença do trato urinário. Como, por exemplo, o poliomavírus, o citomegalovírus e o adenovírus (ver capítulo 16 de Virologia).

Infecções fúngicas também podem ocorrer, tendo como principais causadores a *Candida* spp. e o *Histoplasma capsulatum* (ver capítulo 4 deste volume).

Quanto aos parasitas, temos o protozoário *Trichomonas vaginalis*, que pode causar uretrite em homens e mulheres (considerado a causa de vaginite) e o helminto *Schistosoma haematobium*, que causa inflamação da bexiga (os ovos penetram na parede da bexiga).

- **Infecções urinárias bacterianas**

As infecções urinárias bacterianas são geralmente adquiridas por via ascendente, passando inicialmente pela uretra e posteriormente pela bexiga e rins. Ocasionalmente, pode atingir a corrente sanguínea e causar uma septicemia. Estas infecções são normalmente causadas por bacilos Gram-negativos, como a *E.coli*. A espécie *Proteus mirabilis*, por exemplo, é de frequente associação com cálculos urinários, pois possui potente urease que, atuando na ureia, produz amônia e torna a urina alcalina. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* também são bastante isolados, porém possuem associação a infecções hospitalares (resistência). No grupo dos Gram-positivos, podemos citar o *S.saprophyticus*, em mulheres jovens sexualmente ativas, e o *S.epidermidis* e *Enterococcus* sp., associados a pacientes hospitalizados.

A maioria dos patógenos do trato urinário faz parte da microbiota fecal, pois somente espécies aeróbias e facultativas, como *E.coli*, possuem os atributos necessários para colonizar e infectar o trato urinário, sendo necessário para estes microrganismos ascender e se fixar (adesinas).

Alguns sorogrupos de *E.coli* possuem capacidade de colonizar áreas periuretrais, podendo possuir um tipo peculiar de fímbrias (pili) que permite sua adesão ao epitélio da uretra e da bexiga.

Algumas bactérias produzem endotoxinas que diminuem a função das válvulas vesicouretrais, comprometendo o peristaltismo uretral e levando a um refluxo de urina com bactéria para os ureteres (afluxo bacteriano). Outras possuem flagelos e podem mover-se contra a corrente (exceção: *Enterococcus*).

A produção de determinadas substâncias, como hemolisinas, lesão renal (*E.coli*), e uréase, pielonefrite (*Proteus*), também funcionam como fator de virulência para estes microrganismos.

Com exceção da mucosa uretral, o TU normal é resistente à colonização bacteriana e geralmente elimina rápida e eficientemente os microrganismos. Como mecanismos de defesa, podemos citar o pH, o conteúdo químico, os mecanismos normais de descarga, as próprias células da bexiga e do rim, que produzem IgG e IgA, e a fagocitose.

• Características Clínicas e Complicações

A infecção pode envolver diferentes partes do TU, podendo ser então denominada as seguintes formas distintas, a saber:

Cistite - Infecção da bexiga, caracterizada por frequência e urgência urinária e dificuldade de urinar (disúria).

Pielonefrite aguda - Envolve parênquima renal e sistema coletor, geralmente acompanha bacteremia, dor lombar localizada e sintomas sistêmicos (febre e prostração).

Pielonefrite crônica - Termo confuso, pois se refere à aparência patológica do rim resultante de inflamação progressiva do interstício renal e túbulos.

Abcesso renal - É um acúmulo localizado de pus no tecido renal (manifestação incomum). Pode ser confundido com a pielonefrite, porém, no início, os sintomas são mais acentuados.

Prostatite aguda - Infecção bacteriana da próstata, com febre e dor perineal, associada a sintomas de disfunção irritativa e obstrutiva (a prostatite crônica é uma condição subaguda).

Urosepse - Bacteremia sintomática, originária do trato urinário. Pode ser causada por pielonefrite ou abcesso renal ou ser adquirida no hospital, geralmente devido à instrumentação (ex: cateterização).

18.2. Coleta do material

A coleta ideal é feita antes da terapia antimicrobiana (se recebeu antibiótico nas últimas 48 horas, deverá relatar).

Amostra de urina por coleta de jato intermediário

A coleta ideal para a pesquisa de infecção bacteriana no trato urinário deverá ser realizada com a primeira urina da manhã. Nos casos em que não podemos aguardar este momento, sugerimos que o paciente faça um repouso miccional de, no mínimo, 3 a 4 horas.

Deve-se processar uma lavagem cuidadosa dos lábios femininos ou da glande masculina com sabão neutro e água (não usar sabão antisséptico), secar o local e, utilizando um frasco estéril e de boca larga, colher o volume intermediário da urina, desprezando o primeiro jato.

Devemos considerar de forma especial a interpretação dos resultados nos pacientes idosos ou acamados com dificuldade maior de coleta, crianças e gestante.

A obtenção de amostras de fluxo intermediário de bebês e crianças pequenas é obviamente difícil, sendo que as amostras podem ser coletadas por colocação

de uma bolsa plástica adesiva (saco coletor) no períneo (feminino) ou no pênis (masculino). Estas amostras, muitas vezes, são contaminadas pelas fezes. Em alguns casos, estes problemas são contornados pela aspiração suprapúbica.

Amostra de urina por punção suprapúbica

Desinfeta-se a pele da região sobre a bexiga e injeta-se anestésico, tal como lidocaína, por via subcutânea. Com a ponta de uma lâmina cirúrgica, faz-se um pequeno corte através da epiderme e, pelo corte, introduz-se cuidadosamente uma agulha espinhal calibre 18 de bixel curto e aspira-se com seringa 10mL de urina.

Amostra de urina de catéter

Os pacientes não devem ser cateterizados simplesmente para obtenção de amostras de urina. Nos que já possuem cateter *in situ*, amostras devem ser obtidas pela retirada com seringa e agulha do tubo do cateter. A coleta da bolsa do catéter é geralmente imprópria para cultura, pois a permanência da urina na bolsa de drenagem propicia a multiplicação dos microrganismos no local, ocasionando falsos valores na contagem. Deve-se tomar precauções especiais para que não ocorra a contaminação da amostra.

Amostragens diferentes para determinação de casos especiais:

Mycobacterium tuberculosis – Coletar, em dias consecutivos, 3 amostras da urina da manhã.

Schistosoma haematobium – Examinar os últimos mililitros de uma amostra matinal de urina após exercícios físicos.

Pacientes com infecção prostática - após esvaziamento da bexiga deve-se fazer massagem prostática. O final da urina sairá com secreções prostáticas que acumulam. Nestes casos uma alta concentração de material já pressupõe infecção prostática.

18.3. Transporte do material

Deverá ser transportado ao laboratório envolvido no gelo, com o mínimo de demora, pois a urina é um excelente meio de cultura para muitas bactérias e a multiplicação bacteriana provocará distorções no resultado.

18.4. Procedimentos

Os espécimes que não puderem ser examinados no período de 1 hora da coleta devem ser refrigerados, sendo que as contagens bacterianas permanecem viáveis no máximo até 18 horas no refrigerador. No caso de espécimes recebidas sem refrigeração, o ideal é descartá-las e solicitar uma nova coleta (explicando ao paciente a forma correta de transporte).

- **Testes rápidos**

○ exame ao microscópico permite a emissão de um relato preliminar rápido e um controle presuntivo da qualidade da amostra.

Colocar em uma lâmina, sem espalhar, 10 μ L de urina homogeneizada, sem centrifugar (usar pipeta automática ou alça calibrada), esperar secar, fixar e corar pelo Gram. Caso seja observada a presença de, pelo menos, 1 bactéria por campo, em 20 campos analisados, trata-se de uma possível bacteriúria significativa ($\geq 10^5$ UFC/mL). Estes casos geralmente acompanham piócitos também.

A observação de células epiteliais descamativas e uma cultura mista geralmente indica amostra proveniente do primeiro jato e contaminação, havendo nestes casos a necessidade de nova coleta. Existem outros métodos rápidos não disponíveis em todos os laboratórios como, por exemplo, os aparelhos automatizados, todavia, seu custo ainda é inacessível para laboratórios de pouca rotina ou de pesquisa.

- **Urinocultura**

O objetivo deste teste é estimar o número de bactérias viáveis por mililitro de urina e, nos casos considerados positivos ($\geq 10^5$ UFC/mL), realizar sua identificação.

- a) **Urinocultura quantitativa**

1. Técnica da alça calibrada (Método de Hoeprich)

Utiliza-se uma alça fabricada com diferentes calibrações: 0,1 mL (1/10), 0,01 mL (1/100) e 0,001 mL (1/1000).

A alça é inserida verticalmente na urina (já homogeneizada) e inoculada no centro da placa contendo meio de cultura. Faz-se então um espalhamento com alça de Drigalski ou alça bacteriológica.

2. Técnica das diluições seriadas

A urina é diluída em salina 1:10 / 1:100 / 1:1000

Semeando-se sempre 0,1 mL de cada diluição em placa de cultura.

Pode-se semear em superfície (Drigalski) ou *pour-plate*.

- **Meios utilizados**

Para análise **quantitativa** são utilizados meios ricos que propiciam o crescimento da maior parte dos microrganismos presentes nas infecções urinárias.

O cultivo padrão é realizado no ágar Brolacin, também conhecido como "CLED" (azul de bromotimol - lactose-cisteína - eletrólitos deficientes). O meio além de facilitar a contagem inibindo o *swarm* do gênero *Proteus*, permite a diferenciação presuntiva das bactérias presentes (lactose – *E.coli* - azul/amarelo \Leftrightarrow azul intenso – *Proteus*).

