



Bacteriologia Clínica

Bacteriologia Clínica

Carolina de Oliveira Splendore

© 2018 por Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Todos os direitos reservados. Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, eletrônico ou mecânico, incluindo fotocópia, gravação ou qualquer outro tipo de sistema de armazenamento e transmissão de informação, sem prévia autorização, por escrito, da Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Presidente

Rodrigo Galindo

Vice-Presidente Acadêmico de Graduação e de Educação Básica

Mário Ghio Júnior

Conselho Acadêmico

Ana Lucia Jankovic Barduchi

Camila Cardoso Rotella

Danielly Nunes Andrade Noé

Grasiele Aparecida Lourenço

Isabel Cristina Chagas Barbin

Lidiane Cristina Vivaldini Olo

Thatiane Cristina dos Santos de Carvalho Ribeiro

Revisão Técnica

Priscila Perez Domingos

Editorial

Camila Cardoso Rotella (Diretora)

Lidiane Cristina Vivaldini Olo (Gerente)

Elmir Carvalho da Silva (Coordenador)

Leticia Bento Pieroni (Coordenadora)

Renata Jéssica Galdino (Coordenadora)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Splendore, Carolina de Oliveira
S761b Bacteriologia clínica / Carolina de Oliveira Splendore. –
Londrina: Editora e Distribuidora S.A., 2018.
192 p.

ISBN 978-85-522-0531-9

1. Diagnóstico bacteriológico. 2. Diagnóstico
microbiológico. I. Splendore, Carolina de Oliveira. II. Título.

CDD 616.9201

Thamiris Mantovani CRB-8/9491

2018

Editora e Distribuidora Educacional S.A.

Avenida Paris, 675 – Parque Residencial João Piza

CEP: 86041-100 – Londrina – PR

e-mail: editora.educacional@kroton.com.br

Homepage: <http://www.kroton.com.br/>

Sumário

Unidade 1 Estrutura, fisiologia e crescimento bacteriano	7
Seção 1.1 - Características bacterianas	9
Seção 1.2 - Crescimento e metabolismo bacteriano	23
Seção 1.3 - Microbiota normal	37
 Unidade 2 Cocos patogênicos Gram-positivos de interesse clínico	 53
Seção 2.1 - Cocos Gram-positivos: gênero <i>Staphylococcus</i>	55
Seção 2.2 - Cocos Gram-positivos: gênero <i>Streptococcus</i>	67
Seção 2.3 - Cocos Gram-positivos: família <i>Enterococcaceae</i> e Gram-negativas: família <i>Enterobacteriaceae</i>	81
 Unidade 3 Cocos patogênicos gram-negativos de interesse clínico	 95
Seção 3.1 - Gram-negativos fermentadores	97
Seção 3.2 - Gram-negativos não fermentadores	110
Seção 3.3 - Diagnósticos de bacilos gram-negativos	122
 Unidade 4 Características gerais e patogênicas de bactérias fastidiosas	 143
Seção 4.1 - Espiroquetídeos	145
Seção 4.2 - Gênero <i>Mycobacterium</i>	159
Seção 4.3 - <i>Corynebacterium diphtheriae</i> e <i>Chlamidia</i> sp	174

Palavras do autor

Bem-vindo, aluno, à disciplina de Bacteriologia Clínica. Nela, você irá estudar as bactérias, sua constituição e estrutura. Irá entender como ocorre sua reprodução, fisiologia e seu metabolismo. A bacteriologia é uma ciência da área da Biologia. Está dentro da microbiologia, sendo uma subdivisão dela. A microbiologia estuda todos os seres microscópios em geral, enquanto a bacteriologia estuda especificamente as bactérias. Desse modo, iremos entender como as bactérias causam as doenças no organismo humano e a forma correta de tratamento.

As competências trabalhadas nesta disciplina serão conhecer as patologias referentes aos microrganismos do metabolismo, microbiota normal e aos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, além de conhecer e diferenciar bacilos gram-negativos e as patologias referentes ao *Treponema pallidum*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Clamidia sp.*

Este livro será dividido em quatro unidades. Na primeira, iremos trabalhar a “Estrutura, fisiologia e crescimento bacteriano”; a seguir, “Cocos patogênicos gram-positivos de interesse clínico”; na terceira unidade, “Cocos patogênicos gram-negativos de interesse clínico”; e, por fim, as “Características gerais e patogênicas de bactérias fastidiosas”.

Esses assuntos são de fundamental importância para a sua formação e farão parte de sua rotina diária de trabalho. Vale lembrar que o autoestudo desta disciplina é de extrema importância para agregar mais conhecimento, portanto busque artigos sobre bacteriologia geral, clínica e laboratorial, veja vídeos sobre o assunto, discuta com seus colegas e descubra cada vez mais sobre essa ciência multidisciplinar.

Leia cada parágrafo deste livro com muita atenção e curiosidade. Você está prestes a descobrir um mundo novo de microrganismos causadores de doenças de grande interesse clínico.

Bons estudos!

Estrutura, fisiologia e crescimento bacteriano

Convite ao estudo

Caro aluno, vamos iniciar os estudos em bacteriologia clínica. Para começar, falaremos sobre a estrutura, fisiologia e crescimento bacteriano. Você irá descobrir sobre o tamanho das bactérias, os diferentes tipos de morfologia e como se reproduzem.

Irá conhecer, ainda, as patologias referentes aos microrganismos do metabolismo e da microbiota normal e, ao final deste conteúdo, será capaz de elaborar uma tabela contendo as principais patologias causadas pelos microrganismos da microbiota normal.

Para tanto, buscando auxiliar no desenvolvimento das competências e objetivos desta unidade, apresentamos o seguinte contexto: Ricardo é um rapaz de 22 anos, alto, tem um corpo atlético e é fanático por esportes. Ricardo pratica natação três vezes por semana, faz musculação diariamente e joga futebol com os amigos aos finais de semana. Após um jogo de futebol, ele foi com um grupo de amigos à churrascaria e, como de costume, comeu muita salada, legumes, entradas e todo o tipo de carne, sendo sempre mal passada, além de sua sobremesa predileta, mousse de chocolate.

Após dois dias, Ricardo começou com um quadro de cólica e diarreia, mas não deu muita importância, acreditando se tratar de uma simples virose. No dia seguinte, como os sintomas persistiram, Ricardo, acompanhado de seu irmão Rafael, procurou o pronto-socorro mais próximo em busca de atendimento. Após uma hora, com base em seus sintomas e sinais vitais, Ricardo foi liberado e orientado a fazer repouso e tomar muito líquido.

Caro aluno, esse será um dos casos diários que poderão ocorrer na sua vida profissional depois de formado, o qual deverá auxiliar as equipes multidisciplinares na investigação e descoberta das patologias que acometem diariamente os pacientes em um hospital.

Nesta unidade, você irá verificar sobre as características bacterianas, seu crescimento e metabolismo, assim como se apresenta a microbiota normal humana.

Está preparado? Vamos começar a invadir o universo dessas minúsculas "criaturas".

Seção 1.1

Características bacterianas

Diálogo aberto

Prezado aluno, você iniciou seus estudos sobre bacteriologia clínica e está empenhado para aprender e entender cada vez mais sobre esta disciplina.

Para começar, vamos retomar a situação de Ricardo, aquele rapaz atleta que, após uma churrascada, começou com um quadro de cólica e diarreia, e, sem apresentar melhoras, foi a um pronto-socorro acompanhado de seu irmão Rafael, onde foi orientado a fazer repouso e tomar muito líquido.

Dessa forma, você irá auxiliar Rafael, irmão de Ricardo, a compreender melhor essa situação.

Rafael, o irmão caçula de Ricardo, tem 20 anos e cursa Enfermagem. Ele estava muito preocupado com o irmão e inconformado pelo “rápido” atendimento no pronto-socorro e como o médico não aprofundou mais para o diagnóstico de seu irmão. Ele custa a acreditar que sequer foram coletadas amostras de fezes, sangue ou urina.

Se você fosse o médico que atendeu Ricardo, iria solicitar a coleta de amostras conforme citado por Rafael? Justifique.

Não pode faltar

Características bacterianas

Para iniciar, vamos entender o que é a bacteriologia. A bacteriologia é o estudo das bactérias. É a ciência que estuda uma parte da microbiologia. Lembrando que a microbiologia é um ramo da biologia que estuda os microrganismos. E os microrganismos de maior importância são os fungos, as bactérias e os vírus. O vírus, embora não seja considerado um ser vivo, apresenta características de células vivas.

Dessa forma, pensando em bactérias, é muito importante conhecer esses microrganismos e suas ações, entender como são constituintes da microbiota normal e como causam doenças.

Como já falamos anteriormente, as bactérias são seres muito pequenos (microrganismos), portanto observadas em microscopia óptica, com um tamanho que pode variar de 0,2 micrômetro (μm) de diâmetro a 10,0 μm de comprimento.

Morfologia das células bacterianas

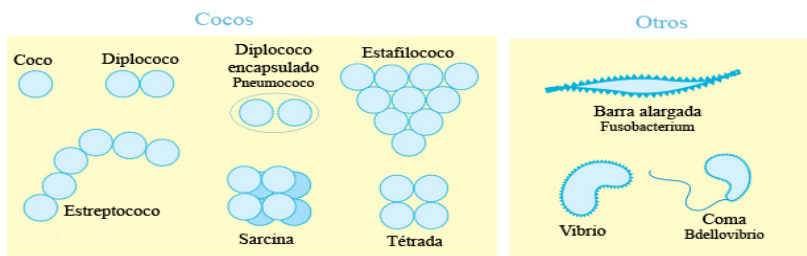
Existem três formas de bactérias: bastonetes ou bacilos, espirilos e cocos.

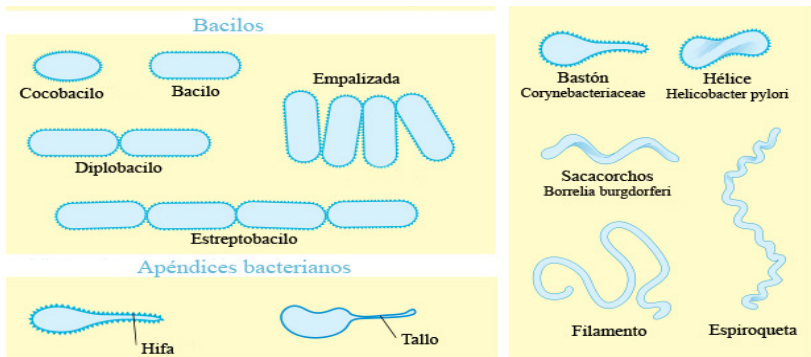
Bastonetes ou bacilos são bactérias retangulares ou em forma de bastão, podendo ser longos ou curtos, com a extremidade reta ou com a ponta arredondada, muitas vezes em formato de vírgula. Podem ser encontradas isoladas ou agrupadas, aos pares (diplobacilos) e em cadeias (estreptobacilos).

Espirilos são bactérias que possuem formato de hélice ou espiral e se apresentam de forma isolada.

Cocos são bactérias redondas que possuem formato de esfera. Assim como os bastonetes, podem ser encontradas de forma isolada ou agrupada, mas também em arranjo de duas esferas (diplococos), em cadeia (estreptococos) a qual apresenta um aspecto que lembra um colar de pérolas, agrupadas de forma aleatória (estafilococos), remetendo, muitas vezes, ao formato de um cacho de uva, em grupo de quatro cocos unidos (tétrades) e em grupo de oito cocos unidos em formato de cubo (sarcinas).

Figura 1.1 | Morfologias bacterianas





Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/65/Bacterial_morphology_diagram_pt.svg>. Acesso em: 31 ago. 2017.

Citologia bacteriana

As bactérias fazem parte do reino monera. São seres vivos unicelulares, possuem uma única célula e fazem parte do grupo das células procariotas, ou seja, não possuem membrana nuclear, chamada de carioteca. Se comparadas às células eucarióticas, são mais simples, exceto pelo seu envoltório nuclear.

Os principais elementos da estrutura de uma bactéria são: citoplasma, membrana plasmática, parede celular, cápsula, flagelos e pili (fimbrias).

Vamos começar entendendo a parte externa de uma bactéria.

Membrana plasmática, membrana celular ou membrana citoplasmática: é uma membrana que isola a célula do meio exterior. Toda célula, seja eucarionte ou procarionte, possui essa membrana. Por ser muito fina, não é possível ser observada em microscopia óptica, apenas em microscopia eletrônica. Constituída de proteínas e fosfolípidos, possui uma membrana seletiva (seletivamente permeável), ou seja, é capaz de escolher, de controlar as substâncias que entram e saem da célula.

É responsável pela produção de energia e divisão celular.

Parede celular: possui estrutura bem rígida, o que confere a sua forma (cocos, bacilos) e também proteção e resistência às estruturas internas. Formada principalmente por peptidoglicanos (mureína ou mucopeptídeo).

Sua espessura e composição vão variar de acordo com a espécie de bactéria. A parede celular das células gram-positivas

possui várias camadas de peptidoglicano (cerca de 90% da parede), enquanto a parede celular gram-negativa possui poucas camadas de peptidoglicanos (cerca de 10%), o que pode ser verificado na diferença de coloração (azul ou vermelho) no processo de coloração de Gram, que veremos mais adiante.

Cápsula: estrutura mucosa; sua composição principal são os polissacarídeos. Possui localização externa a parede celular. É um envoltório protetor que atua na defesa da bactéria e que confere maior resistência à bactéria.

Flagelos: formados por apêndices muito finos (10 a 20 nm de espessura), são responsáveis pelo movimento, pela locomoção e estão presentes em algumas bactérias. Seu comprimento normalmente é muito maior que o tamanho da célula e seu diâmetro é pequeno. Podem ser únicos ou múltiplos, distribuídos ou não por toda a célula. Quando os flagelos são distribuídos por toda a superfície da célula, as bactérias são chamadas de *bactérias peritríquias*. Quando há tufo de flagelos localizados em uma única extremidade, são chamadas de *bactériaslafotríquias* e, nos casos de um ou mais flagelo em cada extremidade, são denominadas de *bactériasanfitríquias*. Temos ainda as bactérias com um único flagelo polar, nomeadas de *bactériasmonotríquias*.

Pili ou fímbrias são apêndices muito finos, mais finos que os flagelos, e apresentam estrutura rígida. São responsáveis pela aderência e transporte de material genético.

Na parte interna da célula, temos o citoplasma, que, na célula bacteriana, ocupa todo o espaço intracelular, é viscoso e rico em proteínas. É responsável por manter a estrutura da célula, mantendo sua forma e consistência, além de armazenar os ribossomos, organela citoplasmática responsável pela síntese proteica.



Refleta

Em que local da célula os antibióticos agem para combater a infecção bacteriana e como eles atuam?

Os antibióticos agem na parede celular, síntese proteica e na síntese de ácidos nucleicos (DNA/RNA), sendo divididos em duas classes:

Bactericidas: atuam na membrana plasmática ou parede celular bacteriana, impedindo a sua produção e, consequentemente, a sua destruição.

Bacteriostáticos: impedem a multiplicação e proliferação bacteriana, agindo sobre o DNA bacteriano, bloqueando a replicação, a transcrição e a síntese de proteínas.

Características dos meios de cultura (rico, seletivo, diferencial, diferencial indicador e de transporte)

Meios de cultura são preparações sólidas, semissólidas ou líquidas, simples ou complexas, estéreis que permitem o crescimento de microrganismos.