Para análise **qualitativa** (propicia a noção dos microrganismos presentes), pode-se usar meios como ágar sangue e meios seletivos para determinados grupos (ex: Ágar MacConkey e EMB).

Incubação: as placas deverão ser incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Se não houver crescimento, deverão ser incubadas mais 24 horas e se ainda não houver crescimento, o resultado deverá ser o seguinte: “ausência de crescimento após 48 horas de incubação”.

Se houver crescimento, o microrganismo deverá ser identificado (provas bioquímicas) e posteriormente realizado o seu TSA.

• **Interpretação dos resultados (análise quantitativa)**

A contagem de placa deverá ser feita naquela que tiver um número entre 30 e 300 colônias e deverá ser feito com base no número de colônias contado X fator de diluição = número de microrganismos por mililitro.

Se o resultado for menor que 10^4 colônias (10.000 UFC/mL), considera-se a amostra contaminada acidentalmente ou conteúdo da contagem proveniente de microbiota autóctone (não identificar). Nestes casos, devemos reportar só o nº total de UFC/mL. Porém, se no teste inicial pela coloração de Gram a contagem foi positiva, as placas devem ser reincubadas.

Nos resultados com contagem maior ou igual a 10^5 colônias (100.000 UFC/mL), há indicação de infecção urinária. Nestes casos, as colônias devem ser identificadas e, posteriormente, deve ser feito o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

Se mais de 1 tipo de colônia estiver presente em grande quantidade, ambas deverão ser identificadas e o TSA de cada uma deve ser feito separadamente. Se foram isoladas mais de 2 espécies, há suspeita de contaminação do material, principalmente se na coloração de Gram não foi observado nenhum leucócito e houver presença de células epiteliais descamativas.

A presença de culturas mistas geralmente indica contaminação, porém, pode ocorrer infecção mista, principalmente em pacientes fazendo uso de cateter com doença renal crônica ou com lesão obstrutiva.

Se o resultado estiver entre 10^4 e 10^5 UFC/mL (resultados intermediários), este caso deve ser analisado com muito cuidado, pois pode tratar-se de contaminação, início ou final de infecção ou paciente que iniciou o tratamento com antimicrobiano. Como controle, devemos solicitar uma segunda coleta para comparação de resultados.

Nos casos positivos, devemos sempre tentar identificar o microrganismo, podendo também semeá-los após triagem para checagem e confirmação bioquímica posterior.

- **Detecção de bacteriúria significativa**

É a característica-chave para a certeza de infecção do trato urinário.

Estudos recentes sugerem que os dados de isolamento geralmente são mais precisos em mulheres e as considerações utilizadas para determinar infecção (contagem igual ou acima de 100.000 UFC/mL) nem sempre podem ser plotadas para indivíduos do sexo masculino. Nos homens, há uma tendência atual de se considerar números limites para urina mais baixos que nas mulheres, pois a contaminação é menos frequente.

Estes números não se aplicam a amostras de urina coletadas de cateteres ou por aspiração suprapúbica. Nestes casos, qualquer número de microrganismos pode ser significativo, pois não há contaminação de microbiota.

b) Urinocultura qualitativa

Ao detectar a bacteriúria significativa na amostra, o profissional deverá fazer a identificação bioquímica da colônia isolada e realizar o TSA de acordo com o item 11.

19. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas sistêmicas (hemocultura)

Como já comentado no item 15.2.5, o sangue é desprovido de microbiota, sendo que a presença de bactérias no sangue (bacteremia) pode ocorrer de forma assintomática com certa frequência (mastigação vigorosa, escovação, etc.), sem que haja maiores implicações para o indivíduo, pois, possuímos defesas específicas e inespecíficas (ver capítulo 1 deste volume) que nos auxiliam ao combate destes “intrusos”. Todavia, em algumas ocasiões, a partir de focos intravasculares ou extravasculares, poderá ocorrer bacteremia sintomática (transitória, intermitente ou contínua), levando à manutenção ou passagem de bactérias na nossa corrente sanguínea. Essa situação, se não resolvida, poderá evoluir para doenças em determinados locais (como no caso de uma meningite) ou infecções disseminadas (septicemia).

Geralmente, quando desenvolvemos a septicemia (multiplicação de microrganismos no sangue), podemos apresentar uma série de sinais e sintomas associados, que podem ser leves ou fatais, como febre e calafrios, lesões de pele, diarreia, queda da pressão arterial, aumento do ritmo cardíaco e choque. Como é uma infecção muitas vezes fatal, seu diagnóstico deve ser realizado o quanto antes, pois o tratamento é de suprema importância para manutenção da vida do paciente.

A Hemocultura ou exame bacteriológico do sangue é utilizado para demonstrar a presença de bactérias na corrente sanguínea. Para se realizar essa pesquisa é necessária uma metodologia correta na coleta deste sangue e a semeadura deste material em meios adequados (veja o item 15.2.5).

19.1. Diluição

Como o sangue é dotado de poder bactericida, deve ser diluído no meio para que não haja inibição do crescimento bacteriano. De um modo

geral, são semeados 5 a 10 mL de sangue para 100 mL do meio de cultura líquido.

19.2. Meios de cultura

A escolha do meio de cultura que será utilizado vai depender do microrganismo que queremos isolar; os mais comuns são meios ricos, como tripcase soja, infusão de cérebro e coração, columbia e ágar Brucella.

Podemos também utilizar meios semissólidos, como, por exemplo, na suspeita de Leptospirose, onde usamos o meio semissólido de EMJH ou Fletcher, na proporção de 1, 2 e 3 gotas para 5 mL de meio.

Alguns autores mais antigos preconizam o método de Castañeda, onde há combinação de meio sólido com líquido no mesmo frasco de cultura. O sangue é introduzido, ao interior do frasco, através da rolha, por uma agulha e o meio líquido é diariamente inclinado sobre o meio sólido, permitindo o aparecimento de colônias, caso haja crescimento bacteriano.

Atualmente, existem meios comerciais para os diferentes fins de isolamento, que podem ser semeados por sistema fechado a vácuo, de agulha dupla, evitando a contaminação do meio pelo ambiente. Estes frascos, geralmente, apresentam concentrações de 5% a 10% de CO₂.

19.3. Formação de coágulos

Para evitar a formação de coágulos, aconselha-se o uso de pérolas de vidro ou adição de anticoagulantes, como o citrato de sódio (1% a 2 %). Há também um produto a base de polianetosulfonato de sódio (SPS, PSS ou Liquoid) que funciona nas concentrações de 0,025% a 0,05%, como anticoagulante e inibidor da ação bactericida do sangue (anticomplemento e lisozimas detêm a fagocitose e inativam concentrações terapêuticas de aminoglicosídeos). É utilizado na proporção de 10 mL sangue + 1 mL do

produto a 1% em salina estéril. Esta substância, porém, pode inibir algumas cepas de *N.gonorrhoeae*, *N.meningitidis* e *Gardenerella vaginalis*, portanto, em pacientes suspeitos de septicemia por estes agentes, deve ser inoculado também o sangue sem anticoagulante.

19.4. Uso de antimicrobianos

É importante, para o isolamento na hemocultura, saber se o paciente está fazendo uso de antimicrobianos. Em caso positivo, algumas providências deverão ser tomadas para diminuir a impediência do crescimento bacteriano nos frascos.

Nos casos onde há tratamento por sulfas, preconiza-se a adição de 5 mg de ácido p-aminobenzoico a cada 100mL de meio (suficiente para neutralizar até 1,5 mg% da droga).

Já em casos onde o tratamento é feito com base nas penicilinas, adiciona-se penicilinase em doses de 50 unidades (0,5 mL de solução a 100 u/mL para 100mL de meio), porém este procedimento é desaconselhado, pois o risco de contaminação do caldo é muito maior.

19.5. Exames de hemoculturas e subculturas

Os frascos de hemocultura, de um modo geral, são incubados de 35 a 37°C e examinados visualmente todos os dias, a fim de se detectar sinais de crescimento. Deve-se realizar subculturas cegas em placas de ágar sangue e de ágar chocolate a partir de todas as hemoculturas dentro de 18 horas após a coleta estas placas devem ser incubadas em 5% a 10% de CO₂.

Todas as hemoculturas visualmente positivas devem ser subcultivadas em condições aeróbias e anaeróbias, e as negativas não devem ser descartadas com menos de 7 dias de incubação, quando se faz um subcultivo final, pois alguns microrganismos exigentes, como certas cepas de *Neisseria* e *Haemophilus*, podem requerer incubações prolongadas.

Alguns microrganismos possuem o crescimento extremamente lento e sua detecção não depende de subcultivos, como no caso das leptospiras, onde hemoculturas em meio semissólido só devem ser descartadas após 90 dias da semeadura.

19.5.1. Interpretação dos resultados

Ao interpretar o resultado da hemocultura, é importante avaliar a possibilidade de contaminação acidental por microrganismo do ar ou de superfície cutânea, devendo sempre ter o cuidado de eliminar estes fatos. Preconiza-se a semeadura em duplicata, para exclusão desta possibilidade, e também a coleta de locais diferentes (dois braços).

O ideal, como já foi dito no tópico de coleta, é a retirada da amostra no momento imediatamente anterior ao pico febril, o que é difícil de precisar. Além disso, como nem sempre é possível coletar neste período, fazemos as coletas de diferentes locais de punção venosa, com o espaço de no mínimo uma hora (o tempo suficiente para as defesas normais retirarem as bactérias de circulação é de 30 minutos), mas a repetição do exame em pelo menos três vezes pode esclarecer algumas dúvidas comuns nesta metodologia.

Devemos avaliar se o isolamento está traduzindo uma septicemia verdadeira ou somente uma bacteremia, pois, no primeiro caso, o microrganismo, ou é periodicamente lançado na corrente sanguínea ou está se multiplicando nela; já no segundo, este é veiculado transitoriamente ou é lançado ocasionalmente.

Na septicemia, como já comentado, acompanham-se sinais e sintomas clínicos, como calafrios e febre, mas que nem sempre são relatados ao profissional do laboratório, que deverá verificar se a positividade da amostra está de acordo com a suspeita médica.

De qualquer forma, o isolamento verdadeiro de qualquer microrganismo do sangue deverá ser relatado, e a avaliação final deverá ser feita pelo médico,

já que alguns casos de bacteremia transitória possuem importância clínica, como *Streptococcus viridans* e *Streptococcus pneumoniae*.

20. Diagnóstico laboratorial das infecções bacterianas no trato gastrointestinal (coprocultura)

Uma ampla gama de patógenos é capaz de infectar o trato gastrointestinal, sendo que as infecções variam em efeitos, desde crises brandas, autolimitadas a diarreias graves, fatais.

Nos países em desenvolvimento, a doença diarréica é a principal causa de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças de pouca idade.

Nos países desenvolvidos a diarreia ainda aparece como queixa comum, porém geralmente branda e autolimitada, com exceção nos pacientes muito jovens, idosos e imunocomprometidos.

Podemos interrelacionar fatores socioeconômicos e ambientais como condicionantes da infecção intestinal, como, por exemplo, a desnutrição, causando prejuízos na imunidade e predispondo as pessoas à infecção bacteriana.

Quanto às nossas defesas contra as infecções do trato gastrointestinal podemos citar a nossa microbiota autóctone (flora normal), pela sua competição, pois, se houver redução da microbiota, a resistência à infecção intestinal também se reduz (ex. síndrome “colite pseudomembranosa”, causada por *S.aureus*, *C. difficile* e outros clostrídios após administração de antimicrobiano). Nossa acidez estomacal também é um mecanismo de defesa, pois restringe o número e o tipo de microrganismo que penetra no TGI. O peristaltismo ajuda na remoção das bactérias (poucas chances de aderência), permitindo que as fezes caminhem para o intestino grosso.

20.1. Podemos dividir a síndrome intestinal em dois grupos:

20.1.1. Síndrome disenteriforme

Onde há mecanismo de invasão, com penetração dos microrganismos nos enterócitos, multiplicação, produção de citotoxina e destruição da célula, bactérias se localizando em nível de submucosa. É uma reação do tipo inflamatória (migração de macrófagos e polimorfonucleares ao local). Por ser uma região vascularizada e próxima dos plexos nervosos, as fezes aparecem com muco e sangue e o paciente sente cólicas (ex.: *Salmonella*. Ultrapassa os enterócitos sem destruí-los, possui localização no nível das submucosas. Devido ao quadro de invasibilidade, pode ter localização extraintestinal.)

20.1.2. Síndrome coleriforme

Onde há mecanismo toxigênico, com ligação da célula bacteriana aos receptores dos enterócitos (fator de colonização - CFA I, II, III - pili ou fímbria), ocasionando liberação de toxinas, inversão do fluxo de absorção e eliminação de água, aumentando o fluxo de água na luz intestinal. (ex.: EPEC: as fezes apresentam-se aquosas e com muco. Há fixação nas microvilosidades dos enterócitos). Nesta síndrome geralmente não há dor, mas pode ocorrer desidratação, devido à grande perda de líquidos e eletrólitos.

20.2. Patogenia da diarreia bacteriana

A porta de entrada é sempre oral, e a partir desta penetração no corpo se dá a colonização, sendo o mecanismo diferente, dependendo do microrganismo.

Síndrome disenteriforme	Síndrome coleriforme
Invasão ou Citotoxina <i>E.coli</i> (EIEC), <i>E.coli</i> (EHEC)	Enterotoxinas <i>V.cholerae</i> O1
<i>Shigella</i> <i>Salmonella</i>	<i>V.cholerae</i> não O1 <i>E.coli</i> (ETEC, EPEC)
<i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Aeromonas</i> <i>S.aureus</i>
<i>V.parahaemolyticus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>

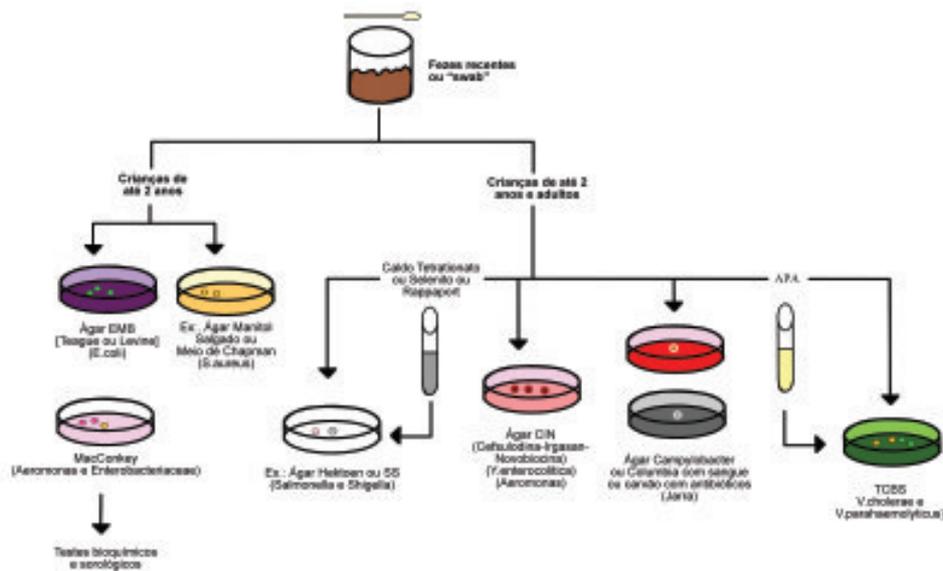
Nas fezes:

- Síndrome disenteriforme: Piócitos, células mononucleares, muco e hemácias;
- Síndrome coleriforme: É rara a presença de células, mesmo descamativas.

20.3. Coprocultura

Nas fezes, habitam as mais variadas formas de bactérias (cerca de 10^{11} bactérias por grama de fezes), além de outros microrganismos. Devemos, portanto, nos deter no isolamento daquelas bactérias que são consideradas, atualmente, como patogênicas **mais comuns** ao homem, ou seja, *E.coli* de sorogrupos específicos (ETEC, EPEC, EIEC e EHEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Vibrio* e, raramente, o *S.aureus* e *Aeromonas*. As outras bactérias são consideradas, na maioria dos casos, microbiota normal (Figura 38).

Figura 38. Esquema da coprocultura



20.3.1. Diagnóstico bioquímico

As colônias obtidas, mediante o cultivo em meios de enriquecimento e meios seletivos, devem ser isoladas, antes de se proceder à sua diferenciação exata, após confirmar a pureza da cultura pela observação do crescimento colonial e, em alguns casos, como do *Campylobacter*, por uma análise de seu aspecto morfotintorial (Gram). Seleciona-se uma colônia e procede-se a uma suspensão em salina para então realizar a semeadura para uma série de meios de cultura indicadores, que auxiliarão, posteriormente, na sua classificação bioquímica (tabela no apêndice).

Como uma possibilidade de confirmação do comportamento bioquímico do microrganismo, efetua-se a investigação sobre a classificação sorológica do mesmo.

Uma série de reações fundamentais é recomendável para a diferenciação bioquímica das enterobactérias. Na maioria dos casos, na prática, estas reações, em combinação com a diferenciação sorológica, conduzem a um diagnóstico dentro de 48 horas, sempre que não existir um comportamento atípico.

As mesmas provas podem auxiliar na identificação de membros de outras famílias bacterianas, mas na maioria das vezes deverão sofrer algum tipo de adaptação, como no exemplo da família *Vibrionaceae*, onde devemos adicionar em suas composições 1% de NaCl para permitir seu crescimento.

Principais provas bioquímicas

- Prova de oxidase



Várias são as técnicas sugeridas para este teste, cabendo ao técnico escolher a menos dispendiosa para seu uso.

1- Pingar sobre a colônia solução aquosa 1% de Dimetil p-fenilenodiamina cloridrato recém-preparada.

A positividade da reação é caracterizada pelo surgimento de coloração rósea. A coloração rósea, após algumas horas, se tornará negra, o que caracteriza a morte dos microrganismos contidos naquela colônia.

Sugerimos preparar a solução e impregnar uma tira de papel de filtro (utilizar enquanto estiver úmido). Esta técnica economiza o reativo e permite testar várias amostras em somente uma tira, podendo reutilizar a colônia pos-

teriormente para outras análises. Após a impregnação, tocar na colônia em questão com um bastão de vidro estéril e depois passá-la à tira impregnada para o teste.

2- Comercialmente existe o teste Bact-Ident Oxidase - lâminas de ensaio, com a área de reação impregnada com N,N-Dimetil para-fenilenediamônio cloreto, onde se goteja uma suspensão bacteriana espessa, em estudo, na área de reação. Os germes citocromoxidase positivos tornarão a área reativa com coloração azul-violeta.

Observação: As *Enterobacteriaceae* são oxidase negativas, mas *Campylobacter*, *Vibrio* e *Aeromonas* são oxidase positivas.

- Prova de fermentação de açúcares (ágar de TSI ou ágar de Kligler) - Esta prova indica se o germe fermenta (degrada) um açúcar específico incorporado ao meio de cultura, resultando em formação de ácido e/ou formação de gás visível. Para tal, o meio deve possuir um indicador da acidificação (indicador de pH), e a presença de ágar-ágar, que tornará o meio sólido, permitindo que o gás formado fique retido em forma de bolhas.