Possuem funções de fornecer nutrientes para o crescimento bacteriano – cultivo in vitro, podendo ser específicos para cada microrganismo ou não, identificam sua família, gênero e espécie e formam cultura bacteriana a partir de um inóculo.



Assimile

Um inóculo é uma amostra de material contendo geralmente uma pequena quantidade de microrganismos.

Para que ocorra o crescimento de microrganismos, são necessários fatores físicos e químicos:

- Fatores físicos: temperatura, pH e pressão osmótica.
- Fatores químicos: fontes de carbono e nitrogênio (proteínas, carboidratos e lipídeos), enxofre (síntese de proteínas e vitaminas), fósforo (síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos da membrana celular), oligoelementos (ferro, cobre, molibdênio, zinco – atividade enzimática), oxigênio (alguns são anaeróbicos) e fatores orgânicos de crescimento.

Classificação dos meios de cultura

Quanto à consistência: líquidos, semissólidos e sólidos

Líquidos ou caldos são aqueles em que os nutrientes estão dissolvidos em uma solução aquosa e acondicionados em tubos de ensaio. O crescimento bacteriano nesse meio muda seu aspecto, ou seja, o meio sofre uma turvação.

Semissólidos possuem na sua composição, além dos nutrientes, uma pequena porcentagem de um polissacarídeo proveniente de algas marinhas, chamado ágar, utilizado como agente solidificador (semelhante à gelatina), este ágar é adicionado ao meio líquido. São geralmente utilizados em tubos.

Sólidos são aqueles que possuem em sua constituição, além do meio líquido, uma porcentagem maior de ágar. Podem ser dispostos em tubos ou em Placas de Petri, de acordo com a necessidade onde o meio se solidifica.

Quanto à função dos meios de cultura: rico, seletivo, diferencial, diferencial indicador e de transporte

Rico ou enriquecimento: geralmente são líquidos, ricos em nutrientes. Sua finalidade é permitir que as bactérias contidas em uma amostra aumentem de número. Ao meio de cultura comum são adicionadas substâncias enriquecedoras, como sangue, soro, ovo, extrato de leveduras etc. Ex. : Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Caldo Tetratonato.

Seletivo: ao meio comum são adicionados inibidores que tornam inviável o crescimento de certos microrganismos, com a finalidade de selecionar as espécies que se deseja isolar e impedir o desenvolvimento de outros germes.

Ex.: ágar MacConkey, que inibe o crescimento de bactérias gram-positivas, podendo, dessa forma, selecionar as gram-negativas.

Diferencial: permite a diferenciação, a distinção de vários gêneros e espécies de microrganismos. Em sua composição, possui substâncias que permitem diferenciar microrganismos parecidos (evidenciada na mudança na coloração das colônias de bactérias).

Ex: ágar MacConkey, utilizado para diferenciar bacilos gram-negativos isolados de amostras de fezes.

Indicador/diferencial indicador: possibilita a análise das propriedades bioquímicas e verificação de funções fisiológicas e de microrganismos, facilitando sua identificação. O mais simples é aquele usado no estudo das reações de fermentação, indicando se o organismo fermenta a lactose ou não pela coloração das colônias. Ex.: ágar Triple Sugar Iron (TSI) e ágar Citrato de Simmons.

Transporte: não possui nutrientes, contendo apenas um agente redutor (tioglicolato ou cisteína). Previne a desidratação de secreções

durante o transporte e evita a oxidação e autodestruição enzimática dos patógenos presentes. Ex.: Meio de Stuart, Meio de Cary-Blair e Caldo Tioglicolato.



Exemplificando

Os tipos de meios de cultura (rico, seletivo, diferencial, indicador e de transporte) não são exclusivos, apenas com uma única função. Como vimos anteriormente, o ágar MacConkey, por exemplo, é tanto um meio seletivo quanto diferencial.

Meios de cultura: preparo e utilização

O preparo de meio de cultura é uma técnica bem simples que lembra o preparo de uma gelatina. A seguir, veremos o passo a passo da técnica:

Antes de começar, é importante checar a recomendação do fabricante com relação ao preparo, verificar a quantidade a ser pesada de acordo com o volume que será preparado e, se necessário, ajustar a quantidade utilizando regra de três.

Ex: Agar Muller. No frasco do fabricante, consta a informação que se deve pesar 36 gramas para o preparo de 1 L. Se for preparar 200 mL, com uma regra de três básica, chega-se ao resultado de 7,2 gramas para 200 mL.

Passo a passo:

- Pesar o ágar a ser trabalhado em uma balança analítica ou semianalítica com o auxílio de uma papel-alumínio ou béquer. Importante tarar a balança (zerar) antes de colocar o pó para pesagem.
- Transferir o ágar para um béquer com capacidade maior que o volume a ser trabalhado.
- Medir o volume de água destilada ou deionizada, com o auxílio de uma proveta, e adicionar ao ágar metade do volume da água.
- Dissolver o ágar na água com o auxílio de um bastão de vidro, após a solução ficar homogênea acrescentar o restante da água.
- Transferir a solução para um erlenmeyer.

- Com o auxílio do bico de Bunsen e tela de amianto, aquecer o frasco. Importante utilizar luvas térmicas. O meio não deverá ferver, apenas ser aquecido.
- Vedar o erlenmeyer com o auxílio de um tampão de algodão e papel kraft. Levar para a autoclave por 15' a 121° C.
- Distribuir o meio de cultura em placas de petri ou tubos, que deverão estar esterilizados, sempre respeitando a área de segurança que veremos a seguir.
- Levar em geladeira para endurecer.

Agora que você já aprendeu a preparar um meio de cultura, vamos entender sua aplicação e técnicas de semeadura.

Para isolar, cultivar e identificar o microrganismo a ser estudado, são necessárias técnicas adequadas que permitam um rápido crescimento sem contaminação.



Assimile

Para melhor entender o preparo de meios de cultura e as técnicas de semeadura, veja os vídeos:

MEIOS de Cultura UEL. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=YyODN-Ct8jI>>. Acesso em: 14 set. 2017.

TÉCNICAS de Semeadura. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=PqPKFF4OOsU>>. Acesso em: 14 set. 2017.

Técnicas de semeadura e isolamento de microrganismos

Método utilizado para transferir inóculos bacterianos de um meio de cultura ou material a ser analisado (secreções, alimentos) para um outro meio de cultura.

É importante garantir que não ocorra a contaminação do meio e, assim, que apenas o microrganismo desejado seja semeado. Para tanto, é necessário utilizar as técnicas assépticas.

As técnicas de assepsia incluem:

- fazer a desinfecção da área de trabalho (bancada) e antisepsia das mãos antes e depois de qualquer trabalho/experimento;
- trabalhar sempre dentro da área de segurança, que consiste em uma área de aproximadamente 10 cm ao redor do bico de Bunsen;

- esterilizar todo o material, como alças e agulhas bacteriológicas, antes e depois do uso, aquecendo da base para a ponta;
- flambar a boca dos frascos e tubos antes e depois das inoculações, evitando a contaminação do material/cultura a ser trabalhado e garantindo que somente o microrganismo desejado será inoculado.

Semeaduras em meios sólidos

Necessárias para o isolamento e obtenção de culturas puras (colônias isoladas de um único microrganismo, separando-o de outros que se encontram no mesmo material) de amostras que contenham mais de uma microbiota e para o estudo da morfologia colonial.

A técnica consiste em depositar sobre um ponto da superfície do ágar um pouco do material a ser estudado e, na sequência, espalhá-lo em outros lugares com o auxílio da alça de platina. Dessa forma, não teremos um aglomerado do material que impossibilitaria a identificação, mas sim quantidades menores formando colônias isoladas.

O que garante o sucesso da técnica é o grande número de estrias, o cuidado para que não ocorra a perfuração do meio, não repassar a alça em local já estriado e coletar uma pequena quantidade de material para semear.

A técnica pode ser trabalhada com o esgotamento do material em estrias simples ou múltiplas.

Estria simples: transferir uma alçada da cultura para meio sólido em placa e estriar com a alça bacteriológica sobre o meio em movimento de de zigue-zague (estria sinuosa) ou como uma linha reta sobre o meio (estria reta).

Esgotamento em estrias múltiplas: transferir uma alçada da cultura para meio sólido em placa e estriar com a alça bacteriológica sobre o meio. A placa é dividida em 4 quadrantes e a inoculação pode ser feita de 2 tipos:

Em 3 estrias: estriar em metade da placa, com movimentos de de zigue-zague. Quando atingir a metade, girar a placa 90° e estriar até a metade (1/4 da placa), girar mais 90° e estriar o meio restante.

Em 4 estrias: estriar até 2/3 da metade da placa, girar 90°, estriar 2/3 do próximo quadrante (1/4 da placa), girar 90°, estriar mais 2/3

do próximo quadrante (1/4 da placa), girar 90° e estriar o restante do meio.

Objetivo: a técnica de semeadura com estrias múltiplas tem o objetivo de obter colônias isoladas.

Técnica de semeadura em meio líquido

Flambar a alça e deixar esfriar, retirar a tampa (de rosca ou tampão de algodão) do tubo e retirar com alça uma porção de amostra; fechar o tubo que contém a amostra; retirar a tampa do tubo que vai ser inoculado; introduzir a alça até aproximadamente 1/4 de profundidade do meio; fechar o tubo.

Objetivo: é um repique genérico para crescimento bacteriano em meio líquido.

Técnica de semeadura em meio sólido em tubo (ágar inclinado)

Flambar a alça e deixar esfriar; retirar a tampa (de rosca ou tampão de algodão) do tubo e retirar com a alça uma porção de amostra; repor a tampa no tubo que contém a amostra; retirar a tampa do tubo que vai ser inoculado; introduzir a alça até a base da superfície do meio inclinado, passando-a ao longo da sua superfície em movimentos de zigue-zague; fechar o tubo.

Objetivo: obtenção de intensa massa de microrganismos.

Após a realização de cada técnica de semeadura, é importante levar o material para estufa em 30 a 37° C por 48 horas para o crescimento dos microrganismos.



Pesquise mais

Aprenda mais e aprimore sua visão crítica com o artigo "Bactérias multirresistentes e emergência da resistência tipo New Delhi Metallo- β -Lactamase -1 (NDM-1)", da Revista *UniAndrade*, 2015, que apresenta como o uso indiscriminado de antibióticos em instituições hospitalares, no Brasil e no mundo, levou ao aparecimento de bactérias multirresistentes.

Disponível em: <<https://www.uniandrade.br/revistauniandrade/index.php/revistauniandrade/article/viewFile/172/153>>. Acesso em: 28 ago. 2017

Sem medo de errar

Então, você conseguiu auxiliar Rafael a compreender melhor a situação de seu irmão Ricardo? Qual a conclusão sobre a necessidade de coleta de amostras a que você chegou?

Por mais absurdo que pareça o médico liberar o paciente sem a solicitação de exames, na grande maioria dos casos, esses sintomas são provocados por infecções virais de curta duração causadas pelos vírus rotavírus, norovírus, astrovírus e adenovírus entérico. Nesses casos, o importante não é o médico identificar o vírus, mas sim identificar que seu paciente não apresenta outros sintomas que possam indicar problemas mais graves, como sangue nas fezes, febre alta, sinais de desidratação grave, perda de peso importante, hipotensão arterial e sintomas com mais de uma semana de duração.

A maioria das viroses se resolve de forma espontânea. Sua complicação mais comum é a desidratação, que pode ser revertida se o paciente conseguir manter uma boa hidratação. O que ficou pendente nessa situação foi o médico explicar que as viroses costumam melhorar entre três e quatro dias e, se após esse período, Ricardo não apresentasse melhoras ou piorassem os seus sintomas, então deveria retornar para uma nova avaliação e solicitação de exames.

Nesse caso, com os sintomas agravados ou sem melhoras com mais de uma semana, ou nos casos em que o médico não se sinta seguro com o diagnóstico de virose, seria necessária a solicitação de exame de sangue e fezes para identificação de uma possível infecção bacteriana.

Avançando na prática

Salmonella e suas consequências

Descrição da situação-problema

Rafael ficou muito satisfeito com seu auxílio no entendimento do quadro clínico de seu irmão, mas não deixou sua curiosidade de lado com relação às bactérias, uma vez que era o tema que estava estudando atualmente em seu curso, e foi em busca de mais

informações. Verificou que, se a infecção de seu irmão não fosse viral, seria bacteriana e que o provável causador, de acordo com os sintomas relatados, seria a *Salmonella*. Rafael está no início da disciplina e não possui nenhum conhecimento sobre a referida bactéria e, dessa forma, foi lhe pedir auxílio. Como você poderia ajudá-lo a entender mais sobre essa bactéria?

Como sugestão, apresente a ele as formas de contaminação, sua classificação, espécies, doenças provocadas, diagnóstico, dentre outros.

Resolução da situação-problema

Principais características da *Salmonella*:

- pertence à família das enterobactérias;
- é formada por bacilos gram-negativos;
- não forma esporos;
- é anaeróbia facultativa;
- é móvel (flagelos peritríquios);
- é capaz de invadir o intestino delgado;
- não forma esporos;
- é excretada nas fezes por portadores ou infectados.

Apresenta-se em três espécies: *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella enteritidis*. Essa última apresenta mais de 1.400 variações.

Em sua grande maioria, são patogênicas nos homens e animais, com exceção da *Salmonella typhi*, que afeta apenas os seres humanos.

Nos seres humanos, são responsáveis por várias doenças como a febre tifoide e paratifoidea, gastroenterites, infecções localizadas etc.

Os principais sintomas da doença são: dor abdominal, diarreia, vômitos, sangue nas fezes, febre alta, dor de cabeça. Nos idosos, crianças e indivíduos imunodeprimidos, os sintomas são mais severos, exigindo maior cuidado e atenção.

Seu habitat é o trato intestinal do homem e animais. A disseminação ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente de origem animal, carnes preparadas, ovos, derivados do leite, produtos de panificação, saladas diversas.

O período de incubação da doença varia de 6 a 48 horas, com duração de 2 a 5 dias.

Prevenção

Adotar medidas sanitárias para prevenir a contaminação de águas e alimentos. Cozinhar bem ovos e carnes (aves e bovinos). Não permitir que os portadores realizem a manipulação de alimentos.

Diagnóstico

Cultura de fezes, pus, sangue ou uma amostra do reto. O teste pode ser feito com as amostras coletadas ou através de amostra do reto (coletada com cotonete). A amostra é enviada ao laboratório, onde a bactéria pode ser cultivada. Identificar a bactéria em uma amostra confirma o diagnóstico. As bactérias também são testadas para verificar quais antibióticos são eficazes (teste de sensibilidade).

Tratamento

Enterites: hidratação.

Bacterimias: antibióticos.

Febre tifoide: antibióticos.

Faça valer a pena

1. As bactérias são muito pequenas. Seu tamanho é da ordem de milésimos de milímetros (micrômetros), no entanto são capazes de ser observada em microscopia óptica. São classificadas em três tipos diferentes, conforme sua morfologia: cocos, bacilos ou bastonetes e espirilos.

Qual das alternativas a seguir remete à forma de cocos de uma bactéria?

- a) São bactérias retangulares ou em forma de bastão, podendo ser longas ou curtas, com a extremidade reta ou com a ponta arredondada.
- b) São bactérias que possuem formato de hélice ou espiral.
- c) São bactérias redondas que possuem formato de esfera.
- d) São encontradas em formas isoladas.
- e) Muitas vezes, apresentam-se em formato de vírgula.

2. As bactérias fazem parte do reino monera. São seres vivos unicelulares, possuem uma única célula e fazem parte do grupo das células procariotas, ou seja, não possuem membrana nuclear, chamada de carioteca. Se comparadas às células eucarióticas, são mais simples, exceto pelo seu envoltório nuclear. Os principais elementos da estrutura de uma bactéria são: citoplasma, membrana plasmática, parede celular, cápsula, flagelos e pili (fímbrias).

Qual das características/funções a seguir está relacionada à parede celular de uma bactéria?

- a) Responsável pelo movimento das bactérias.
- b) Responsável pela aderência e transporte de material genético.
- c) Controla as substâncias que entram e saem da célula.
- d) Formada principalmente por peptidoglicanos (mureína ou mucopeptídeo).
- e) É um envoltório protetor que atua na defesa da bactéria, conferindo maior resistência à bactéria.

3. Meios de cultura são preparações sólidas, semissólidas ou líquidas, simples ou complexas, estéreis que permitem o crescimento de microrganismos.

Possuem funções de fornecer nutrientes para o crescimento bacteriano, podem ser específicos para cada microrganismo ou não, identificam sua família, gênero e espécie e formam cultura bacteriana a partir de um inóculo. De acordo com a sua função, são classificados em rico, seletivo, diferencial, diferencial indicador e de transporte.

De acordo com os tipos de meio de cultura, assinale a alternativa que se aplica ao meio transporte.

- a) Permite a diferenciação, a distinção de vários gêneros e espécies de microrganismos.
- b) Sua finalidade é permitir que as bactérias contidas em uma amostra aumentem de número.
- c) Possibilita a análise das propriedades bioquímicas e verificação de funções fisiológicas e de microrganismos, facilitando sua identificação.
- d) Não possuem nutrientes, contendo apenas um agente redutor (tioglicolato ou cisteína).
- e) Possui a finalidade de selecionar as espécies que se deseja isolar e impedir o desenvolvimento de outros germes.

Seção 1.2

Crescimento e metabolismo bacteriano

Diálogo aberto

Caro aluno, dando continuidade aos estudos em bacteriologia clínica, vamos retomar o caso de Ricardo, aquele rapaz de 22 anos, esportista, que, após ir a uma churrascaria com seus colegas, iniciou com um quadro de cólicas e diarreia e, dada a persistência dos sintomas, foi acompanhado de seu irmão Rafael ao pronto-socorro.

Mais uma vez, você irá auxiliar Rafael a se aprofundar um pouco mais nessa situação.

Em uma aula na faculdade, Rafael e seus colegas foram instigados pelo professor a discutir sobre coletas, exames de fezes e diagnóstico. Como o caso de seu irmão era recente e Ricardo estava inconformado com a situação, ele aproveitou a oportunidade e apresentou à classe o problema ocorrido e seu ponto de vista com relação à coleta de amostras. Diante da exposição de Rafael, a professora fala da possibilidade de uma contaminação por *Escherichia coli* e questiona aos alunos sobre o próximo passo após a coleta da amostra. Diante do exposto, a cultura poderia ser aplicada nesse caso? Com a coloração de Gram, é possível fechar o diagnóstico?

Não pode faltar

Metabolismo, genética bacteriana e comportamento ante a disponibilidade de oxigênio

Para mantermos as funções vitais de nosso corpo, faz-se necessária uma alimentação equilibrada. Quando ingerimos um alimento, ele é decomposto e os nutrientes são distribuídos pelo nosso metabolismo. Assim também ocorre com as bactérias; para que elas cresçam, precisam de nutrientes como carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo e nitrogênio.

Na diversidade metabólica das bactérias, existem duas espécies que são classificadas mediante o que o organismo utiliza como fonte de carbono: autótrofas e heterótrofas.

As autótrofas utilizam o dióxido de carbono (CO_2) como sua única fonte de carbono (vegetais, algas, cianobactérias). Já as heterótrofas utilizam compostos orgânicos diferentes de CO_2 como fonte de carbono (ser humano, animais, fungos e protozoários). Vale lembrar que todos os compostos orgânicos contêm carbono. A grande maioria das bactérias é heterótrofa.

Nas bactérias autótrofas, podemos encontrar dois grupos: as dependentes de fotossíntese, que utilizam luz como energia (fotoautótrofas), e aquelas que dependem de substâncias químicas como fonte de energia (quimioautotróficas). As bactérias heterótrofas ou heterotróficas também podem se classificar mediante a fonte de energia. As fotoheterotróficas utilizam a luz como fonte de energia e as quimio-heterotróficas utilizam substâncias químicas como fonte de energia.

Todas as bactérias de importância médica são quimio-heterotróficas.

As bactérias ainda podem ser classificadas de acordo com a necessidade de oxigênio para sobreviver.

Aeróbio obrigatório: bactérias que só crescem mediante a presença de oxigênio em concentração comparada ao ar atmosférico (20 a 21% de O_2).

Microaerófilas: bactérias que só crescem em baixo teor de oxigênio, concentração menor que o ar atmosférico.

Anaeróbias estritas: só crescem em ausência de oxigênio, sendo inibidas e mortas na presença de O_2 , que não é utilizado em seu metabolismo.

Anaeróbias facultativas: bactérias que crescem tanto na presença como na ausência de oxigênio.

Nos laboratórios, as amostras clínicas são em sua grande maioria anaeróbias facultativas, uma vez que o cultivo é simples, já que o oxigênio está sempre no ar.

As bactérias possuem uma alta capacidade de se reproduzir (reprodução assexuada), e isso acontece de forma muito rápida, em poucos minutos. Sendo assim, uma única bactéria pode originar uma população de bactérias semelhantes à original.



Reprodução assexuada é um tipo de reprodução realizada sem a troca de material genético, recebendo cópia igual do DNA, em que um indivíduo dará origem a outro indivíduo idêntico (clone).

A transferência de informação genética de uma célula para outra pode ocorrer de três formas:

Transformação: ocorre pela absorção de fragmentos de DNA que são oriundos de bactérias mortas que liberam seu DNA no ambiente. Em laboratórios, é possível extrair DNA de um tipo de bactéria e introduzi-lo em outra geneticamente diferente.

Transdução: é a transferência de DNA celular através de vírus bacteriano. Isso ocorre no momento em que os vírus são formados e pedaços de DNA são incorporados ao material genético viral.

Conjugação é o cruzamento de duas células bacterianas em que o DNA é transferido da célula doadora para a célula receptora, sendo que essa última será modificada. Essa forma de recombinação é que leva à formação de novas bactérias resistentes a vários tipos de antibióticos.

Tamanho, arranjo e forma bacteriana; exigências nutricionais e ambientais

Conforme já vimos anteriormente, as bactérias são seres muito pequenos, microrganismos e se apresentam de três formas diferentes: bastonetes ou bacilos, espirilos e cocos. Para que elas cresçam e se multipliquem, são necessárias condições nutricionais e ambientais adequadas. Os meios de cultura são preparações ricas em nutrientes que permitem o crescimento bacteriano. Os nutrientes dos meios devem conter elementos necessários para sintetizar e produzir novos organismos.

Como já falamos, o carbono é indispensável para a síntese dos compostos celulares e deve ser fornecido na forma de compostos orgânicos (glicose) ou inorgânicos (CO_2). Várias fontes de carbono podem ser utilizadas pelas bactérias como os carboidratos, aminoácidos e celulose.

O nitrogênio também é necessário para a síntese de compostos celulares. Algumas bactérias necessitam dele na forma orgânica (aminoácidos e sais orgânicos de amônio) e outras na forma inorgânica, como nitratos, amônio ou o próprio nitrogênio atmosférico.

As bactérias necessitam ainda de fontes de enxofre e fósforo (fornecidos na forma de sulfatos e fosfatos), sais de sódio, potássio, zinco, ferro e manganês.

Além de nutrientes, para o crescimento das bactérias, são necessárias também condições físicas ambientais, como pH, temperatura, pressão osmótica.

A grande maioria das bactérias cresce em temperaturas ideais para os seres humanos, contudo algumas bactérias conseguem se reproduzir em temperaturas extremas. De acordo com a variação de temperatura, podem ser classificadas em psicrófilos (crescem em baixas temperaturas), mesófilos (crescem em temperaturas moderadas) e termófilos (crescem em altas temperaturas).

Com relação ao pH, a maioria das bactérias cresce próximo à faixa de neutralidade, entre 6,5 e 7,5. Pouquíssimas bactérias conseguem crescer em pH ácido (4,0). A temperatura ótima ou ideal é aquela em que os microrganismos se desenvolvem mais rapidamente.

Pressão osmótica é a pressão exercida na membrana celular por ações tanto dentro quanto fora da célula. Quando as células estão em solução, o ideal é que a pressão no interior da célula seja igual à da solução externa.



Assimile

As substâncias dissolvidas em líquido são denominadas soluto.

Quando a concentração de soluto do ambiente exterior de uma célula é maior que a do ambiente interior, a solução é chamada de hipertônica. Quando a concentração de soluto fora da célula for menor que a concentração dentro da célula, a solução é denominada hipotônica. A água consegue sair de dentro da célula e também penetrar para seu interior, a fim de tentar igualar as duas concentrações. Quando a concentração de soluto de fora da célula iguala-se à concentração interior à solução é chamada isotônica.

As bactérias conseguem sobreviver em meio hipotônico, mas podem ser transferidas para o meio com a concentração de soluto maior, mais elevada, sofrendo plasmólise (perda de água). De acordo com a concentração de sal (cloreto de sódio) do meio em que elas crescem, podem ser classificadas em halófilas e halotolerantes.

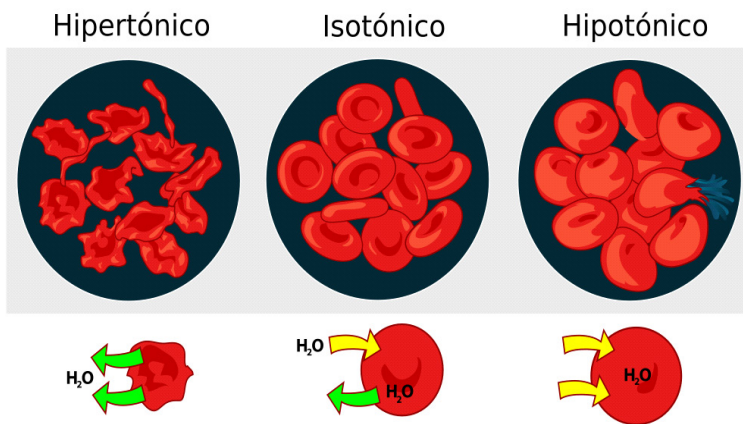
As bactérias halófilas precisam de uma concentração mínima de cloreto de sódio para crescerem, enquanto as halotolerantes crescem na presença ou ausência de cloreto de sódio.



Exemplificando

Segue ilustração de variáveis de concentração de soluções para auxiliá-lo no entendimento dos conceitos: hipotônico, isotônico e hipotônico.

Figura 1.2 | Pressão osmótica



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4f/Osmotic_pressure_on_blood_cells_diagram-es.svg/1000px-Osmotic_pressure_on_blood_cells_diagram-es.svg.png>. Acesso em: 14 set. 2017.

Resistência bacteriana aos antibióticos

Antibiótico é um composto produzido por microrganismo capaz de matar ou inibir o crescimento de outros microrganismos.

Antes de falarmos sobre a resistência bacteriana aos antibióticos, vamos entender como os antibióticos agem e qual o seu mecanismo de ação.

Local de atuação dos antibióticos:

- Parede celular.
- Síntese proteica.
- Síntese de ácidos nucleicos (DNA/RNA).

Os antibióticos podem ser divididos em duas classes:

Bactericidas: atuam na membrana plasmática ou parede celular bacteriana, impedindo a sua produção e, consequentemente, a sua destruição.

Inibição da síntese da parede celular ou lesão da membrana plasmática: deixa a bactéria exposta a bacteriostáticos, levando à morte.

Exemplos: penicilinas, cefalosporinas, vancomicina etc.

Bacteriostáticos: impedem a multiplicação e proliferação bacteriana, agindo sobre o DNA bacteriano, bloqueando a replicação, a transcrição e a síntese de proteínas.



Refleta

Você já parou para pensar por que o álcool comum não é considerado bactericida?

Ele não é um bactericida, pois não mata as bactérias, uma vez que não possui água. Para eliminar as bactérias, 30% de água é necessária, e o álcool comum possui apenas 2%. Para destruir a bactéria, o álcool precisa penetrar na membrana celular para então rompê-la e destruí-la. A água é quem auxilia essa passagem pela parede celular, rompendo a membrana e matando a bactéria.

Inibição da síntese de ácido nucleico (síntese de DNA e RNA): impede a replicação do DNA bacteriano, dificulta a divisão da célula ou impede a transcrição, dificultando assim a bactéria de produzir o RNA (o mensageiro que carrega a mensagem genética a qual será lida pelos ribossomos).

O antibiótico da classe bacteriostática impede a tradução da célula bacteriana e consequentemente impede a síntese de proteína. Acopla-se ao ribossomo, dificultando a ligação ao RNA mensageiro, o que impede a síntese da proteína.

Inibição da atividade enzimática: imita substâncias utilizadas pelas células bacterianas e se liga às enzimas, inibindo-as e impedindo o crescimento bacteriano.

Exemplos: tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina e outros.



Pesquise mais

Aprenda mais e aprimore sua visão crítica com a reportagem “Resistência bacteriana aos antibióticos: o panorama atual”, que aborda a redução no desenvolvimento de novos antibióticos.

Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/blog/letra-de-medico/resistencia-bacteriana-aos-antibioticos-o-panorama-atual/#>>. Acesso em: 13 set. 2017.

Resistência bacteriana é quando as bactérias se tornam capazes de sobreviver a certos antibióticos, conseguindo se multiplicar mesmo com o uso em doses elevadas. Atualmente, é muito comum ouvirmos casos de bactérias resistentes a medicamentos. As infecções causadas por esse tipo de bactéria são muito difíceis de serem combatidas. Existem bactérias resistentes a múltiplos fármacos.

O uso indiscriminado de antibióticos leva a seleção de uma população de bactérias que apresentam uma mutação, que confere resistência àquele antibiótico. Até pouco tempo atrás, para qualquer dor de garganta ou febre as pessoas tomavam antibióticos sem sequer ter conhecimento se eram causadas por bactérias. Além disso, o uso era feito totalmente de forma inadequada, por tempo incorreto, em doses e intervalos errados. Esse uso indiscriminado levou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a proibir a venda de antibióticos sem receita médica em 2010.



Pesquise mais

Para compreender melhor sobre a proibição de venda de antibióticos sem receita médica, leia a Resolução da ANVISA por completo, RDC 20/2011, que substitui a inicial RDC 44/2010.

Disponível em: <[U1 - Estrutura, fisiologia e crescimento bacteriano](https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwi_746zqqjWAhUGjpAKHaqKBm4QFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fdocumentos%2F33880%2F2568070%2Frdc0020_05_05_2011.pdf%2Ffa3ec1c1-8045-4402-b17f-ed189fb67ac8&usq=AFQjCNGFT9qu8sri7Pbwv3Eju4pLr-al9w>. Acesso em: 13 set. 2017.</p></div><div data-bbox=)

Existem dois tipos de resistência bacteriana: natural e adquirida.

Resistência natural: algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos tipos de antibióticos por não possuírem o sítio específico para a atuação do antibiótico, e outras por possuírem membrana plasmática impermeável ao antibiótico, não podendo, assim, alcançar o sítio de atuação. Essa resistência é chamada resistência intrínseca.