- Produção de H_2S (ágar de TSI, ágar de Kligler ou meio de SIM) - Esta prova detecta a liberação de H_2S , por ação enzimática, a partir de aminoácidos sulfurados (com enxofre), que reage com os íons férricos do citrato de ferro amoniacal, existente na composição do meio, produzindo um precipitado negro de sulfeto ferroso.

- Motilidade (meio de SIM, meio MILI) - Devido à consistência do meio de cultura ser semissólido, permite a migração das bactérias móveis para fora do ponto de repique.

- Produção de indol (meio de SIM, meio MILI) - As bactérias que possuem triptofanase hidrolizam e desaminam o triptofano produzindo indol, ácido pirúvico e NH_3 . O indol é verificado pela formação de um complexo de coloração vermelha com o grupo aldeído de paradimetilaminobenzaldeído,

que está presente nos reagentes usados na prova. Devemos usar um meio de cultura rico em triptofano.

Reativo de Braun & Silberstein (1940):

p-dimetilaminobenzaldeído 5,0 g

Metanol 50,0 mL

Ácido ortofosfórico 10,0 mL

Embeber tiras de papel de filtro e deixar secar em estufa a 37°C por 2 a 3 dias.

Usar no tubo com meio de SIM no momento da semeadura.

- Degradação da ureia (caldo de ureia ou ágarureia) - A urease é uma enzima presente em muitas espécies de microrganismos e que degrada a ureia com liberação de amônia e CO₂. A amônia reage, em solução, formando carbonato de amônio, que alcaliniza e aumenta o pH do meio.

A alcalinização do meio de cultura é indicada pela mudança da coloração amarela para vermelha, mediante a presença de vermelho de fenol encontrado na composição do meio. Ou se o indicador de pH for outro, de acordo com sua coloração na faixa alcalina.

- Prova vermelho de metila e de Voges-Proskauer - (caldo de VM-VP seg. Clark e Lubs) - A prova vermelho de metila (VM) se baseia no uso de um indicador de pH, devido ao fato de o vermelho de metila em pH 6,0 ser amarelo e em pH 4,4 se tornar vermelho. Esse indicador revela o germe que produz ou não grandes quantidades de ácidos a partir da glicose, através da via de fermentação. Somente os germes que mantêm o pH baixo após 24 a 48 horas, ultrapassando o sistema tampão do meio, podem ser considerados VM positivos.

Indicador de VM:

Vermelho de metila..... 0,1 g

Álcool etílico 95° 300 mL

H₂O destilada 200 mL

Gotejar no cultivo bacteriano: Resultado positivo - cor vermelha.

A prova de Voges-Proskauer (VP) se baseia no fato de certas bactérias utilizarem glicose produzindo ácido pirúvico e que determinadas bactérias produzirão butileno-glicol, que é um produto de reação neutra. Antes, porém, de chegar ao butileno-glicol, há formação de acetil-metil-carbinol (acetoina) que em presença de KOH se converte a diacetil, e que, em 24 a 48 horas, toma coloração vermelha. Para acelerar o processo, usa-se da ação catalítica do α -naftol e da creatina.

Para 1 mL da cultura, adicionar 0,6 mL da solução de α -naftol e 0,2 mL da solução de KOH. Agitar bem. Ler de 5 a 15 minutos: positivo - cor vermelha.

- Degradação do Citrato (ágar citrato seg. Simmons)

Algumas bactérias podem obter energia utilizando citrato como única fonte de carbono. A prova é verificada pela produção de produtos alcalinos. As bactérias que utilizam citrato retiram N₂ de sais de amônio, alcalinizando o meio e produzindo NH₄OH. O indicador azul de bromotimol fica azul em pH acima de 7,6. Positivo - cor azul.

- Descarboxilação da Lisina (meio de LDS, meio LIA, meio MILI)

O meio ajustado pH em 5,6 apresenta cor amarela, devido ao indicador púrpura de Bromocresol que atua como indicador de pH. Neste pH as enterobactérias crescem escassamente. Porém, devido à formação de cadaverina pela descarboxilação da lisina, o pH do meio se alcaliniza, dando melhores condições de crescimento (pH 7,0). Este efeito promove uma viragem do indicador que passa de amarelo para violeta (na parte profunda do tubo). Positivo - cor violeta.

Observação 1: Esta prova poderá ser usada com a arginina e a ornitina, com resultados semelhantes.

Observação 2: O meio poderá ser adicionado de glicose e mantido com pH neutro – a bactéria terá então que crescer, utilizar a glicose, gerando ácido, para depois ocorrer o resto da reação. (neste caso, o meio não semeado apresenta cor púrpura, como no resultado positivo).

- Degradação do malonato (caldo malonato-fenilalanina)

Capacidade de uma bactéria em utilizar malonato como única fonte de carbono, alcalinizando o meio. O malonato liga-se competitivamente a desidrogenase succinica, impedindo sua ação catalítica sobre o ácido succinico e impossibilitando seu desdobramento em ácido fumárico. Há um acúmulo de ácido succinico e uma interrupção do ciclo de Krebs, tirando da bactéria sua principal fonte de energia e impedindo a formação de outros intermediários necessários ao metabolismo.

Uma bactéria só cresce em malonato se puder utilizá-lo como única fonte de carbono. Positivo - cor azul.

- Desaminação da fenilalanina (caldo malonato-fenilalanina)

Entre as enterobactérias, apenas o gênero *Proteus* e *Providencia* possuem a enzima capaz de desaminar a fenilalanina em ácido fenilpirúvico, que é detectado pela adição de uma solução de cloreto férrico a 10% (FeCl_3 -12 g; HCL-2,5 mL; H_2O destilada-100 mL). Positivo - desenvolvimento de cor verde, ao contato do FeCl com a superfície do meio cultivado.

Outras provas podem ser utilizadas, porém as provas descritas anteriormente são suficientes para uma identificação bastante precisa das enterobactérias.

Para identificação de espécies do gênero *Vibrio*, sugerimos colocar uma concentração de NaCl de 1% nos meios, para permitir seu crescimento, sendo que a prova do halofilismo (crescimento diante de diferentes concentrações salinas), facilita bastante a identificação de algumas destas espécies.

Para auxiliar na possível identificação do *Staphylococcus aureus*, observe a figura 39, onde há uma descrição das provas para esta espécie. Essas provas estão explicadas no item 22.2.1.

21. Diagnóstico laboratorial nas infecções bacterianas do sistema nervoso central

O cérebro e o cordão espinhal são protegidos de pressões mecânicas ou deformações por estarem contidos em compartimentos rígidos (crânio e coluna vertebral) e também agem como barreiras na disseminação das infecções. Os vasos sanguíneos e nervos que atravessam as paredes do crânio e da coluna vertebral são as principais vias de invasão, sendo a invasão via corrente sanguínea a mais comum.

21.1. Membranas que revestem o SNC

O cérebro e a medula são estruturas ocas e contêm o líquido céfalo-raquidiano. São recobertas por 3 membranas (as meninges), denominadas dura-máter, aracnoide e pia-máter.

21.2. Invasão do SNC

- **Via corrente sanguínea**

Passagem através da barreira hematoencefálica, provocando encefalite, ou através da barreira hematoliquórica, produzindo meningite.

- **Via nervos periféricos**

Principalmente utilizada por vírus. Estes penetram nos nervos periféricos e migram para o SNC, alcançando as células gliais e os neurônios, onde se multiplicam.

21.3. Meningite asséptica e bacteriana

A meningite bacteriana, também conhecida como séptica, é um processo inflamatório que envolve as meninges. Resulta da introdução de microrganismos através de lesões penetrantes, infecções no crânio, extensão de um foco primário de infecção via hematogênica durante, por exemplo, uma septicemia. Nestes casos, o líquido se mostra com turvação característica.

As meningites assépticas geralmente são virais, mas podem ser também causadas por leptospiros ou fungos. Nestas, o aspecto do líquido é límpido.

21.3.1. Principais agentes etiológicos bacterianos associados às meningites

- *Neisseria meningitidis* - diplococo Gram-negativo, extra ou intracelular, com cápsula polissacarídea;
- *Haemophilus influenzae* tipo B - cocobacilo, Gram-negativo, capsulado, pleomórficos;
- *Streptococcus pneumoniae* - diplococos, Gram-positivos, capsulados.

No caso de imunocomprometidos, pode ocorrer também meningite por *Listeria monocitogenes*, (cocobacilo Gram-positivo).

21.4. Diagnóstico laboratorial

O material de escolha é o líquido, e sua coleta é feita por punção lombar. O volume total do líquido de um indivíduo adulto é de 80 a 150 mL, e o material colhido de aproximadamente 10 mL. Este material é colhido em 3 tubos, o primeiro irá para bioquímica, o segundo para cultura e lâminas e o terceiro para citologia total e específica.

O aspecto normal do líquido é límpido, semelhante à águas de rochas, mas, em condições patológicas, pode apresentar anormalidades.

No caso de retículo fibrinoso, o líquor se apresenta claro, porém, em repouso, forma-se um retículo fibrinoso semelhante à teia de aranha. Pode também apresentar-se opalescente ou turvo.

○ transporte deste material e os procedimentos devem ser rápidos, porém se o líquido não puder ser processado imediatamente, deverá ser mantido à temperatura ambiente ou em estufa, pois a refrigeração é letal para duas espécies que comumente causam meningite: *N.meningitidis* e *Haemophilus influenzae*.