Exemplo: a Vancomicina só consegue atuar nas bactérias gram positivas, tendo uma resistência natural às bactérias gram negativas.

Resistência adquirida: quando uma bactéria que anteriormente era sensível a determinado antibiótico se torna resistente a ele, o que é chamado de resistência adquirida (quando a bactéria consegue alterar a forma de atuação com o antibiótico), podendo ocorrer por quatro formas diferentes:

- Mutação do cromossomo que altera a estrutura do sítio de liga o ao antib tico, impedindo-o de se ligar   célula e tornando o microrganismo resistente (modifica o estrutural, o antib tico não consegue reconhecer nem se ligar).

- Muta o cromossomial capaz de modificar a estrutura da membrana celular, alterando sua permeabilidade. O antib tico fica incapaz de atravessar a membrana e não alcança seu alvo se tornando resistente.

- Capacidade de produzir enzimas que destroem ou inativam o antib tico. Os plasmídeos resistentes (fator R) são moléculas de DNA que carregam os genes para uma variedade de enzima que pode degradar os antib ticos e modificar o sistema de transporte.

- Capacidade de produzir bombas de resistência a múltiplos fármacos (MDR). A bomba de MDR permite   bactéria bombear o antib tico para fora da célula (expulsa o antib tico) antes que ele possa agir para danificar ou matar a célula. Os genes que codificam essas bombas estão localizados nos plasmídeos que as bactérias recebem durante a conjugac o. As bactérias que recebem esses plasmídeos ficam resistentes a vários tipos de antib ticos.

Visualiza o e tipos de colora o

Como vimos anteriormente, as bactérias são podem ser visualizadas em microscopia óptica e a visualiza o se d  por duas formas:

– A fresco: observação da suspensão bacteriana entre lâmina e lamínula. Utilizado para visualizar a mobilidade e morfologia de bactérias espiraladas (podem ficar distorcidas se fixadas), alteração celular e formação de esporos. Nesse caso, é necessária a utilização de um microscópio de campo escuro, já que as bactérias aparecem transparentes.

– Esfregaço fixado e corado: mais utilizado e vantajoso. As células ficam mais visíveis depois de coradas (transparentes), podendo ser transportadas sem riscos, já que estão fixadas e possibilitam a diferenciação de células por afinidades distintas aos corantes e de morfologia variada.

Vários métodos de coloração foram criados para melhor identificação das bactérias. Para realizar a coloração, é necessário “esfregar” as bactérias em uma lâmina, o que chamamos de esfregaço (deve ser pouco espesso e homogêneo), secar (ao ar) e fixar.

A fixação pode ser feita pelo calor (passando a lâmina com o esfregaço sob o bico de Bunsen) e pelo metanol (mergulhando a lâmina com esfregaço em metanol absoluto por 30 minutos). A fixação pelo calor deve ser bem feita; caso contrário, as células podem sofrer alteração em sua morfologia.

A fixação é importante, pois, além de preservar a morfologia das células, conforme já falamos, mata o microrganismo e retém o esfregaço na lâmina.

A grande maioria das bactérias possui afinidade por vários corantes, especialmente pelos derivados básicos da anilina: azul de metileno, violeta de genciana, tionina, fucsina, dentre outros.

Quando a coloração é realizada com uso de apenas um corante, chamamos de coloração simples, o que nos possibilita visualizar a morfologia, a forma das bactérias. Colorações realizadas com mais de um corante são denominadas coloração diferencial ou seletiva, possibilitando a visualização da estrutura da bactéria (cápsula, esporo, flagelo).

Vários métodos de coloração foram criados e, conforme os cientistas foram estudando as bactérias e seu comportamento perante determinados tipos de corantes, identificou-se a existência de diferentes reações de certos grupos de bactérias, o que facilitou a identificação de acordo com a resposta das bactérias a determinado método de coloração.

Dos métodos diferenciais existentes, os que apresentam maior importância laboratorial são o método de Gram, o método de Ziehl-Neelsen e o método de Albert-Laybourn.

A técnica de Ziehl-Neelsen é mais agressiva e utilizada para as bactérias que não são bem coradas pelo método de Gram, já que resistem ao descolorimento por possuírem alto teor de lipídeo na parede celular. Essas bactérias são denominadas de bacilos álcool ácidos resistentes (BAAR) (*Mycobacterium* e *Nocardia*).

O método de Albert-Laybourn baseia-se no fato de algumas bactérias apresentarem corpúsculos citoplasmáticos localizados nas regiões polares, que se coram pelo Lugol (de cor marrom), evidenciando-se, em contraste com o corpo bacilar, que se cora em verde-azulado pela solução de Laybourn. Essas características são encontradas nas corineobactérias, utilizadas para o diagnóstico de difteria.

Existem outros métodos poucos usados, mas que são necessários para corar estruturas específicas como flagelos, esporos e cápsulas.

Bacterioscopia: técnica de coloração de Gram

A coloração de Gram recebeu esse nome em homenagem ao seu descobridor, Dr. Hans Christian Gram, que desenvolveu a técnica em 1884, a qual permitia separar as bactérias em dois grupos distintos (gram positivas, coradas em roxo e gram negativas, coradas em azul). Esse método se tornou o mais importante procedimento de coloração nos laboratórios de microbiologia.

O fundamento do método deve-se ao fato de que as bactérias, quando coradas por tons derivados de rosa (violeta de genciana, cristal de violeta) e depois tratadas por lugol (solução de iodo) formam um composto de coloração escura. Esse composto nas bactérias gram positivas é retido e não consegue ser removido no processo de descoloração (tratamento com álcool), enquanto nas bactérias gram negativas esse composto é facilmente removido, descolorado. Após a descoloração, é feita uma nova coloração por safranina ou fucsina, onde, então, as bactérias gram negativas aparecerão vermelhas, devido à cor do corante, e as gram positivas aparecerão roxa, uma vez que conservam a cor do corante inicial.

A coloração adquirida pelas bactérias ao final do método está relacionada com a composição química de sua parede celular.

As bactérias gram positivas possuem uma camada espessa de peptidoglicano na parede celular, o que dificulta a remoção do corante quando submetidas ao álcool. As bactérias gram negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano na parede celular, o que facilita a remoção do corante no processo de descoloração. Essa diferença de constituição da parede celular é a base da coloração de Gram.

Técnica de coloração de Gram:

- Preparar uma lâmina com uma fina camada de bactéria (esfregaço).
- Fixar o esfregaço passando a lâmina na chama do bico de Bunsen por três vezes e deixar esfriar.
- Cobrir o esfregaço gotejando violeta de genciana (corante primário) e deixar agir por 1 minuto.
- Enxaguar cuidadosamente com um fio de água corrente.
- Cobrir com lugol (mordente) e deixar agir por 1 minuto.
- Enxaguar cuidadosamente com um fio de água corrente.
- Lavar (descorar) com solução de álcool cetona por aproximadamente 30 segundos (até que se perceba que o violeta de genciana não escorre mais).
- Cobrir o esfregaço com safranina ou fucsina (corante secundário ou contraste) e deixar agir por 30 segundos.
- Enxaguar cuidadosamente com um fio de água corrente.
- Deixe secar naturalmente e observar em microscopia óptica.



Assimile

Aprenda o passo a passo da coloração de Gram assistindo ao vídeo: COLORAÇÃO de Gram. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=mF3jAU6Dy4I>>. Acesso em: 14 set. 2017.

Sem medo de errar

Agora que você já possui um pouco mais de conhecimentos sobre bacterioscopia, irá conseguir auxiliar Rafael.

Sobre a suspeita de *Escherichia coli*, a cultura poderia ser aplicada nesse caso? Com a coloração de Gram, é possível fechar o diagnóstico?

Amostras com suspeitas de *E. coli* são inicialmente cultivadas em placa de ágar sangue e em um meio diferencial como ágar-EMB ou ágar MacConkey. A bactéria *E. coli* fermenta a lactose formando colônias rosas e os organismos que não fermentam lactose formam colônias incolores. Em ágar EMB,, as colônias de *E. coli* possuem um brilho esverdeado característico. Contudo, o isolamento de *E. coli* não é um procedimento diagnóstico de rotina, por isso o médico que atendeu Ricardo não fez essa solicitação.

Com a coloração de Gram, é possível apenas identificar a morfologia de bastonetes gram negativos. Sendo assim, só com a realização desse procedimento não é possível fechar o diagnóstico.

Avançando na prática

Conclusão de diagnóstico com coloração de Gram

Descrição da situação-problema

Ricardo compreendeu sua explicação, contudo ele ainda tem dúvidas sobre a coloração de Gram e quer saber por que não é possível fechar o diagnóstico dessa e de outras doenças utilizando apenas esse método.

Resolução da situação-problema

A coloração de Gram é um método diferencial de bactérias que permite a separação de amostras de bactérias gram positivas e gram negativas e a determinação da morfologia e tamanho, capaz de distinguir formas e arranjos das bactérias.

É uma coloração diferencial porque não cora todos os tipos de células igualmente. Essa coloração é o ponto de partida na identificação bacteriana, mas não deve nunca ser utilizada como um diagnóstico definitivo. É importante ressaltar que a coloração de Gram somente será um recurso rápido e útil quando corretamente realizada e interpretada, por isso sempre a execute com muita atenção!

Faça valer a pena

1. Para que as bactérias cresçam, elas precisam de nutrientes como carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo e nitrogênio. Na diversidade metabólica das bactérias, existem duas espécies que são classificadas mediante o que o organismo utiliza como fonte de carbono: autótrofas e heterótrofas.

Qual das alternativas a seguir remete à espécie autótrofa?

- a) É a espécie da grande maioria das bactérias.
- b) Utilizam compostos orgânicos diferentes de CO_2 como fonte de carbono.
- c) Podem se classificar mediante a fonte de energia que utilizam.
- d) Utilizam o dióxido de carbono (CO_2) como sua única fonte de carbono.
- e) O ser humano, os animais, fungos e protozoários fazem parte dessa espécie.

2. Resistência bacteriana é quando as bactérias se tornam capazes de sobreviver a certos antibióticos, conseguindo se multiplicar mesmo com o uso em doses elevadas. Atualmente, é muito comum ouvirmos casos de bactérias resistentes a medicamentos. As infecções causadas por esse tipo de bactéria são muito difíceis de serem combatidas. Existem bactérias resistentes a múltiplos fármacos.

Com base em seu conhecimento sobre resistência bacteriana, assinale a alternativa correta:

- a) A resistência se dá exclusivamente pela mutação das bactérias; elas se alteram geneticamente, de forma a reduzir ou neutralizar os efeitos dos antibióticos.
- b) Algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos tipos de antibióticos por não possuírem o sítio específico para a atuação do antibiótico. Essa resistência é chamada de resistência transferida.
- c) Existem dois tipos de resistência bacteriana: natural e transferida.
- d) A capacidade de produzir bombas de resistência a múltiplos fármacos (MDR) é uma das formas de resistência adquirida.
- e) O uso indiscriminado de antibióticos levou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a proibir a venda de antibióticos sem receita médica em 2015.

3. Vários métodos de coloração foram criados e, conforme os cientistas foram estudando as bactérias e seu comportamento perante determinados tipos de corantes, identificou-se a existência de diferentes reações de certos grupos de bactérias, o que facilitou a identificação de acordo com a resposta das bactérias a determinado método de coloração.

Dos métodos diferenciais existentes, os que apresentam maior importância laboratorial são o método de Gram, o método de Ziehl-Neelsen e o método de Albert-Laybourn.

Com relação à coloração de Gram e sua técnica, assinale a alternativa correta:

- a) A coloração adquirida pelas bactérias ao final do método está relacionada com a composição química de sua parede celular.
- b) A safranina ou fucsina exerce a função de descolorante na técnica.
- c) As bactérias gram negativas possuem uma camada espessa de peptidoglicano na parede celular, o que dificulta a remoção do corante quando submetidas ao álcool.
- d) As bactérias gram positivas possuem uma fina camada de peptidoglicano na parede celular, o que facilita a remoção do corante no processo de descoloração.
- e) Técnica que permite separar as bactérias em dois grupos distintos (gram positivas, coradas em roxo, e gram negativas, coradas em azul).

Seção 1.3

Microbiota normal

Diálogo aberto

Prezado aluno, vamos dar mais um passo no universo da bacteriologia e, para tanto, pedimos que ajude Rafael a sanar, dessa vez, uma dúvida de seu irmão Ricardo.

Ao voltar para casa, Rafael, entusiasmado, conta a seu irmão que ele havia sido caso de discussão em sala de aula. Ele diz que na aula de Microbiologia estavam discutindo vários temas, e que o caso do irmão se aplicava muito à situação, uma vez que a provável bactéria era um constituinte da microbiota normal.

Sem entender do que se tratava, pois ele não era da área de saúde, Ricardo começa a questionar seu irmão sobre o que seria microbiota normal e por que o caso dele se enquadrava nessa situação. Como você explicaria a Ricardo a situação e por que a *Escherichia coli*, sendo parte da microbiota normal, pode causar tal problema?

Para facilitar seu entendimento sobre as patologias causadas pelos microrganismos, convidamos você a elaborar uma tabela contendo as principais patologias causadas pelos microrganismos da microbiota normal.

Não pode faltar

Microbiota normal

A microbiota endógena, antigamente conhecida como flora normal, é usada para descrever os microrganismos que habitam (residem permanentemente) a pele e a mucosa de pessoas saudáveis. Embora a flora normal esteja presente em muitas regiões do corpo, os órgãos internos, sangue, linfa, líquido cefalorraquidiano e a maioria dos tecidos são normalmente livres de microrganismos, além de serem estéreis.

A microbiota normal se origina inicialmente do ambiente, no momento do nascimento e da alimentação (feto não possui

microbiota normal), podendo haver uma variação com o passar do tempo. Os tipos de microrganismos diferem de um local para o outro.

Não é essencial à vida, contudo, é importante para a manutenção da saúde. Os microrganismos da microbiota normal, muitas vezes, protegem o hospedeiro de microrganismos externos. Eles atuam competindo pelos nichos e nutrientes que encontram e agem de forma mais eficaz que os microrganismos externos. Dessa forma, inibem e dificultam a colonização de outros microrganismos. Além disso, produzem nutrientes importantes como a vitamina K e B e contribuem para o desenvolvimento do sistema imunológico.

Pode ser classificada em residente e transitória.

Microbiota residente: considerada fixa em uma determinada área e, se por algum motivo alterada, prontamente se restabelece.

Microbiota transitória: originária do meio externo (meio ambiente) e que pode permanecer no indivíduo por algumas horas ou até semanas (temporária). Nosso corpo está constantemente exposto a microrganismos do ambiente externo. Eles são atraídos para regiões quentes e úmidas do nosso corpo, mas ficam de forma temporária, podendo ser removidos, por exemplo, pelo banho, uma vez que não conseguem competir com a microbiota residente. Muitos microrganismos não conseguem habitar o corpo humano por não se adaptarem.

Normalmente, a microbiota residente se mantém intacta, entretanto, se alterada, os microrganismos transitórios poderão colonizar o local e vir a causar doenças.



Pesquise mais

Aprenda mais sobre a microbiota normal assistindo ao vídeo: FLORA bacteriana? O que é? Amiga ou vilã?. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=WZq9mZLxE2Q>>. Acesso em: 28 set. 2017.