○ líquor deve ser processado inicialmente pela centrifugação de 3 mil rpm por 15 a 30 minutos, com o objetivo de concentrar os microrganismos. Após este procedimento, um profissional capacitado deve realizar um exame direto pelo método de Gram.

Uma coloração de Ziehl também é indicada, pois, nas preparações de Gram, os fragmentos de muitas amostras clínicas adquirem coloração vermelha, o que mascara os organismos em vermelho-alaranjados.

Pode-se proceder em conjunto o teste de Quellung (*H.influenzae* tipo B, *S.pneumoniae* e *N.meningitidis*), onde se coloca uma gota de antissoro equivalente ao microrganismo, uma gota do sedimento obtido pela centrifugação e uma gota de solução aquosa de azul de metileno. Cobrir com lamínula e em 10 minutos observar o intumescimento da cápsula (mudança no índice de refração), comparando com um controle negativo.

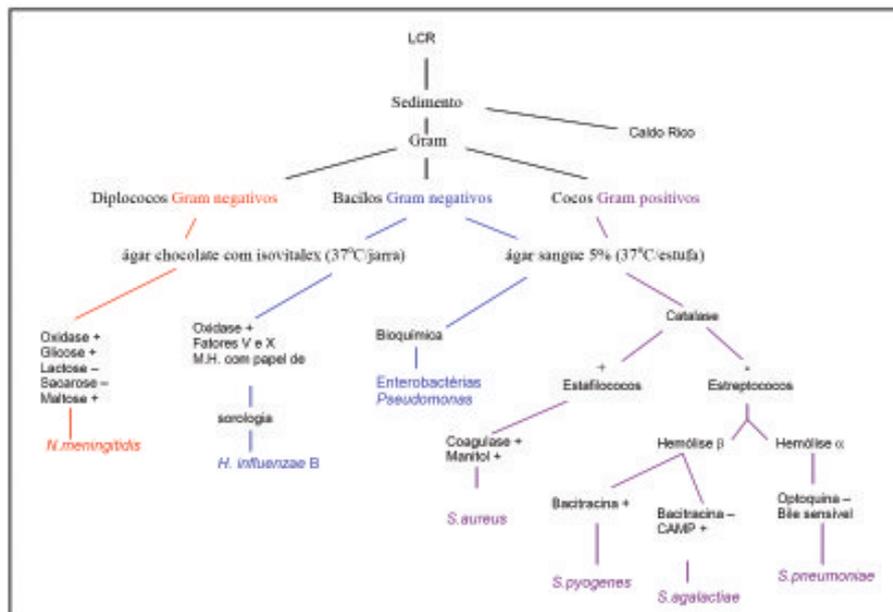
Pode-se também detectar antígenos no líquor com látex (aglutinação macroscópica).

A partir da bacterioscopia, vamos escolher o tipo de meio de cultura a ser utilizado.

No geral, deverá ser semeado em um caldo rico, em placa de ágar sangue de carneiro a 5% (que deverá ser incubado a 37°C em estufa) e em ágar chocolate 5% suplementado por isovitalex (incubado a 37°C em jarra com 3% de CO₂ e umidade).

Após observação do crescimento, são feitas provas bioquímicas e testes específicos para cada um dos possíveis microrganismos, seguindo esquema de identificação (Figura 39).

Figura 39. Esquema de identificação das bactérias no líquido



22. Cultura bacteriana de secreções orgânicas

22.1. DST's

As doenças sexualmente transmissíveis continuam, como no passado, um problema bastante preocupante do prisma da saúde pública e individual. As técnicas corretas de coleta das amostras, bem como seu rápido processamento, podem ser o diferencial no que diz respeito ao diagnóstico rápido e ao tratamento correto.

22.1.1. Coleta de amostras para diagnóstico de DST

O local e a forma de coleta das amostras vão depender da suspeita do médico, elaborada a partir do exame clínico e anamnese, sempre obedecendo a uma abordagem sindrômica (de acordo com a síndrome que o paciente apresenta).

Em pacientes do sexo masculino, colhemos a secreção uretral buscando o diagnóstico de uretrite gonocócica/clamídia. Deve-se fazer exame a fresco, buscando *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas* sp. (protozoário) e *Candida* sp. (fungo). Existem novos testes com amostras de urina, porém estão em estudo e ainda sem a eficiência desejada.

Em pacientes do sexo feminino colhemos a secreção endocervical e uretral.

Somente em crianças e mulheres hysterectomizadas a coleta de secreção vaginal é indicada (ver item 15.2.4), da mesma forma que nos pacientes masculinos, nesta coleta busca-se o diagnóstico de *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas* sp. e *Candida* sp..

A colheita da secreção uretral é indicada em casos de uretrite e, havendo indicação, faz-se uma combinação com a coleta endocervical, aumentando a possibilidade de diagnóstico de *Neisseria gonorrhoea* (gonococo) ou *Chlamydia trachomatis*.

Em alguns casos, outras amostras poderão ser utilizadas para diagnóstico laboratorial das DST, como a secreção ocular, necessária nos casos de oftalmia (Gonocócica ou por *Chlamydia*) em recém-nascidos, a secreção anal, em casos suspeitos de infecção gonocócica anal, e a secreção orofaríngea, em pacientes com sintomas clínicos indicativos.

Durante a coleta das amostras, devemos prestar muita atenção aos possíveis impedimentos e dificuldades na obtenção do material para exame. Destacamos o uso de diferentes tipos de swab, dependendo da finalidade da coleta.

Nos casos de bacterioscopia, exame a fresco e algumas culturas bacteriológicas, pode-se usar *swab* com haste plástica, alumínio ou madeira e algodão não tratado. Todavia, na cultura do gonococo, o *swab* deverá ser montado com algodão alginatado ou com carvão, pois os ácidos graxos do algodão comum inativam o gonococo e impedem seu crescimento em meios de cultura. É importante saber também que não devemos utilizar *swab* tratado com carvão na coleta de amostras para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, pois o carvão deixa resíduos que interferem na qualidade da amostra. Caso precise usar *swab* tratado com carvão na coleta para cultura de gonococo, colher antes a amostra para *Chlamydia* com outro *swab*, para não alterar o resultado.

Para serem utilizados em testes, como imunofluorescência direta – IFD, ensaio imunoenzimático – ELISA e cultura de clamídias, o *swab* deverá ser de haste plástica ou de alumínio, pois o alumínio possui o diâmetro mais adequado para coleta de secreção uretral.

22.1.2. Teste de escolha para o diagnóstico da uretrite gonocócica

Para o sexo masculino, preconiza-se a bacterioscopia pela coloração de Gram, que é rápida e econômica, com sensibilidade de 95% nos pacientes masculinos.

A cultura do gonococo também pode ser feita, mas está reservada a casos de suspeita de resistência bacteriana aos antimicrobianos e bacterioscopia negativa, porém com forte suspeita clínica. Nestes casos, também podemos semear as amostras de secreção anal, orofaríngea e ocular.

Já nas mulheres, preconiza-se diretamente a cultura do gonococo, já que a bacterioscopia feminina apresenta baixa sensibilidade.

22.1.3. Testes de escolha para o diagnóstico das infecções por *Chlamydia*

O método “padrão ouro” é a cultura celular, porém de difícil execução e disponível em poucos laboratórios do país. O PN-DST/AIDS do Ministério da Saúde recomenda, em serviços com pequeno número de amostras, o teste de imunofluorescência direta (IFD); para serviços com grande rotina, os testes imunoenzimáticos do tipo ELISA e nas amostras reagentes, o teste confirmatório por *blocking* (reação de bloqueio) ou IFD (ver capítulo 1 deste volume).

22.1.4. Semeadura e armazenamento das amostras

22.1.4.1. Suspeitas de *N.gonorrhoeae* para cultura

Geralmente utiliza-se o meio de Amies, que é composto de sais balanceados e carvão, para transportar o material suspeito para o laboratório. Este meio de transporte preserva o gonococo viável para a semeadura, até no máximo 8 horas.

A semeadura é feita no meio de Thayer-Martin modificado, que possui, além da base específica para gonococos, hemoglobina, vitaminas e antibiótico. Este meio, após o preparo e semeadura, deverá ser incubado a 35°C em local com umidade e atmosfera de 3% a 7% de CO₂.

22.1.4.2. Suspeitas de outros agentes para cultura

As uretrites, vaginites e cervicites são, na sua grande maioria (95%), causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp. e *Gardnerella vaginalis*. Para exclusão de agentes, procede-se também à semeadura em outros meios, como o tioglicolato, o ágar sangue e o ágar MacConkey. Geralmente utiliza-se o meio de Stuart no transporte de amostras não gonocócicas (bastonetes Gram-negativos e cocos Gram-positivos), pois preserva as bactérias vivas até 24 horas.

22.2. Outras secreções e líquidos biológicos

Entre os possíveis agentes de infecções supurativas, na maioria das vezes, isolamos cocos Gram-positivos aeróbios. Trataremos aqui, dos gêneros e das espécies principais, de interesse para o laboratório de análises clínicas.

22.2.1. *Staphylococcus*

Como já foi comentado, este gênero possui três espécies de importância humana (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*). São microrganismos esféricos, imóveis, Gram-positivos, que crescem geralmente formando cachos irregulares.

Causam diferentes doenças supurativas no homem, tais como: furúnculo, impetigo, osteomielite, abscessos de tecidos, pneumonia, meningite, artrite purulenta, etc. Algumas estirpes produzem uma enterotoxina, levando os pacientes a um quadro agudo de intoxicação alimentar (*S. aureus*), e outras causam infecções do trato urinário (*S. aureus*, *S. saprophyticus*).

Podem crescer em meios de cultura simples, mas em laboratório clínico são normalmente cultivados em meio de ágar sangue. O meio de ágar sangue pode ser feito utilizando-se como base os meios de ágar Casoy, ágar cérebro, coração ou ágar sangue (base), e acrescentamos 5% de sangue desfibrinado estéril de carneiro. É muito utilizado também o meio de Chapman-Stone, ou de manitol salgado, que possui concentração de sal um pouco maior que os meios comuns, e o manitol, facilitando o diagnóstico de algumas espécies deste gênero.

Suas colônias são redondas, elevadas de 1 a 2 mm de diâmetro, opacas, de coloração amarelo-dourado a branco. Crescem em presença de altas concentrações de NaCl, sendo este, inclusive, um fator de estimulação da produção da enzima coagulase.

São inibidos pela presença de corantes (azul de metileno, violeta de genciana, etc.).

Exame bacteriológico

O material suspeito é semeado em ágar sangue e incubado a 37°C por 18 a 24 horas. Havendo o crescimento de colônias típicas (descritas anteriormente), fazemos a coloração de Gram para observarmos a presença de cocos Gram-positivos dispostos em grupos ou isolados. Para diferenciarmos o *Staphylococcus* do *Streptococcus*, utilizamos a prova da Catalase.

- Prova da catalase

Destina-se a verificar a presença da enzima catalase. A prova pode ser efetuada com os germes crescidos praticamente em qualquer meio de cultura, devendo-se somente evitar meios contendo sangue, para não interferir com falsos-positivos.

Em uma gota de solução fisiológica, sobre uma lâmina de vidro, emulsionamos a colônia de bactéria em estudo. Sobre a suspensão, pingamos uma gota de água oxigenada a 30%. A formação imediata de bolhas de O₂ indica prova positiva.

GÊNEROS	CATALASE
Streptococos	-
Estafilococos	+

- Prova do manitol

Usar o meio de cultura ágar manitol salgado. Distribuir em tubos inclinados ou em placas. Fazer semeadura da bactéria em estudo, em estrias, e incubar por 18 a 24 horas a 37°C.

Leitura: Positivo - amarelo na zona de repique. Negativo - cor natural (vermelho).

UTILIZAÇÃO DO MANITOL	
<i>S. aureus</i>	+
<i>S. epidermidis</i>	-
<i>S. saprophyticus</i>	-

- Prova de coagulase

A prova verifica a capacidade do microrganismo em coagular o plasma através da enzima coagulase. A coagulase estafilocócica se apresenta em duas formas: coagulase ligada e coagulase livre. A coagulase ligada converte fibrinogênio em fibrina diretamente, sem o envolvimento dos fatores de coagulação, e pode ser detectada em teste direto em lâmina (suspensão de *Staphylococcus* + 2 gotas de plasma citratado e em movimentos circulares, observar formação de coágulo num tempo de 1 a 2 minutos).

Pode se tornar mais sensível o teste em tubo, devido a este detectar tanto coagulase livre como coagulase ligada, sendo a prova de escolha. A coagulase livre reage com o fator de coagulação do plasma, o CRF, formando uma substância semelhante (mas não idêntica) à trombina, que, agindo indiretamente, converte fibrinogênio em fibrina. Utilizando plasma citratado humano ou de coelho, estéril, diluímos numa proporção 1:4 em solução fisiológica e distribuímos 0,5 mL em tubos 13 x 100.

Segundo alguns autores, a produção da enzima coagulase se intensifica quando a bactéria é cultivada em meio com alta concentração de NaCl, portanto, aconselhamos utilizar, para a prova, colônias crescidas em meio ágar manitol salgado. Este procedimento aumentará a sensibilidade do teste.

Semear uma alçada do germe em estudo em um tubo contendo o plasma diluído e incubar a 37°C por 24 horas.

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
COAGULASE	+	-	-

A menor coagulação é considerada prova positiva. Devem ser feitas leituras periódicas (a cada 2 horas), pois algumas espécies também produzem estafiloquinase, que ativa o fibrinogênio gerando plasmina que dissolve a rede de fibrina (coágulo formado).

Aconselhamos, também, utilizar sempre um teste-controle positivo com uma amostra de *S.aureus* previamente conhecida, como controle da qualidade do teste.

- Prova DNase

A presença de DNA no meio de cultura facilita a detecção de DNase de bactérias, especialmente para a identificação de *S.aureus*, assim como para outras espécies bacterianas.

Usar o meio de ágar DNase, distribuído em placas de Petri. Colocar na superfície do ágar um ponto definido de semeadura (spot) com a bactéria em estudo. Incubar em 35 a 37°C, por 18 a 24 horas.

Leitura: Gotejar, sobre o crescimento bacteriano, ácido clorídrico 1N e aguardar a turvação do meio. Caso o teste se apresente positivo, observaremos um halo claro ao redor do repique.

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
COAGULASE	+	-	-

Sensibilidade a discos impregnados com Novobiocina e Polimixina B:

SENSIBILIDADE	NOVOBIOCINA	POLIMIXINA B
<i>S. aureus</i>	S	R
<i>S. epidermidis</i>	S	R
<i>S. saprophyticus</i>	R	S

Resumo:

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
CATALASE	+	+	+
MANITOL	+	-	-
DNase	+	-	-
SENSIBILIDADE A NOVOBIOCINA	S	S	R
SENSIBILIDADE A POLIMIXINA B	R	R	S

22.2.2. *Streptococcus*

O gênero apresenta como espécies de interesse médico os *Streptococcus viridans*, os *Streptococcus*, produtores de hemólise β (*Streptococcus pyogenes*), o *Streptococcus pneumoniae*, e o "*Streptococcus faecalis*" (atualmente no gênero *Enterococcus*). Morfologicamente, se apresentam em forma de cadeia ou em pares e tintorialmente como Gram-positivos.

Os *Streptococcus* foram descritos, em 1874, por Billroth, causando pus em lesões de erisipela e em feridas. Em seguida, foram isolados do sangue de pacientes em estado febril e de garganta de criança com escarlatina.

Em 1903, Schottmüller propôs que os estreptococos fossem classificados conforme a capacidade de lisar hemácias *in vitro* e, em 1919, Brown chamou de *alfa* (α), *beta* (β) e *gama* (γ) as lises observadas nas hemácias em placa de ágar sangue (item 16.1 deste capítulo).

Os estreptococos alfa-hemolíticos apresentam zonas de hemólise, possuindo hemácias íntegras, na parte mais interna junto a colônia, e hemólise maior, na parte mais externa. Frequentemente, aparece uma coloração esverdeada na área de hemólise (devido à alteração das hemoglobinas pelo sistema oxidador da célula bacteriana), que originou a qualificação “estreptococos do grupo viridans”. O *Streptococcus pneumoniae* apresenta hemólise alfa e uma colônia puntiforme, com um aprofundamento no ápice da colônia (parecendo um pequeno vulcão).

Os estreptococos beta-hemolíticos produzem uma zona de hemólise total, não se observando hemácias íntegras (microscópio ótico com objetiva de 10 X). O *Streptococcus pyogenes* apresenta dois tipos de hemolisinas O e S. A hemolisina O é inibida pela ação do oxigênio atmosférico e, portanto, só demonstrada em colônias crescidas em profundidade no ágar sangue. A hemolisina S é estável ao oxigênio do ar e produz hemólise, mesmo nas colônias crescidas na superfície do meio de cultura. Como cerca de 15% dos *Streptococcus* apresentam hemolisina O, se torna necessário a semeadura pela técnica do ágar-fundido ou “pour plate” (ágar sangue resfriado a 45°C e incorporado à suspensão bacteriana em estudo). Alguns microbiologistas preferem produzir pequenas fendas nas placas (*stabs*) para introduzir a bactéria no interior do meio de cultura.

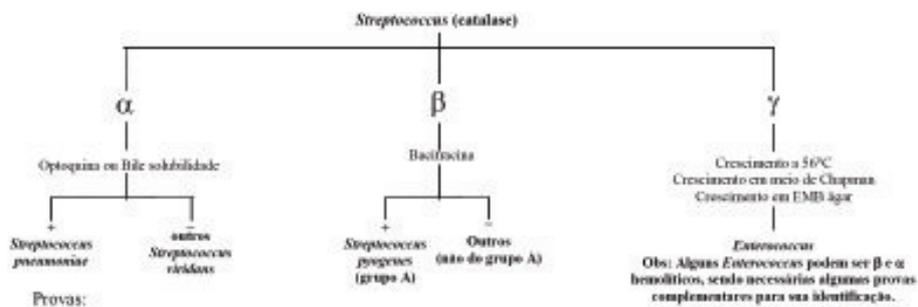
Os estreptococos gama não produzem hemólise e a espécie associada à patogenia humana foi para o gênero *Enterococcus* (*Streptococcus faecalis*).

• **Cultura (*Pour Plate*)**

Fazer uma suspensão do material colhido em um tubo contendo 1 mL de solução fisiológica estéril e adicionar a uma placa de Petri estéril. Juntar o ágar sangue resfriado e promover movimentos circulares para espalhar o inóculo por todo o meio.

Incubar a 37°C por 18 horas em atmosfera de microaerofilia (melhor rendimento), ou jarra com vela.

Leitura: observação do tipo de hemólise em ágar sangue:



Provas:

A. Optoquina

Colocar um disco de optoquina na superfície do ágar sangue (pode-se incluir no antibiograma). Havendo impedimento do crescimento das colônias ao redor do disco de optoquina (2 cm de diâmetro), trata-se de teste positivo.