Constituintes da microbiota normal: pele e mucosa

A microbiota residente da pele é constituída principalmente por bactérias e fungos e, em sua grande maioria, são anaeróbios. De acordo com o pH, umidade, temperatura, salinidade, presença de resíduos químicos (ureia e ácidos graxos) e presença de outros

organismos (produzem substâncias tóxicas), podemos ter uma variedade de microrganismos e em diversas quantidades.

Nas regiões mais secas, encontramos em maior quantidade *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes* (principal microrganismo causador da acne). Já nas áreas mais úmidas (virilha, axilas, genitália, períneo e entre os dedos), predominam *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium sp.*

Podemos encontrar ainda leveduras do gênero *Pityrosporum*, e também *Candida albicans*, essa última presente apenas em algumas pessoas.

A superfície da pele próxima à abertura das mucosas do corpo (boca, olhos, nariz, ânus, genitália) é habitada por bactérias presentes em várias excreções e secreções.

A lavagem frequente das mãos com água e sabão remove a maioria dos microrganismos transitórios.

Constituintes da microbiota normal: cavidade oral

A anatomia da nossa boca favorece o abrigo de numerosas bactérias. Além disso, a composição dela sofre alterações de acordo com a idade, hábitos alimentares, hormônios, fluxo salivar, condições imunológicas e ingestão de álcool.

Resquícios de alimentos na superfície e entre os dentes proporcionam o crescimento de bactérias na cavidade oral. Além disso, a falta de higiene bucal permite o crescimento dessas bactérias, originando as cáries dentárias, gengivite e doenças periodontais.

A microbiota bacteriana da cavidade oral é bastante complexa. Entre os microrganismos mais comuns, podemos identificar cocos, bacilos, espiroquetas. Entre as bactérias, várias espécies de *Lactobacillus*, os *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Neisseria* e *Veillonella*.

Constituintes da microbiota normal: trato respiratório

O trato respiratório superior (fossas nasais e garganta – faringe) possui uma grande e variada população de microrganismos (mucosa úmida e quente). Muitos deles são encontrados em pessoas saudáveis e são inofensivos, como os difteroides, lactobacilos e micrococos. Já os *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria* e

Corynebacterium também encontrados são oportunistas, ou seja, em algumas condições podem causar doenças.

Alguns indivíduos são conhecidos como carreadores saudáveis, são pessoas que abrigam patógenos virulentos nas fossas nasais ou faringe, mas não desenvolvem doenças associadas a eles (difteria, meningite, pneumonia e coqueluche), contudo podem transmiti-los a outras pessoas suscetíveis.

Por sua vez, o trato respiratório inferior (brônquio e alvéolos) é, normalmente, livre de microrganismos, pois as membranas mucosas e os pulmões possuem um mecanismo de defesa que remove os invasores com facilidade.

Constituintes da microbiota normal: trato geniturinário,, trato gastrointestinal

O trato geniturinário é formado pelo trato urinário (rins, ureteres, bexiga e uretra) e por várias partes do sistema reprodutor masculino e feminino.

Em condições saudáveis, os rins, ureteres e bexiga são estéreis. Porém, a uretra distal, que é a parte da uretra mais distante da bexiga, e a abertura externa da uretra abrigam muitos microrganismos, como espécies de neisseria, estafilococos, estreptococos, enterococos, difteroides, micobactérias, micoplasmas, bastonetes entéricos (intestinais) gram-negativos, algumas bactérias anaeróbias, leveduras e vírus. Geralmente estes microrganismos não invadem a bexiga, uma vez que esta é constantemente lavada pela urina ácida, a qual ajuda a impedir infecções no trato urinário. Em situações nas quais existe obstrução ou estreitamento da uretra, o acesso de microrganismos invasivos fica permitido e eles se multiplicam, levando a infecções do trato urinário. Causadores mais frequentes de uretrite são *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Mycoplasmas*, os quais são facilmente introduzidos na uretra durante as relações sexuais.

O sistema reprodutor normalmente é estéril, tanto no homem quanto na mulher, com exceção da vagina, em que a microbiota varia conforme o estágio de desenvolvimento sexual:

Puberdade e pós-menopausa: secreções vaginais alcalinas, predominam vários difteroides, estreptococos, estafilococos e coliformes (*Escherichia coli* e bastonetes).

Período fértil: secreções vaginais ácidas, predominam lactobacilos, estreptococos alfa-hemolíticos, estafilococos, difteroides e leveduras.

O trato gastrointestinal inclui o esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso (cólon) e ânus. Por possuir enzimas gástricas e pH muito ácido, o estômago normalmente impede o crescimento da microbiota endógena e de microrganismos ingeridos com alimentos e bebidas, os quais são destruídos quando passam pelo estômago.

A bactéria *Helicobacter pylori* (bacilo gram-negativo) vive no estômago de algumas pessoas e é uma das grandes causadoras de úlcera.

A bile inibe o crescimento de microrganismos. Dessa forma, uma pequena quantidade é encontrada na região superior do intestino delgado (duodeno), contudo, na região inferior (jejuno e íleo), é encontrada uma quantidade maior. Predominam espécies de *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptobacillus*, *Veillonella* e *Clostridium perfringens*.

O cólon é a região que contém o maior número de microrganismos e, por ser anaeróbio, as bactérias que vivem nessa região são anaeróbias obrigatórias, aerotolerantes ou anaeróbias facultativas.

Anaeróbios obrigatórios: espécies de *Bacteroides* e *Fusobacterium* (bacilos gram-negativos), *Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Clostridium* (bacilos gram-positivos), *Peptostreptococcus* (cocos gram-positivos) e *Veillonella* (cocos gram-negativos).

Anaeróbios facultativos: menos abundantes, membros da família *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* e espécies de *Klebsiella*, *Enterobacter* e *proteus* e espécies de *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Mycoplasma*. Fungos, protozoários e vírus também podem viver no cólon. Importante citar que muitos microrganismos da microbiota do cólon são oportunistas, ou seja, só causam doenças quando conseguem acesso a outras áreas do corpo ou quando o equilíbrio normal do corpo é rompido.

Muitos microrganismos são removidos do trato gastrointestinal pela defecação, e grande parte da massa fecal é constituída por bactérias.

Identificação micro e macroscópica dos microrganismos presentes nos diferentes locais do organismo

Vamos conhecer os principais grupos bacterianos importantes para os homens e animais. Seguem separados de acordo com sua morfologia e coloração:

Cocos gram-positivos

Staphylococcus: esféricos, imóveis, com cerca de 1 μ de diâmetro e encontrados sob a forma de cachos irregulares. Compõem a flora normal da pele e mucosa do homem. São cultivados em grande parte dos meios de cultura, onde as colônias em meio sólido são esféricas e brilhantes, podendo haver a formação de várias tonalidades de pigmentos. A característica da lesão causada por essas bactérias é o aparecimento de abscessos localizados e de superfícies focais.

Streptococcus: esféricos, com aproximadamente 1 a 2 μ de diâmetro, agrupam-se em cadeias, com o comprimento variável em função das condições ambientais. Crescem bem em meios sólidos, formando colônias esféricas de 1 a 2 mm de diâmetro.

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

Enterococcus: podem apresentar diferentes tipos de hemólise (alfa, beta e gama) e são considerados microrganismos extremamente resistentes. Fazem parte da microbiota entérica e muitas vezes do trato geniturinário.

Cocos gram-negativos

Neisseria: várias espécies podem ser diferenciadas por meio de provas bioquímicas, entretanto, dessas, apenas duas espécies são patogênicas ao homem: a *Neisseria meningitidis*, (meningite) e a *Neisseria gonorrhoeae* (gonorreia). Essas se apresentam como diplococos gram-negativos, com morfologia semelhante a um rim ou grão de feijão, com aproximadamente 0,8 μ de diâmetro e também imóveis.

Bastonetes Gram-positivos

Clostridium: formadores de esporos, bastonetes móveis gram-positivos, grandes e longos, com comprimento que varia de 3 a 8 μ m de diâmetro. Os esporos são geralmente mais largos e de difícil coloração.

Corynebacterium: bastonetes gram-positivos, com 0,5 a 1 μ m de diâmetro, apresentam-se em paliçada ou letra chinesa, e em forma de clava, devido a grânulos metacromáticos em seu interior.

Listeria: bastonetes curtos, de 0,5 por 0,8 a 2,5 μ m, considerados por muitos autores como cocobacilos, podem variar morfológicamente, tendendo algumas vezes para formas cocoides ou mesmo filamentosas. Não são formadores de esporos.

Bastonetes gram-negativos

Entéricos

Principais espécies envolvidas na patologia humana:

Escherichia coli: têm a forma de bastonetes (bacilos) e podem ser imóveis ou móveis por flagelos.

Shigella: imóveis, não formam cápsula ou esporos. Suas colônias são transparentes, circulares, com até 2 mm após 24 horas.

Salmonella: não esporulados, móveis, aeróbios facultativos, com cerca de 0,5 a 0,7 μ m, por 1 a 3 μ m.

Não entéricos

Brucella: imóveis, não formadores de esporos e, morfológicamente, se apresentam como bastonetes curtos.

Helicobacter: bastonetes móveis, curvos ou helicoidais, com 0,3 a 1 μ m de largura por 1,5 a 5 μ m de comprimento, não esporulam e, em culturas velhas, podem se tornar cocoides.

Haemophilus: cocobacilos gram-negativos pleomórficos (têm formato variável).

Espiroquetídeos

Bactérias que ocorrem isoladas e possuem morfologia espiral. São móveis, geralmente girando em seu eixo. Em virtude da dificuldade

de observação das 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).

Ação dos agentes físicos sobre o crescimento bacteriano

O método físico é um dos métodos utilizados para destruir ou inibir o crescimento bacteriano. Os métodos físicos mais utilizados em hospitais, clínicas e laboratórios incluem calor, combinação de calor e pressão, dessecação, radiação, rompimento sônico e filtração.

Calor

É o método mais utilizado, por ser muito prático, eficiente e barato. É aplicado em objetos inanimados e que podem ser submetidos a altas temperaturas. A temperatura e o tempo de exposição determinam a eficiência do calor para a esterilização.

Os microrganismos patogênicos são mais sensíveis que os não patogênicos e, quanto maior a temperatura, menor será o tempo necessário para matar os microrganismos.

Importante considerar o material onde a mistura de microrganismos e seus esporos se encontram, uma vez que pus, fezes, vômitos, muco e sangue contêm proteínas que funcionam como revestimento protetor para isolar os patógenos, sendo necessárias temperaturas muito elevadas para que ocorra a destruição. O procedimento mais eficaz é a lavagem com sabão, água quente e desinfetante e, posteriormente, a esterilização.

Calor seco

Eficaz para metais, vidrarias, algumas substâncias em forma de pó, óleos e ceras. É necessário um aquecimento em temperaturas de 160 a 165° C duas horas, ou 170 a 180° C por uma hora. A eficiência desse método depende da intensidade da penetração do calor nos materiais a serem esterilizados e do posicionamento correto – os materiais precisam estar posicionados de forma que o ar circule livremente entre eles.

A incineração é um método eficaz para destruir materiais contaminados descartáveis.

Calor úmido

Utilizado para materiais que não suportam altas temperaturas.

É o calor aplicado na presença de umidade (fervura ou vapor), sendo mais rápido e eficaz que o calor seco. Pode ser utilizado em temperaturas mais baixas.

Exemplo: vidros e metais limpos, como seringas e agulhas, podem ser desinfetados pela fervura por um tempo de 30 minutos.

Contudo, nem sempre a fervura é eficiente, já que os endósporos bacterianos resistem ao calor; nesse caso, é necessário utilizar a autoclave.

A autoclave, muito parecida com uma grande panela de pressão, é feita de metal e utiliza vapor sob pressão para destruir completamente toda forma de vida microbiana. O aumento da pressão aumenta a temperatura, além da fervura da água acima de 100° C, e força a entrada de vapor nos materiais que estão sendo esterilizados. A autoclave deve ser regulada com base no tipo de material e na densidade da carga a ser esterilizada. Os materiais devem ser organizados de forma que o vapor penetre completamente em cada pacote. As latas devem ficar abertas, garrafas cobertas com papel-alumínio ou algodão de forma bem frouxas e instrumentos embrulhados em panos. Fitas adesivas sensíveis à pressão da autoclave podem ser utilizadas como medida de controle de qualidade.

Frio

As temperaturas frias e o congelamento não matam a grande maioria dos microrganismos, apenas diminuem suas atividades metabólicas, inibindo, assim, seu crescimento.

O congelamento lento leva à formação de cristais de gelo no interior da célula, o que pode ocasionar o rompimento das membranas e paredes celulares de algumas bactérias. Dessa forma, não deve ser utilizado para preservar ou estocar bactérias. Já o congelamento rápido (nitrogênio líquido) é um excelente método para a preservação de alimentos, amostras biológicas e culturas

bacterianas. Após o descongelamento, as reações metabólicas se aceleram e os microrganismos voltam a se reproduzir.



Assimile

Em alguns casos, é possível a inibição do crescimento de microrganismos, alterando a atmosfera na qual eles estão localizados. Os microrganismos aeróbios e microaerófilos podem ser destruídos ao serem colocados em uma atmosfera desprovida de oxigênio.

Radiação

Não podemos dizer que o sol é um agente 100% desinfetante, uma vez que ele mata apenas os microrganismos expostos à sua luz. Dessa forma, os raios UV são eficazes apenas no ar e na superfície de equipamentos. Contudo, eles penetram nas células causando danos ao DNA, alterando ou matando a célula.

O soro, o antissoro, toxinas e vacinas são esterilizados com raios UV.



Exemplificando

Gaze seca e máscara de papel impedem a eliminação de microrganismos da boca e do nariz e protegem também o usuário de inalar patógenos e outras partículas estranhas que possam danificar os pulmões, funcionando, assim, como um filtro.

Ondas ultrassônicas

Utilizadas para limpeza e esterilização de equipamentos delicados, as ondas sonoras desagregam mecanicamente os restos orgânicos em instrumentos e vidrarias, os quais posteriormente devem ser lavados e esterilizados por outro método antes de serem utilizados.

Ação dos agentes químicos sobre o crescimento bacteriano

As substâncias químicas possuem várias formas de matar os microrganismos. Os agentes químicos atuam de três maneiras: rompimento da membrana celular lipídica (álcool, detergente), modificação das proteínas (cloro, iodo, glutaraldeído) ou modificação

do DNA (cristal de violeta). Alguns agentes químicos atuam em mais de um mecanismo.

O álcool atua causando uma desorganização na estrutura lipídica da membrana e também desnatura a proteína. Para sua atividade máxima, necessita da presença de água, por isso o álcool 70% é muito mais eficiente que o álcool 100%.

Os detergentes são agentes “surfactantes ativos”, os quais interagem com os lipídeos da membrana celular e desintegram a membrana.

O cristal de violeta atua como corante e também como inibidor de crescimento de microrganismos.



Refleta

Você já parou para pensar que os microrganismos (bactérias) estão presentes em vários locais da nossa casa?

Veja a reportagem do site BBC que aborda os dez lugares mais contaminados dentro de casa.

Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2015/12/151230_lugares_casa_contaminados_rm>. Acesso em: 28 set. 2017.

Sem medo de errar

Agora que você já aprimorou seu conhecimento sobre microbiota normal, irá conseguir auxiliar Ricardo no entendimento da questão.

O que é a microbiota normal e por que a *Escherichia coli*, sendo parte da microbiota normal, pode causar tal problema (quadro de cólica e diarreia)?