B. Solubilidade da bile em caldo

Usada para identificação do *S. pneumoniae*, através do desoxicolato (reagente "biliar") que ativa as enzimas autolíticas do microrganismo (capazes de lisar seletivamente o *S. pneumoniae*, quando adicionados às células

bacterianas em fase de crescimento). A prova é realizada conforme esquema que se segue:

a) A 1,0 mL de cultura em caldo, (18-24h/35°C) adicionar uma gota de vermelho de fenol (1% em água).

b) Acertar pH em torno de 7,0 com NaOH 0,1 N (cor rósea).

c) Adicionar aproximadamente 4 gotas (0,5 mL) de desoxicolato de sódio (10%) ou bile. Incubar juntamente com um tubo sem bile (adicionado de 0,5 mL de salina) em estufa ou banho maria a 35°C por 3 horas, observando a cada hora.

Resultado: Solúvel em bile: Clareamento visível da suspensão do tubo com desoxicolato (o outro fica inalterado) – positivo. Insolúvel em bile: Inalterado, idêntico ao tubo controle – negativo.

C. Bacitracina

Utilizar discos impregnados com bacitracina (0,05 U) colocados na superfície do meio de cultura semeado com o germe em estudo (pode-se incluir no antibiograma) e incubar em 35 a 37°C por 24h, em atmosfera com baixo teor de O₂.

Interpretação - Grupo A - sensível a bacitracina.

Demais grupos – Resistentes.

Na prática do laboratório, sabemos que 10% das cepas de estreptococos do grupo C e G e 5% das do grupo B também podem ser sensíveis, por isso sugere-se fazer essa prova associada com a sensibilidade ao sulfametoxazol-trimetoprim, pois os microrganismos do grupo C e G são usualmente sensíveis.

D. Crescimento a 56°C

Para evitar dúvidas entre estreptococos e enterococos, submeter a cultura a um aquecimento de 56°C por 30 minutos. Somente os *Enterococcus* resistem a este tratamento.

E. Crescimento em meio de Chapman

Os enterococos toleram altas concentrações de NaCl, como acontece com os estafilococos. Isso diferencia os enterococos de estreptococos do grupo D (*S.bovis* e *S.equinus*). Podemos também semear a amostra em meio líquido, porém, com 6,5% de NaCl, incubar de 18 a 24 horas e verificar o crescimento.

F. Crescimento em ágar EMB

Os enterococos crescem na presença do corante azul de metileno.

G. Teste de CAMP (Christie, Atkins e Münch-Petersen)

Usado para identificação presuntiva de estreptococos do grupo B (*S.agalactiae*). Este teste é realizado usando uma cepa (ATCC 25923) de *Staphylococcus aureus* produtora de β -hemolisina, que tem sua atividade hemolítica intensificada por uma proteína extracelular (fator CAMP), formada por estreptococos do grupo B (hemolíticos ou não), produzindo uma hemólise “sinérgica” em ágar sangue. Essa prova deve ser realizada em conjunto com outras, pois alguns estreptococos do grupo A também podem promover tal reação.

23. Apêndice

A. Método de Giemsa

- O Giemsa é um corante utilizado em Microbiologia, Hematologia e Histologia para coloração de células.
- Após confecção de um esfregaço fino, deixá-lo secar ao ar e fixá-lo por 3 minutos com álcool etílico.
- Cobrir a lâmina com a solução de Giemsa diluída e deixar corar de 20 a 30 minutos.
- Após o tempo necessário, lavar com forte jato de água e secar entre papel de filtro.

- Diluição do corante:

- A solução de Giemsa deverá ser diluída com água destilada neutra (pH 7 a 7,2) no momento do uso.
- A diluição deve ser feita pelo gotejamento do corante sobre a água sem agitação vigorosa.
- A diluição para a coloração de 30 minutos corresponde a 2 gotas por mL de corante.

B. Meio de Loewenstein-Jensen

Utilizado para isolamento primário de micobactérias, este meio vem sendo substituído por outros mais sensíveis para recuperação de amostras clínicas, como o ágar 7H10 e 7H11 de Middlebrook, porém ainda é usado em muitos laboratórios clínicos.

Componentes:

Fosfato monopotássico anidro.....	2,4 g
Sulfato de magnésio 7 H ₂ O.....	0,24 g
Citrato de magnésio.....	0,60 g
L-Asparagina.....	3,6 g
Fécula de batata.....	30 g
Ovos homogeneizados.....	1000 mL
Glicerina bidestilada.....	12 mL
Água destilada.....	600 mL
Solução de verde de malaquita a 2%.....	20 mL

Solução de verde de malaquita à 2% - Fórmula:

Verde de malaquita2 g
Água destilada100 mL

Preparo da solução de verde de malaquita:

1. Pesar o verde de malaquita e adicionar a água.
2. Homogeneizar bem até dissolver o corante.
3. Esterilizar em vapor fluente durante 30 minutos.
4. Reservar a solução.

Preparo do meio:

- a) Dissolver os sais e a asparagina na água (dissolver aquecendo lentamente);
- b) Juntar os outros componentes, menos os ovos e o verde de malaquita, e autoclavar a 120°C por 30 minutos.
- c) Resfriar a base à 45 - 50°C.
- d) Tomar 2 dúzias de ovos frescos, lavar bem com água e sabão, escovando cada ovo individualmente com uma escova macia, e imergir durante 30 minutos em álcool etílico a 70°. Secá-los com pano estéril.
- e) Quebrar os ovos semiassepticamente em frasco estéril, transferindo-os para uma proveta estéril de 1000 mL até completar o volume.
- f) Agitar para homogeneizar (poderá utilizar liquidificador estéril ou balão estéril com pérolas de vidro).
- g) Filtrar em quatro camadas de gaze passando para o balão que contém a base fria.
- h) Adicionar o verde de malaquita.
- i) Homogeneizar bem.
- j) Deixar repousar durante 30 minutos para as bolhas da superfície estourarem.

- k) Distribuir 10 a 12 ml por tubo de rosca estéril.
- l) Colocar os tubos no coagulador, inclinados (ângulo de 45°), durante 50 minutos a 85°C - se não tiver coagulador, pode-se coagular os ovos em banho de areia à 85°C colocado em estufa de esterilização, também por 50 minutos, tendo o cuidado de verificar a temperatura constantemente. Pode-se também usar o forno a 85 °C ou mesmo em autoclave fechada, sem expulsão do ar (verificar temperatura).
- m) Incubar por 48h a 36°C (teste de esterilidade), proteger contra a evaporação e conservar em geladeira. Usar, no máximo, até um mês após o preparo.

C - Hidrólise do hipurato

Verifica a capacidade do microrganismo de hidrolisar o hipurato de sódio em glicina e ácido benzoico. Pode ser utilizado para diferenciar distintos microrganismos como estreptococos do grupo B (*S.agalactiae*) ou mesmo espécies termofílicas de *Campylobacter* (*C.jejuni* + e *C.coli* -).

O microrganismo é semeado em caldo com o hipurato de sódio e incubado por 18 a 24h a 35°C. Após este período o caldo é centrifugado e no sobrenadante (0,8 mL) é adicionado 0,2 mL de cloreto férrico (FeCl) formando um precipitado abundante que, se perdurar por mais de 10 minutos, evidencia a presença do ácido benzoico (prova do hipurato positiva). Outra alternativa é usar o reagente de ninhidrina que detecta a glicina livre. Neste caso há a formação de coloração azul-escura.

No caso de *Campylobacter*, suas exigências de crescimento dificultam a incubação descrita, então uma massa de células proveniente de crescimento anterior é acrescentada ao caldo hipurato para realização da prova.

D- Métodos de teste de sensibilidade aos antimicrobianos para anaeróbios sugerido pelo CLSI

Método de diluição em ágar:

- Escolher o antimicrobiano a ser testado.
- Diferentes concentrações dos antimicrobianos são misturadas ao ágar Wilkins-Chalgren, o qual é fundido e vertido em placas de Petri.
- Até 36 isolados são testados para cada placa por inoculação pontual (repicador de Steers ou similar).
- Após 48h em jarra hermética tipo GasPak ou câmara de anaerobiose, faz-se a leitura (determina a CIM).
- Este método, apesar de muito funcional, é complicado para *Clostridium* sp. que apresentam crescimento disseminado.

Método de diluição em caldo em microtubos (DM)

- A CIM dos diferentes antimicrobianos é determinada em placas de microtitulação.
- Os meios de escolha de acordo com o CLSI são o caldo BHI, o caldo de Schaedler modificado e o de Wilkins-Chalgren (WC) – Já outros órgãos padronizadores, como o IUMC, sugerem Difco Anaerobe Broth.
- O meio com as diferentes concentrações dos antimicrobianos (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL) é distribuído em placa de microtitulação - 0,1mL para cada uma das 96 cubetas da placa com pipeta semiautomática. Estas placas poderão se armazenadas em plásticos e congeladas em freezer a -70°C, de 4 a 6 meses.
- No momento da utilização, descongela-se a placa em temperatura ambiente e adiciona-se o cultivo ativo (18 a 24hs) em caldo Schaedler, diluído 1:100 – incuba-se por 48hs em anaerobiose.

Podemos, então, ler a CIM (menor concentração que inibe completamente o crescimento), que corresponde à cubeta límpida.

Tabela de percentuais de positividade, para diferenciação bioquímica, simplificada das principais *Enterobacteriaceae* estudadas na clínica

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella</i> , grupos A, B, C		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Escherichia coli</i> tardia		<i>Salmonella</i> Typhi		<i>Salmonella</i> Choleraesuis		<i>Salmonella</i> Larhagensis subg. IIIa		<i>Salmonella</i> Larhagensis subg. IIIb		<i>Citrobacter</i>		<i>Clebsiella</i>		<i>Enterobacter</i>					<i>Pantoea agglomerans</i>		<i>Hafnia alvei</i>		<i>Serratia</i>		<i>Proteus</i>		<i>Morganella morganii</i>		<i>Providencia</i>		<i>Yersinia</i>	
	Indol	Vermelho de metila	Voges-Proskauer	Citrato de Simmons	H ₂ S (TSI)	Urease	KCN	Motilidade (36°C)	Gelatina (22°C)	Lisina-Decarboxilase	Arginina-Dihidrolase	Omitina-Decarboxilase	Fenilalanina-Decarboxilase	Malonato	Gás de Glicose	Lactose	Sacarose	D-Manitol	Dulcitol	Salicina	Adonitol	Mio-Inositol	D-Sorbitol	L-Arabinose	Rafinose	L-Raminose	Esculina	DNase (25°C)	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol	Indol
Indol	98	50	0	99	0	0	2	0	33	99	100	0	99	0	0	0	11	20	0	1	1	0	2	98	98	99	98	99	50	0	0								
Vermelho de metila	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	20	5	5	5	5	50	40	20	93	20	97	95	97	93	100	99	97	80	100								
Voges-Proskauer	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	95	98	100	100	70	85	98	93	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0									
Citrato de Simmons	1	0	0	1	25	25	99	98	78	99	95	98	95	95	100	99	99	50	10	98	90	95	65	15	0	95	93	98	0	0									
H ₂ S (TSI)	1	0	0	100	50	50	99	100	78	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	95	5	0	0	0	0	0									
Urease	1	0	0	0	0	0	0	2	44	75	85	95	90	2	65	93	1	20	4	15	3	2	98	95	98	98	30	0	75	5	95								
KCN	3	0	0	0	0	0	1	95	89	0	99	98	97	98	98	0	99	65	95	95	90	25	98	99	98	97	100	100	2	0	0								
Motilidade (36°C)	95	0	0	98	95	95	99	99	89	95	95	0	0	97	95	90	96	85	85	97	95	85	95	95	95	94	85	96	2	0	0								
Gelatina (22°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	89	0	99	0	0	0	0	0	0	2	0	90	90	90	91	0	0	0	0	0	0	0	0								
Lisina-Decarboxilase	90	0	0	100	95	95	99	100	0	0	0	98	99	98	0	90	0	100	99	95	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Arginina-Dihidrolase	17	5	2	0	55	55	70	70	65	80	85	0	0	0	97	0	99	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
Omitina-Decarboxilase	65	1	98	100	100	100	99	100	0	99	95	0	0	98	96	100	91	0	98	99	95	0	99	0	98	0	0	1	95	0	0								
Fenilalanina-Decarboxilase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	50	20	0	0	0	0	98	99	95	98	95	98	0	0	0								
Malonato	0	0	0	0	0	0	95	0	11	95	1	95	98	95	55	96	18	65	50	3	2	94	2	0	1	0	0	0	0	0	0								
Gás de Glicose	95	2	0	100	95	95	85	0	89	98	97	97	97	100	100	98	98	20	98	55	75	30	96	85	90	10	0	85	5	0	0								
Lactose	95	0	2	0	0	0	85	0	78	50	35	98	100	95	93	55	99	40	5	2	10	100	2	2	1	5	2	0	5	0	0								
Sacarose	50	0	1	0	0	0	5	0	89	40	9	99	100	100	97	98	100	75	10	99	98	99	15	97	0	15	50	15	95	0	0								
D-Manitol	98	93	99	0	98	98	100	98	100	99	100	99	99	100	99	100	99	100	99	99	100	100	0	0	0	100	10	2	98	97	100								
Dulcitol	60	2	0	0	5	5	1	0	11	40	1	30	55	5	15	0	5	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
Salicina	40	0	0	0	0	0	0	60	0	15	30	99	100	100	75	99	99	65	13	95	97	99	0	50	0	50	2	1	20	70	25								
Adonitol	5	0	0	0	0	0	0	0	0	98	0	90	99	98	25	0	0	7	0	40	5	99	0	0	0	100	5	98	0	0	0								
Mio-Inositol	1	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	95	98	95	15	0	75	15	0	75	60	20	0	0	0	90	95	1	30	0	0								
D-Sorbitol	94	30	2	0	90	90	99	99	100	99	99	99	99	100	95	0	0	30	0	99	95	1	0	0	0	1	1	1	99	50	0								
L-Arabinose	99	60	95	9	0	0	99	99	100	100	99	99	98	100	100	99	100	95	95	0	98	100	0	0	0	0	1	1	98	100	50								
Rafinose	50	50	3	0	1	1	1	1	44	0	5	99	100	96	97	97	99	30	2	2	85	99	1	1	0	5	7	1	5	0	15								
L-Raminose	80	5	75	0	100	100	99	99	99	100	99	99	100	99	92	99	100	85	97	0	15	1	1	5	0	70	0	0	1	1	70								
Esculina	35	0	0	0	0	0	1	1	0	1	5	99	100	98	30	97	100	60	7	95	97	94	0	50	0	35	0	0	25	50	95								
DNase (25°C)	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	98	85	99	50	80	0	0	10	0	5	0	0								

Obs₁: *Shigella* grupo A, B, C diferenciação: Grupo A: manitol (-), Grupo B e C: manitol (+). A diferenciação final é sorológica.

Obs₂: Para identificação completa de *Salmonella* e *Escheria coli*, deverá ser realizada sorologia complementar.

(Tabela de Farmer *et al.*, 1985, atualizada com informações contidas em Koneman, 2001 e Jawetz *et al.*, 2009.)

Referências bibliográficas

- ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbio.* Atlanta, v. 45, p. 2723-2725, 2007.
- BATISTA, R. S. ; GOMES, A. P. *Antimicrobianos - Guia Prático*. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2005. 330 p.
- BELL, J. M. *et al.* Prevalence and significance of a negative extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmation test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Results from the Sentry Asia-Pacific surveillance program, *J. Clin. Microbiol.* v. 45, p. 1478-1482, 2007.
- BIER, O. *Microbiologia e Imunologia*. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1234 p.
- CARDOSO, W. M. ; SILVA, G. G. *Microbiologia em Análises Clínicas*. 2. ed. Rio de Janeiro: Merck, 1989. 79 p.
- CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. 7. ed. Pennsylvania: CLSI approved standard M7–A7, 2006.
- _____. *Performance standards for antimicrobial disk tests*. 9. ed. Pennsylvania: CLSI approved standard M2–A9, 2006.
- _____. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement*. Pennsylvania: CLSI document M100-S18, 2006.
- DAVIS, B. D. ; DULBECCO, R. *Microbiologia de Davis – Fisiologia e Genética Bacterianas*. Vol I. 2ª ed., São Paulo: Harbra do Brasil, 1979. 421 p.
- DAVIS, B. D. ; DULBECCO, R. *Microbiologia de Davis – Infecções Bacterianas e Micóticas*. Vol III. 2. ed. São Paulo: Harbra do Brasil. p. 759, 1979. 1219 p.
- FARMER, J. J. I. I. I. ; DAVIS, B. R. ; HICKMAN-BRENNER, F. W. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated clinical specimens. *American: Journal of Clinical Microbiology*, v. 21: p. 46-76, 1985.
- FERREIRA, A. W. ; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e autoimunes*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.
- GILMAN A. G. ; GOODMAN, L. S. ; RALL, T. W; MURAD, F. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2002. 1647 p.
- HARVEY, R. A; CHAMPE, P. C. *Farmacologia Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 478 p.
- JAWETZ, E. ; MELNICK, J. L. ; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 24. ed., McGraw-Hill Medical. 2009. 820p.

- KONEMAN, E. W. *et al.* *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.
- LIVERMORE, D. M. ; WINSTANLEY, T. G. ; SHANNON, K. P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *London J Antimicrob Chemother.* v. 48(supl.1). p. 87-102, 2001.
- MIMS, C. *et al.* *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Medicina Brasil, 2005. 728 p.
- MURRAY, PR. *et al.* *Microbiologia Médica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 992 p.
- NORDMANN, P. ; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Paris. *Clin Microbiol Infect Dis.* v. 8. p. 321-331, 2002.
- OPAS, ANVISA, REDE RM, CGLAB/SVS/MS. *Medidas de prevenção e controle da resistência microbiana e programa de uso racional de antimicrobianos em serviços de saúde*. São Paulo: Disciplina de Infectologia da UNIFESP, 2007.
- OPLUSTIL, C. P. *et al.* *Procedimentos básicos em Microbiologia clínica*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 2004. 340p.
- PELCZAR, M. ; CHAN, E. C. S. ; KRIEG N. R. *Microbiologia*. Vol I. Rio de Janeiro: Makron Books (Grupo Pearson). 2. ed, 2005. 524 p.
- _____. *Microbiologia*. Vol II. Rio de Janeiro: Makron Books (Grupo Pearson). 2. ed, 2005. 517 p.
- PICÃO, RC. *et al.* Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-or VIM-producing isolates. São Paulo. *J Clin Microbiol*; v.46, 2028-2037, 2008.
- ROSSI, F. ; ANDREAZZI, D. B. *Interpretando o antibiograma*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 118p.
- SCHAECHTER, M. *et al.* *Microbiologia - Mecanismos das Doenças Infecciosas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 642 p.
- TINDALL, B. J. *et al.* Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. Germany. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 55, p. 521-524, 2005.
- TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.
- TRABULSI, L. R. ; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51:221-271, 1987.
- WOESE, C. ; KANDLER, O. ; WHEELIS, M. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci ,USA*, v. 87, n. 12, p. 4576-9,1990.