A microbiota endógena, antigamente conhecida como flora normal, é usada para descrever os microrganismos que habitam (residem permanentemente) a pele e a mucosa de pessoas saudáveis. Produz nutrientes importantes como a vitamina K e B e contribuem para o desenvolvimento do sistema imunológico. Pode ser classificada em residente e transitória.

Não é essencial à vida, contudo é importante para a manutenção da saúde. Os microrganismos da microbiota normal, muitas vezes, protegem o hospedeiro de microrganismos externos.

Normalmente, a microbiota residente se mantém intacta, entretanto, se alterada, os microrganismos transitórios poderão colonizar o local e vir a causar doenças.

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo constituinte da flora intestinal. Possui papel importante na síntese de vitamina B e tem ação protetora contra o ataque de microrganismos patogênicos. Em concentrações normais, não causa nenhum problema. O que ocorre é que, em algumas situações, podemos adquirir uma cepa diferente daquela que possuímos normalmente e isso pode vir a causar doenças.

Podemos ingerir a bactéria com a ingestão de água ou alimentos contaminados, ou em situações de falta de higiene correta.

A bactéria é comum no intestino, contudo, ao alcançar outras concentrações e locais (sistema urinário, corrente sanguínea, entre outros), pode ocasionar doenças ao nosso organismo, principalmente em situações de baixa imunidade.

Avançando na prática

Piercing e os perigos de contaminação

Descrição da situação-problema

Agora que você já entendeu como um microrganismo da microbiota normal pode causar doenças, explique o perigo de infecção grave por estafilococos ao se colocar piercing.

Resolução da situação-problema

Como vimos anteriormente, os estafilococos são constituintes da flora de nossa pele e mucosa.

Uma pequena lesão na pele é a porta de entrada para o nosso organismo. Sempre que a barreira da pele for quebrada, haverá risco de contaminação bacteriana.

Qualquer região do corpo pode apresentar infecções graves (genitais, umbigo, sobrelavilhas, mamilos etc.). Se a assepsia não for realizada de modo correto e se não houver cuidado no momento da inserção do piercing, maiores são os riscos de complicação.

A infecção da pele ao redor do piercing pode levar a quadros de sepse e, consequentemente, à morte. A implantação de qualquer objeto através de quebra da barreira da pele deve ser considerada como um procedimento cirúrgico e, como tal, deve estar submetida a criteriosos padrões de assepsia.

Faça valer a pena

1. A microbiota endógena, antigamente conhecida como flora normal, é usada para descrever os microrganismos que habitam (residem permanentemente) a pele e a mucosa de pessoas saudáveis. Embora a flora normal esteja presente em muitas regiões do corpo, os órgãos internos, sangue, linfa, líquido cefalorraquidiano e a maioria dos tecidos são normalmente livres de microrganismos, são estéreis.

Com base em seus conhecimentos sobre a microbiota normal, assinale a alternativa correta:

- a) Origina-se inicialmente do ambiente, no momento do nascimento e da alimentação (feto não possui microbiota normal), não havendo variação com o passar do tempo.
- b) É essencial à vida e muito importante para a manutenção da saúde.
- c) Seus microrganismos, muitas vezes, protegem o hospedeiro de microrganismos externos. Eles atuam competindo pelos nichos que se encontram e nutrientes de forma mais eficaz que os microrganismos externos.
- d) Produz nutrientes importantes como as vitaminas K e B e contribui para o desenvolvimento do sistema endócrino.
- e) A microbiota residente não se mantém intacta: ela é alterada e seus microrganismos transitórios causam doenças.

2. O trato geniturinário é formado pelo trato urinário (rins, ureteres, bexiga e uretra) e por várias partes do sistema reprodutor masculino e feminino. O trato gastrointestinal inclui o esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso (cólon) e ânus.

Sobre os constituintes da microbiota normal do trato geniturinário e trato gastrointestinal, é correto afirmar:

- a) Em condições de baixa imunidade do organismo, os rins, ureteres e bexiga são estéreis.

b) O sistema reprodutor normalmente é estéril, tanto no homem quanto na mulher, com exceção do pênis, em que a microbiota varia conforme o estágio de desenvolvimento sexual.

c) A bactéria *Helicobacter pylori* (bacilo gram-negativo) vive no estômago de todas as pessoas, incluindo recém-nascidos, e é uma das grandes causadoras de úlcera.

d) Por possuir enzimas gástricas e pH muito ácido, o estômago normalmente impede o crescimento da microbiota endógena e de microrganismos ingeridos com alimentos e bebidas, os quais são destruídos.

e) A bile acelera o crescimento de microrganismos. Dessa forma, na região inferior (jejuno e íleo) é encontrada em grande quantidade.

3. O método físico é um dos métodos utilizados para destruir ou inibir o crescimento bacteriano. Os métodos físicos mais utilizados em hospitais, clínicas e laboratórios incluem calor, combinação de calor e pressão, dessecação, radiação, rompimento sônico e filtração.

As substâncias químicas possuem várias formas de matar os microrganismos. Quanto à ação dos agentes físicos e químicos sobre o crescimento bacteriano, assinale a alternativa correta:

a) Os agentes químicos atuam de três formas: rompimento da membrana celular lipídica, modificação das proteínas ou modificação do DNA. Os agentes químicos atuam sempre com a ação de uma das formas, não sendo possível mais que uma ao mesmo tempo.

b) O calor é o método mais utilizado, por ser muito prático e barato, porém não é muito eficiente.

c) Na radiação, sabemos que os raios UV são eficazes apenas no ar e na superfície de equipamentos. Contudo, eles penetram nas células, causando danos ao DNA, alterando ou matando a célula.

d) As temperaturas frias e o congelamento não matam a grande maioria dos microrganismos; eles aceleram suas atividades metabólicas, dessa forma, não inibem seu crescimento.

e) O calor seco é eficaz em objetos inanimados e que podem ser submetidos a altas temperaturas.

Referências

BIOMEDICINA Padrão. **Técnicas de Semeadura**. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/09/tecnicas-de-semeadura.html>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

BODY Piercing – Perigos e Complicações. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/2008/10/piercing.html>>. Acesso em: 28 set. 2017.

BURTON, Gwendolyn R. W.; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia**: Microbiologia para as ciências da saúde. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

COLORAÇÃO de Gram. Microbiology Adventure. 1 de Novembro de 2016. 5'37". Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=mF3jAU6Dy4I>>. Acesso em: 14 set. 2017.

GONÇALVES, Licínio Andrade. A Queda dos Antimicrobianos, 11 jan. 2013. 3'58". Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=Qf5PTQgmunw&feature=youtu.be>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

LIMA, Liliane. Célula Bacteriana - Estrutura. 23 ago. 2015. 4'49". Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=2jyc0PJlsl&feature=youtu.be>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha; MIGUEL, Lucieny de Faria Souza. Capítulo 3, **Bacteriologia**. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/cap3.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

PEREIRA, Rafael Martins. **Resistência bacteriana a antibióticos**. Disponível em: <http://pt-br.infomedica.wikia.com/wiki/Resist%C3%Aancia_Bacteriana_a_Antibi%C3%B3ticos>. Acesso em: 25 ago. 2017.

Cocos patogênicos Gram-positivos de interesse clínico

Convite ao estudo

Caro aluno, aprofundando nossos estudos em bacteriologia, vamos falar sobre cocos Gram-positivos: gênero *Staphylococcus*. Você irá conhecer as patologias associadas ao gênero e as principais infecções causadas por essa bactéria, além de como ocorrem as manifestações clínicas e seus principais sintomas e diagnósticos. Irá entender ainda como é feito o estudo laboratorial dos estafilococos para o isolamento e identificação deles, pontos cruciais para um correto tratamento. Ao final desta unidade, você será capaz de elaborar uma tabela contendo as principais patologias causadas pelos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, o que irá facilitar ainda mais sua compreensão.

Para isso, buscando auxiliar no desenvolvimento das competências e objetivos desta unidade, apresentamos o seguinte contexto: Marta é uma senhora de 70 anos, muito ativa e sem nenhum problema grave de saúde, apenas uma diabetes que sempre foi bem controlada. Certo dia, ao regar suas plantas no quintal de casa, Marta levou um escorregão e, sem conseguir se levantar, chamou o SAMU, sendo conduzida ao hospital. Nele, verificou-se que Marta havia fraturado o fêmur. Ela foi imediatamente internada e precisou fazer uma cirurgia. A cirurgia foi bem-sucedida, e o médico tinha a expectativa de dar alta em 48 horas. Passados dois dias, Marta estava ansiosa para voltar pra casa, contudo ela começou a apresentar febre alta, tosse seca, dificuldade em respirar e fraqueza. Após uma avaliação clínica, o médico suspendeu a alta de Marta e solicitou uma radiografia de tórax.

Esse será mais um dos casos que você irá vivenciar em sua vida profissional, e seus conhecimentos serão primordiais para auxiliar as equipes médicas e multidisciplinares no correto diagnóstico e tratamento dos pacientes.

Nesta unidade, você irá entender como se apresenta o gênero *Staphylococcus* e os problemas enfrentados no dia a dia da área de saúde para combatê-lo.

Seção 2.1

Cocos Gram-positivos: gênero *Staphylococcus*

Diálogo aberto

Prezado aluno, dando início ao estudo do gênero *Staphylococcus*, vamos retomar ao caso de Marta, aquela paciente que deu entrada ao hospital com uma fratura de fêmur e, alguns dias depois, começou a apresentar um quadro de febre alta, tosse seca, dificuldade em respirar e fraqueza. Ela teve sua alta suspensa, e o médico solicitou um raio-x de tórax.

Sendo assim, você irá auxiliar o médico a explicar ao marido de Marta suas suspeitas e os próximos passos a serem tomados.

Após verificar a radiografia de Marta e reunir esses dados com o exame clínico e a ausculta pulmonar, o médico responsável pela paciente informou a ela e a seus familiares que essa estava com pneumonia e que, dessa forma, não iria ter alta naquele dia, pois seria necessário que a paciente fosse medicada e então, apresentando melhora em resposta ao tratamento, poderia ser liberada em torno de 4 a 5 dias.

João, marido de Marta, não compreendeu como sua esposa saudável, que foi internada por conta de uma fratura, adquiriu pneumonia, e então pediu ao médico que explicasse por que isso aconteceu.

O que é pneumonia?

Como a paciente Marta, que estava saudável ao entrar no hospital, pode ter adquirido a pneumonia? Justifique.

Não pode faltar

Patologias e sintomatologias associadas ao gênero *Staphylococcus* 1

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)

É um anaeróbio facultativo e patógeno oportunista. Embora o *Staphylococcus aureus* seja um membro da microbiota normal, é

uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente causador de várias infecções, desde aquelas superficiais até as mais disseminadas com elevada gravidade. Sua importância clínica cresceu muito devido ao aumento significativo de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).



Refleta

Amostras multirresistentes são amostras de bactérias que resistem ao tratamento com antibióticos e se multiplicam, espalhando-se pelo corpo de seu hospedeiro.

As infecções estafilocócicas podem ser classificadas como superficiais e profundas. As superficiais afetam a pele e o tecido celular subcutâneo. Geralmente, são decorrentes da invasão direta nos tecidos por amostras de *S. aureus* existentes na pele ou mucosas. As infecções profundas são decorrentes de bacteremias que se originam nos focos das infecções superficiais ou, eventualmente, em uma pneumonia por aspiração.

Elas causam doenças pela produção de toxina e também pela multiplicação em tecidos. A lesão típica é a formação de abscesso que acompanha o processo inflamatório.

As patologias causadas pelo *Staphylococcus aureus* podem ser divididas em três principais tipos: infecções superficiais (abscessos cutâneos e infecções de feridas); infecções sistêmicas (bacteremia, endocardite, osteomelite, artrite, miosite tropical e pneumonia); e os quadros tóxicos (síndrome do choque tóxico, síndrome da pele escaldada e intoxicação alimentar).

Infecções cutâneas e subcutâneas: o impetigo é uma infecção da epiderme, mais comum em crianças e jovens, em que ocorrem lesões múltiplas devido à propagação secundária do processo para áreas adjacentes da pele. A foliculite, que é a infecção do folículo piloso, forma uma pequena quantidade de pus abaixo da epiderme. Quando ocorre nos pelos das pálpebras, é o “famoso” terçol. O furúnculo ou abscesso é uma extensão da foliculite, com a formação de nódulos dolorosos e pus em sua parte central (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O *S. aureus* é a principal bactéria causadora de infecções de feridas cirúrgicas. A infecção caracteriza-se por edema e presença de material purulento.

Bacteremias: processo comum em pacientes internados. É um processo secundário da infecção cutânea ou de outros locais e pode dar origem a outros tipos de infecções, tais como endocardites, osteomielites e abscessos metastáticos em vários órgãos. Pode ainda evoluir para sepse com uma mortalidade elevada, que varia de 11 a 43%.

Endocardites: infecção do revestimento interno do coração, geralmente envolvendo as válvulas cardíacas. Em usuários de drogas, a infecção é adquirida por meio de injeção intravenosa, tendo a tricúspide como a válvula mais comprometida. Nos não usuários de drogas, a infecção se dá devido à disseminação a partir de outra infecção e a taxa de mortalidade é alta.

Pneumonia: pode ocorrer pela aspiração da secreção oral ou pela disseminação, através da corrente sanguínea, a partir de um foco de infecção distante. Através do exame do tecido pulmonar, é possível verificar inflamação e abscessos.

Osteomielite: inflamação do osso causada por infecção (geralmente nas pernas, braços e coluna). O *S. aureus* é a causa mais frequente de osteomielite aguda e crônica. A bactéria pode alcançar o osso pela corrente sanguínea ou pela extensão de infecções em tecidos adjacentes.

S. aureus é ainda a causa primária de artrite séptica em crianças, jovens e adultos portadores de artrites crônicas ou aqueles submetidos a diferentes tipos de tratamentos cirúrgicos.

O *S. aureus* pode também causar infecções na maioria dos órgãos e tecidos.

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das intoxicações mais frequentes. Ocorre em virtude da ingestão do alimento contaminado. Após a contaminação, se o alimento permanecer sem refrigeração ocorrerá o crescimento da bactéria. Os sintomas dessa infecção são náuseas, vômitos, diarreias e dores abdominais, com início após quatro horas da ingestão do alimento contaminado e com uma duração média de doze horas.

Quadros tóxicos:

A síndrome do choque tóxico, também ocasionada pelo *S. aureus*, causa febre, hipotensão, erupção cutânea que progride para descamação e envolvimento de sistemas múltiplos.

Ela normalmente está associada ao uso de absorventes internos, no entanto essa não é a única forma de contaminação. Não afeta somente as mulheres em idade reprodutiva, mas pode afetar também homens, mulheres na pós-menopausa e crianças. Normalmente, nesses casos, ela está associada a infecções de pele, como erisipela e celulite bacteriana e cirurgias.

A síndrome da pele escaldada por estafilococos é uma reação a uma infecção cutânea por estafilococos, na qual a pele se solta e descasca como se tivesse sido queimada. As camadas superficiais da epiderme morrem em resposta à presença de esfoliatina (toxina).

Patologias e sintomatologias associadas ao gênero *Staphylococcus*

O *Staphylococcus epidermidis* também é um constituinte da microbiota normal da pele e mucosas e pode causar infecções em indivíduos expostos a fatores de risco. Essas infecções geralmente ocorrem em ambientes hospitalares, durante tratamentos e intervenções cirúrgicas, em que são utilizados cateteres e implantes plásticos ou metálicos. Normalmente, a contaminação se dá no momento da implantação por bactérias da própria pele e mucosa do paciente ou também da equipe médica. As principais doenças são bacteremias/septicemias, endocardites, meningites, peritonites, endoftalmite, osteomelites, artrites e infecções do trato urinário, dentre outras.

Diferente do *S. aureus*, o *S. epidermidis* não apresenta um conjunto de enzimas e toxinas. Dessa forma, as infecções tendem a ser subagudas ou até crônicas.

Atualmente, o *S. epidermidis* é a espécie clínica mais frequente encontrada, chegando a representar até 80% das amostras isoladas. Conforme já mencionamos, as infecções por *S. epidermidis* são frequentemente subagudas e crônicas, portanto seu diagnóstico nem sempre é fácil. Como é um patógeno oportunista, o *S. epidermidis* necessita de hospedeiros comprometidos para atuar

como agente patogênico, tais como recém-nascidos prematuros, em que age como uma das principais causas de septicemia. Usuários de drogas intravenosas também são hospedeiros suscetíveis e podem desenvolver endocardite.

De acordo com o tipo de dispositivo médico e do local de inserção, podem ocorrer diversos tipos de doenças devido à sua capacidade em formar um biofilme. O biofilme produzido pelos *S. epidermidis* pode ser considerado seu principal fator de virulência, pois, além de funcionar como um reservatório de bactérias estrategicamente posicionado, também dificulta a penetração e a difusão de antimicrobianos e dos elementos de defesa do organismo (forma um “filme protetor”).

O *S. saprophyticus* também se encontra presente na microbiota normal da pele, região periuretral e mucosas das vias urinárias e genitais. Causa infecções do trato urinário, especialmente em mulheres jovens sexualmente ativas. Depois da *E. coli*, é a segunda maior causa de infecção do trato urinário.

Essas bactérias costumam produzir cistites assintomáticas e colonizar os ureteres, chegando aos rins.

A infecção pode ter vários sintomas. Normalmente, faz com que se queira urinar com maior frequência, e mesmo com vontade de urinar a quantidade é pequena ou, às vezes, nenhuma urina é expelida. A urina pode ser malcheirosa, escura ou conter sangue. Em alguns casos, sente-se queimação, ardor ao urinar. São sintomas também comuns câimbras e queimação na pélvis ou parte baixa das costas.



Refleta

Você já parou para pensar se existe uma forma de prevenção de contaminação por estafilococos?

Não existe uma imunização efetiva com toxoides ou vacinas bacterianas. Dessa forma, a melhor forma de prevenção é a limpeza. A lavagem frequente das mãos e a assepsia das lesões auxiliam no controle de disseminação.

Diagnóstico de doenças estafilocócicas

O diagnóstico laboratorial é feito através de análises de amostras colhidas de pacientes com suspeitas da doença. A detecção bem-

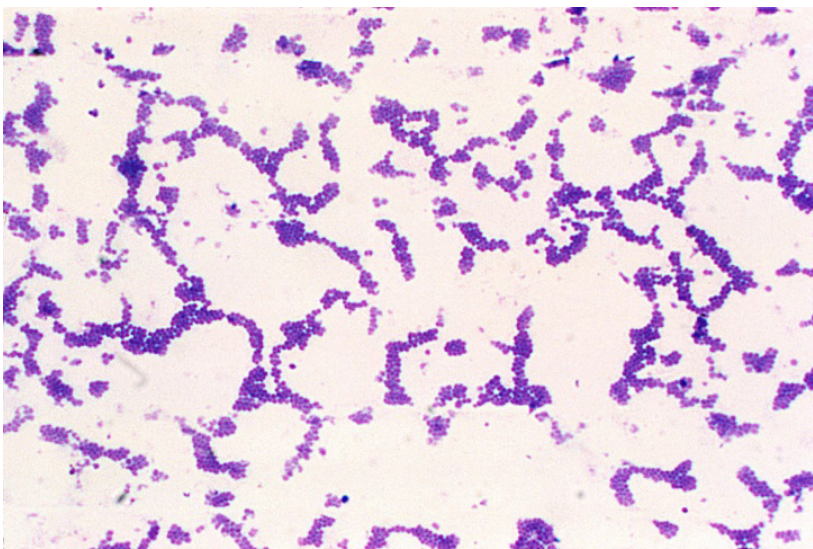
sucedida dos microrganismos numa amostra clínica depende do tipo de infecção e da qualidade do material submetido à análise.

Todas essas amostras coletadas são submetidas a exames, que podem ser físicos, bacteriológicos e bioquímicos.

O diagnóstico das doenças causadas por estafilococos é feito através de exame bacterioscópico de esfregaço corados por Gram, isolamento e identificação de microrganismo.

No exame bacterioscópico das secreções purulentas, podem ser observados arranjos em forma de cachos de uva ou isolados. O isolamento é feito com meios de cultura comuns (ágar sangue) em que a bactéria forma colônias grandes (amarelo ouro) e com frequência β -hemolíticas.

Figura 2.1 | Esfregaço de uma cultura de *Staphylococcus aureus* corado pelo método de Gram



Fonte: <<https://pixnio.com/free-images/science/microscopy-images/staphylococcus-aureus/photomicrograph-of-spherical-cocci-gram-positive-staphylococcus-aureus-bacteria-magnified-320x.jpg>>. Acesso em: 8 out. 2017.

Meios seletivo-indicadores também podem ser usados. A diferenciação do *S. aureus* de outras espécies mais frequentes do gênero pode ser feita usando testes de detecção de fator clumping e testes de coagulase livre.

Já o diagnóstico de intoxicação alimentar é feito através de pesquisa de enterotoxina nos alimentos ingeridos e no material oriundo de vômito do paciente. De uma forma geral, o *S. aureus* pode ser encontrado em grande quantidade no alimento que contém a enterotoxina responsável pelas manifestações clínicas.

O *S. epidermidis* isolado em meio de cultura apresenta colônias não pigmentadas ou esbranquiçadas e não hemolíticas. A diferenciação entre o *S. epidermidis* e o *S. aureus* é feita através das características culturais e morfológicas das duas espécies e, principalmente, pelo teste de coagulação que é positivo para o *S. aureus* e negativo para o *S. epidermidis*.



Assimile

Teste de coagulação é um exame de triagem realizado, geralmente, antes de cirurgias para avaliar o nível de coagulação do sangue. São realizados vários testes que avaliam o tempo de sangramento, de ativação parcial da tromboplastina, de ativação da protrombina, de coagulação e contagem das plaquetas. Dessa forma, é um eficiente método de análise do sistema de coagulação como um todo.

A diferenciação entre o *S. epidermidis* das demais espécies de coagulase negativa é baseada em vários testes bioquímicos. Vários kits e métodos automatizados estão disponíveis no mercado. Dada a sua importância, a busca de novas metodologias mais rápidas e eficazes tem aumentado. A diferenciação entre as linhas patogênicas e contaminantes é um desafio diário para os laboratórios clínicos. Métodos moleculares como o PCR são amplamente utilizados.



Exemplificando

Veja alguns exemplos de testes bioquímicos usados para diferenciar *S. aureus* dos outros estafilococos, como os testes de catalase e coagulase:

– Teste da catalase: deposita-se uma gota de peróxido de hidrogênio sobre uma lâmina e junta-se uma pequena quantidade do crescimento bacteriano. A formação de bolhas (liberação de oxigênio) indica um teste positivo. O teste também pode ser efetuado gotejando-se solução de peróxido de hidrogênio sobre o crescimento de bactérias em ágar e observando-se o aparecimento de bolhas. As bactérias possuem

enzimas que destroem o oxigênio tóxico (ânion oxigênio ou peróxido de hidrogênio). Uma das enzimas é a catalase, a qual degrada peróxido de hidrogênio e o transforma em água e oxigênio.

A liberação de bolhas (oxigênio) é o indicativo de que a bactéria em questão possui catalase (já que consegue transformar H_2O_2 que foi introduzido e liberar O_2). O *S. aureus* é catalase-positivo.

– Teste da coagulase: o plasma citrato de coelho ou de humano, diluído a 1:5, é misturado com um volume igual de caldo de cultura ou crescimento de colônias em ágar e incubado a 37°C. Um tubo de plasma misturado com caldo estéril é incluído como controle. Se houver formação de coágulos em 1-4 horas, o teste é positivo.

A espécie *S. aureus* é coagulase-positivo, o que o diferencia das outras espécies e são patogênicos para os humanos. Os estafilococos coagulase--negativos são membros da microbiota humana normal e algumas vezes causam infecções em idosos e imunocomprometidos.

– PCR (Polimerase Chain Reaction): atualmente, existem sistemas automatizados de microbiologia (VITEC, BACTEC etc.) que são capazes de isolar e identificar a maioria dos estafilococos em espécie. Provas bioquímicas, metabólicas, enzimáticas e os esquemas simplificados para a identificação de rotina de espécies humanas de estafilococos vêm sendo substituídos gradualmente por métodos moleculares, mais rápidos, contudo extremamente dispendiosos.

Estudo laboratorial dos *Staphylococcus*

Como vimos anteriormente, o *Staphylococcus aureus* pode ser encontrado em várias partes do corpo, como as fossas nasais, garganta, trato intestinal e pele. As infecções por estafilococos podem ser causadas por bactérias do próprio corpo ou por amostras adquiridas de outros doentes. A transmissão ocorre por contato direto ou indireto. As infecções estafilocócicas normalmente são superficiais e discretas, contudo, em recém-nascidos, pacientes cirúrgicos e em portadores de doenças debilitantes (câncer e diabetes), podem ser graves. Dessa forma, essa é uma das razões pelas quais as infecções estafilocócicas graves são frequentemente adquiridas em hospitais, e as amostras de *S. aureus* portadores de resistência múltipla são mais comuns em ambientes hospitalares.

Sendo assim, em várias situações, principalmente em casos de surtos epidêmicos de infecções hospitalares, pode ser necessário

fazer a tipagem de amostras de *S. aureus* para a identificação da origem e disseminação das infecções. Para rastrear a disseminação das amostras, vários métodos de tipagem foram desenvolvidos: biotipagem, sorotipagem, fagotipagem e a resistotipagem. Anteriormente, o método mais recomendado era a fagotipagem, mas, atualmente, vem se dando preferência a métodos moleculares e a análise de DNA através de eletroforese de campo pulsado é um dos métodos mais utilizados. Essa técnica tem contribuído muito para o entendimento da epidemiologia das infecções causadas por *S. aureus* e tem permitido definir a disseminação de clones epidêmicos em diferentes áreas geográficas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).



Pesquise mais

Aprenda mais sobre a tipagem molecular e a incidência de bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* em recém-nascidos com os artigos:

Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes e membros da equipe de enfermagem. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&ved=0ahUKEwj71N_unubWAhULhJAKHbaJCp4QFghAMAU&url=http%3A%2F%2Frevistas.ufpr.br%2Fcogitare%2Farticle%2Fdownload%2F25331%2F19032&usg=AOvVaw06R0YldJN-f7KMvVua6vWX>. Acesso em: 9 out. 2017

Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos: incidência e fatores de risco. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0ahUKEwj5d2JpebWAhXMkZAKHTedBCkQFgg-MAM&url=http%3A%2F%2Fperiodicos.puc-campinas.edu.br%2Fseer%2Findex.php%2Fcienciasmedicas%2Farticle%2Fdownload%2F1063%2F1039&usg=AOvVaw3PMKSQIEq7sj3SFdxilyae>>. Acesso em: 9 out. 2017

Sem medo de errar

Agora que você já aprofundou seus estudos sobre o gênero *Staphylococcus*, poderá auxiliar João a entender melhor o quadro de Marta.

O que é pneumonia?

Como a paciente Marta, que estava saudável ao entrar no hospital, pode ter adquirido a pneumonia? Justifique.

Pneumonia é uma infecção pulmonar normalmente provocada pela penetração de um agente infeccioso ou irritante (bactérias, fungos, vírus e reações alérgicas) no espaço alveolar, no qual ocorre a troca gasosa. O espaço alveolar deve sempre estar livre de impurezas (limpo), a fim de evitar que estas impurezas impeçam o contato do ar com sangue.

Uma vez que Marta, que estava saudável, se submeteu a um procedimento cirúrgico, ela adquiriu a pneumonia dentro do hospital, ao que tudo indica no momento da cirurgia, em que a bactéria alcançou a corrente sanguínea e migrou para o pulmão.

Avançando na prática

Pneumonia em idoso

Descrição da situação-problema

João compreendeu que sua esposa adquiriu a pneumonia no hospital, mas, quando o médico disse que, em razão da Marta ser idosa, ela precisava ficar mais alguns dias internada por precaução, João se desesperou. Ele questionou o médico por que a pneumonia em idosos requer maiores cuidados. Sua esposa corre risco de vida?

Resolução da situação-problema

Como Marta tem diabetes, mesmo controlada há grandes chances de complicações, uma vez que a infecção pode descompensar a outra doença do paciente, nesse caso a diabetes.

O fator determinante para a internação, além do estágio de evolução da pneumonia, são as doenças associadas (diabetes, insuficiência cardíaca, câncer).

Além disso, quanto mais velho, mais doenças crônicas o paciente apresenta e também a reserva funcional cardíaca (capacidade do coração bombear sangue no corpo) e respiratória (capacidade de respirar) é menor. Portanto, o diagnóstico e o tratamento precoce são fundamentais para a resolução do quadro de pacientes mais velhos.

Se Marta não for tratada de forma rápida e eficaz (antibiótico correto), ela corre risco de vida.

Faça valer a pena

1. *Staphylococcus aureus* é um anaeróbio facultativo e patógeno oportunista. Embora seja um membro da microbiota normal, é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente causador de várias infecções, desde aquelas superficiais até as mais disseminadas com elevada gravidade.

Com relação às patologias e sintomatologias associadas ao gênero *Staphylococcus aureus*, assinale a alternativa correta:

- a) Têm grande importância clínica, embora não possuam grandes percentuais de infecções hospitalares graves.
- b) As infecções estafilocócicas podem ser classificadas em superficiais e medianas.
- c) Causam doença pela produção de toxina e também pela divisão nos tecidos.
- d) A lesão típica é a formação de pus que acompanha o processo infeccioso.
- e) As patologias causadas pelo *Staphylococcus aureus* podem ser divididas em três principais tipos: infecções superficiais, infecções sistêmicas e os quadros tóxicos.

2. O *Staphylococcus epidermidis* também é um constituinte da microbiota normal da pele e mucosas e pode causar infecções em indivíduos expostos a fatores de risco.

As principais doenças causadas por essa bactéria são bacteremias/septicemias, endocardites, meningites, peritonites, endoftalmite, osteomielites, artrites, infecções do trato urinário, dentre outras.

Com relação às patologias e sintomatologias associadas ao gênero *Staphylococcus epidermidis*, assinale a alternativa correta:

- a) O biofilme produzido pelos *S. epidermidis* pode ser considerado seu principal fator de virulência, pois, além de funcionar como um reservatório de bactérias, também facilita a penetração e a difusão de antimicrobianos.
- b) As infecções causadas pelo *S. epidermidis* geralmente ocorrem em ambientes hospitalares, durante tratamentos e intervenções cirúrgicas, em que são utilizados cateteres e implantes plásticos ou metálicos.

- c) Por apresentar um conjunto de enzimas e toxinas, o *S. epidermidis* causa infecções as quais tendem a ser subagudas ou até crônicas.
- d) O *S. epidermidis* é a espécie clínica encontrada com menor frequência.
- e) Mesmo sendo um patógeno oportunista, o *S. epidermidis* não necessita de hospedeiros para atuar como agente patogênico.

3. O diagnóstico laboratorial de doenças estafilococais é feito através de análises de amostras colhidas de pacientes com suspeitas da doença. A detecção bem-sucedida dos microrganismos numa amostra clínica depende do tipo de infecção e da qualidade do material submetido à análise. As amostras coletadas são submetidas a exames, que podem ser físicos, bacteriológicos e bioquímicos.

Sobre o diagnóstico laboratorial de doenças estafilococais, é correto afirmar:

- a) No exame bacterioscópico das secreções purulentas, podem ser observados arranjos em forma de cachos de uva ou isolados. O isolamento é feito com meios de cultura comuns (ágar sangue), em que a bactéria forma colônias grandes (amarelo ouro) e com frequência β -hemolíticas. Meios seletivo-indicadores não podem ser usados.
- b) Não é possível realizar a diferenciação do *S. aureus* de outras espécies do gênero.
- c) Não é possível encontrar o *S. aureus* no alimento que contém a enterotoxina responsável pelas manifestações clínicas.
- d) O *S. epidermidis* isolado em meio de cultura apresenta colônias pigmentadas ou esbranquiçadas e hemolíticas.
- e) A diferenciação entre o *S. epidermidis* e o *S. aureus* é feita através das características culturais e morfológicas das duas espécies, principalmente pelo teste de coagulação, que é positivo para o *S. aureus* e negativo para o *S. epidermidis*.

Seção 2.2

Cocos Gram-positivos: gênero *Streptococcus*

Diálogo aberto

Prezado aluno, dando início ao estudo do gênero *Streptococcus*, vamos retomar o caso de Marta, aquela paciente que deu entrada ao hospital com uma fratura de fêmur e, alguns dias depois, começou a apresentar um quadro de febre alta, tosse seca, dificuldade em respirar e fraqueza. Diagnosticada com pneumonia, Marta teve sua alta suspensa para a realização do tratamento no hospital.

Dessa forma, você irá auxiliar o médico a explicar ao Sr. João sobre o tratamento de sua esposa.

Após as explicações do médico, João compreendeu como Marta adquiriu a pneumonia e que, sendo assim, realmente precisava de tratamento adequado por ser idosa e, dessa forma, ter necessidade de maiores cuidados.

João queria saber como seria o tratamento de sua esposa, quais seriam os medicamentos e uma estimativa de quando ela seria liberada.

Tendo o conhecimento de que a pneumonia adquirida por Marta é bacteriana, qual o tratamento indicado a paciente?

Nesse caso, há necessidade de solicitação de algum outro exame?

Não pode faltar

Patologias e sintomatologias associadas ao gênero *Streptococcus*

Os *Streptococcus* são cocos Gram-positivos que se apresentam em cadeias longas ou curtas.

São constituintes da microbiota normal da boca, pele, intestino e trato respiratório superior. São imóveis e não produzem catalase, portanto, diferentemente do *Staphylococcus*, são catalase-negativa. São muito resistentes uma vez que não precisam da presença do oxigênio para sobreviver (anaeróbias), contudo as produtoras de

ácido láctico não são sensíveis ao oxigênio. Dessa forma, podem crescer em sua presença, sendo, então, classificadas como anaeróbias facultativas.

São responsáveis por causar várias doenças nos homens e animais.

De acordo com as características apresentadas, os *Streptococcus* podem ser classificados em:

1. β – hemolítico: quando causa lise total da hemácia.
 2. Não β – hemolítico: quando causa lise parcial da hemácia.
- Podendo ser subdivididos em:

- 2.1. α - hemolítico: quando causa lise parcial das hemácias.
- 2.2. γ (gama) ou não hemolítico: quando não causa hemólise.

Outro tipo de classificação foi criado em 1993, por Rebeca Lancefield (classificação de Lancefield), com base nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, o qual fica localizado na parede da célula e que, dessa forma, pode ser detectado por diversas técnicas imunológicas.

Sendo assim, os *Streptococcus* foram divididos em 20 grupos sorológicos (A até E e N) e mais tarde foram incorporados outros grupos (F, G, H, K, L, M, O, P, Q, R, S, T, U e V).

Figura 2.2 | Padrões de hemólise



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cc/Streptococcal_hemolysis.jpg>. Acesso em: 20 out. 2017

Estreptococos dos grupos C e G

Geralmente, pertencem às espécies *Streptococcus dysgalactiae* ou *Streptococcus equi* e, com relação ao fator de virulência, são semelhantes ao *S. pyogenes*. Causam infecções graves, como bacteremias, endocardites, meningites, artrites sépticas, infecções respiratórias e cutâneas. Podem ainda causar infecções piogênicas (formadoras de pus), com abscessos, mesmo sendo constituintes da microbiota normal.

Streptococcus dos grupos D: complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

Possui semelhança com os enterococos, principalmente no trato gastrointestinal. Importante responsável pela endocardite, que é o quadro mais associado a essa bactéria. A endocardite prevalece entre os idosos acima de 60 anos, com uma taxa elevada de mortalidade se comparada à endocardite de outras espécies.



Assimile

Streptococcus dos grupos D: complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*

Antigamente, esse grupo era dividido em enterococos e não enterococos. Como os enterococos passaram a formar um novo gênero (*Enterococcus*), o grupo ficou representado pelo *Streptococcus bovis*, de grande importância médica.

Streptococcus Viridans

Constituem um conjunto de microrganismos com características menos definidas e padronizadas que os demais estreptococos.

Entre suas principais características, destacam-se: não são β -hemolíticos, não possuem antígenos dos grupos B ou D, não são solúveis em bile nem sensíveis à optoquina e a maioria não cresce em caldo contendo concentrações elevadas de cloreto de sódio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Possuem cinco principais grupos de espécies: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus anginosus*.

Na sua grande maioria, são constituintes da microbiota normal do trato respiratório superior (cavidade oral), podendo causar abscessos dentários e endocardites. Causam ainda bacteremia, infecções no trato geniturinário e infecções de feridas. Em pacientes com câncer, podem levar à sepse e bacteremia.

As espécies de *Streptococcus sanguis* e, principalmente, *Streptococcus mutans* auxiliam na formação da placa dental.

***Streptococcus agalactiae* – estreptococo grupo B**

β hemolítico, colonizador comum da vagina e é o causador frequente de meningite neonatal.

O *S. agalactiae* é uma bactéria muito comum que pode colonizar a vagina das mulheres sem manifestar qualquer sintoma. Em mulheres sadias, normalmente não provoca doenças, contudo, em mulheres grávidas, pode trazer complicações as quais podem ser transmitidas ao bebê durante o parto. Indivíduos com o sistema imunológico deficiente, como idosos e adultos portadores de doenças crônicas que comprometem as defesas do organismo, são mais propensos a infecções. A maioria das mulheres com a bactéria se contamina por estreptococos oriundos do seu próprio intestino ou da região do reto. Nas mulheres grávidas, o *S. agalactiae* adere ao epitélio vaginal, placenta, células epiteliais da boca e da faringe, epitélio e endotélio alveolares, e são essas interações que ajudam na transmissão da bactéria e o início da infecção. Há uma preocupação muito grande da contaminação do bebê durante o parto. A contaminação pela bactéria ocorre no momento da ruptura da bolsa ou durante a passagem do bebê pelo canal vaginal.

O *S. agalactiae* consegue penetrar e sobreviver no interior das células. A bactéria é capaz de penetrar na cavidade amniônica através da placenta íntegra e causar infecções graves no feto, muitas vezes fulminantes. A aspiração do líquido amniótico contaminado pelo feto e de secreção vaginal pode levar a bactéria aos alvéolos pulmonares, onde ela poderá se proliferar rapidamente. Após invadir os pulmões, o sistema imunológico irá atuar para eliminá-la do organismo. Os recém-nascidos, especialmente os prematuros, apresentam deficiência no sistema imunológico, o que favorece a disseminação da bactéria ao organismo. A bactéria pode se

disseminar pela corrente sanguínea e alcançar vários tecidos como meninges, ossos e articulações.

As manifestações da infecção podem ocorrer nas primeiras horas de vida do bebê ou até semanas após o parto. A infecção que ocorre logo no início, nas primeiras 24 horas até os sete primeiros dias de vida, causa pneumonia, meningite e septicemia. O bebê apresenta febre, dificuldade de mamar e dificuldade respiratória, podendo ocorrer ainda convulsões, fraqueza ou rigidez muscular.

As infecções que acometem os bebês após sete dias do nascimento são chamadas de infecções tardias e normalmente causam sepse e meningite.



Pesquise mais

Aprenda mais sobre a importância da detecção de *Streptococcus agalactiae* em mulheres gestantes lendo o artigo: "A Importância da detecção de *Streptococcus agalactiae* (β -hemolítico do grupo B) em mulheres gestantes". Disponível em: <<http://www3.izabelahendrix.edu.br/ojs/index.php/aic/article/view/486/409>>. Acesso em: 20 out. 2017.

***Streptococcus pneumoniae* – pneumococo**

São cocos Gram-positivos que se dispõem em pares ou em cadeias curtas. Anaeróbios facultativos e não produtores de catalase. São encontrados com frequência no trato respiratório superior de indivíduos normais.

A infecção pelo *S. pneumoniae* inicia-se com a colonização da nasofaringe pela bactéria, podendo alcançar os ouvidos, os pulmões e até a corrente circulatória. De acordo com a via de disseminação, o indivíduo infectado poderá apresentar otite média, pneumonia, meningite ou outros tipos de infecções. Para que a bactéria sobreviva e se multiplique no organismo humano, é necessário transpassar as defesas do organismo. Para isso, dependem da presença de cápsula e de proteínas. A disseminação no ouvido médio e pulmões é um processo quase direto, contudo, para que consigam atingir as meninges, é necessário atravessar a barreira hemoliquórica a qual é normalmente impermeável às bactérias.



Assimile

Barreira hemoliquórica é a barreira que impede ou dificulta a passagem dos elementos circulantes no sangue para o líquido. Funciona como um dos mecanismos de proteção do encéfalo contra agentes que poderiam lesá-lo ou alterar o seu funcionamento.

O *S. pneumonia* pode causar pneumonia, meningite, bacteremia, otite média e sinusite.

A transmissão se dá através de gotículas de saliva ou muco que são disseminadas quando pessoas infectadas tosse ou espirram. Os indivíduos infectados podem ser apenas portadores, sem apresentar sintomas da doença. Os portadores mais frequentes são crianças pequenas.

***Streptococcus pyogenes* – estreptococo grupo A**

Representantes principais dos estreptococos β hemolíticos. Quando cultivados em caldo, formam cadeias longas. São anaeróbios facultativos e catalase-negativos. Possuem alto poder de adaptação ao organismo humano, podendo causar várias doenças, em especial a faringite bacteriana comum.

De forma frequente, colonizam a laringe sem causar qualquer sintoma. A transmissão se dá através do contato direto ou por secreções (tosses e espirros). A infecção só ocorre se a bactéria vencer os mecanismos de defesa do organismo.

As infecções têm início nas vias aéreas superiores (faringe) ou na pele. Causam faringites de várias intensidades e podem ocasionar complicações como escarlatina, choque tóxico, bacteremias, febre reumática e infecções de outros tecidos. Causam ainda piodermites (infecção purulenta da pele), erisipela (infecção aguda da pele que se caracteriza por vermelhidão da área afetada, febre e calafrios) e fascite necrosante (infecção profunda do tecido conjuntivo subcutâneo, que se caracteriza por destruição do tecido muscular).



Reflita

Vale a pena lembrar que a lavagem das mãos é a melhor forma de evitar a infecção por estreptococos do grupo A.

Lembre-se de lavar as mãos, especialmente após tossir ou espirrar, e antes e depois de cuidar de uma pessoa doente. Isso ajudará bastante a evitar a transmissão de germes.

Evite ainda compartilhar alimentos, bebidas, cigarros ou pratos, copos e talheres.

Cuidado com as crianças! Creches e escolas devem limpar os brinquedos diariamente.

Diagnóstico de doenças estreptocócicas

1. Microbiológico: para a faringite, esfregaços corados não são indicados, pois os *Streptococcus* do grupo *viridans* são membros da flora normal e não é possível os distinguir do *S. pyogenes* visivelmente. Contudo, esfregaços corados de lesões cutâneas ou feridas que identifiquem os estreptococos podem ser usados como diagnóstico.

Culturas de swabs da faringe ou de lesões em placas de ágar sangue formam colônias β hemolíticas. Se essas colônias forem inibidas com discos de bacitracina, muito provavelmente são estreptococos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*).

Os estreptococos do grupo B são caracterizados pela sua capacidade de hidrolisar o hipurato e pela produção de uma proteína que causa hemólise aumentada em sangue de ovelha quando combinada à β hemolisina de *S. aureus* (teste CAMP). Para uma identificação definitiva, utiliza-se a pesquisa do antígeno B através de métodos sorológicos.



Assimile

Teste CAMP: tem por objetivo a identificação de cepas de *S. agalactiae* (grupo B). Essas cepas produzem o fator CAMP (Christie, Atkins e Munch-Petersen), que atua sinergicamente com a β -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* em ágar sangue.

Os estreptococos do grupo D (complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*) hidrolisam esculina na presença de bile, ou seja, produzem um pigmento preto em meio bile-esculina-ágar.

A identificação dos pneumococos pode ser feita utilizando a cultura em meios ricos, como ágar sangue e chocolate. No ágar

sangue, os pneumococos formam colônias circundadas por halos de α hemólise, que podem ser identificados através de testes simples de sensibilidade à optoquina e o de bile-solubilidade. Nos casos de meningite, a cultura deve ser sempre realizada antes do exame microscópico de esfregaços corados por Gram, uma vez que a presença de diplococos Gram-positivos é altamente sugestiva de meningite pneumocócica.

2. Sorológicos e imunológicos: os valores de ASO são altos logo após infecções estreptocócicas do grupo A. Os valores de anti-DNAse B são altos em infecções estreptocócicas do tipo A cutâneas e servem como um indicador de infecção estreptocócica anterior em pacientes com suspeita de glomerulonefrite aguda.

Para a identificação de pneumococos, um método que pode ser utilizado para o liquor e sangue é a pesquisa de antígenos capsulares por diferentes técnicas imunológicas. Recentemente, verificou-se que a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser útil para o diagnóstico de infecções pneumocócicas.



Exemplificando

Entenda melhor sobre os testes ASO e anti-DNAse:

ASO, ou **ASLO**, é a sigla de um anticorpo produzido em nosso corpo, conhecido como **antiestreptolisina O**. É um anticorpo contra a substância conhecida como estreptolisina O, uma toxina que é produzida pelas bactérias do gênero *Streptococcus*. Indica a quebra de hemácias ou glóbulos vermelhos do sangue (processo conhecido como hemólise), muito importantes no transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos do nosso corpo, dentre outras funções. Assim, quando entramos em contato com essa bactéria, o nosso corpo produz esse anticorpo em resposta à infecção, para evitar que nossas hemácias sejam destruídas. Sempre que esse anticorpo estiver presente no sangue, ele indicará contato com o *S. pyogenes*.

Após a infecção estreptocócica, os níveis desse anticorpo começam a se elevar depois de 1 a 3 semanas e atingem um pico dentro de 3 a 5 semanas após a infecção. Depois desse período, seus valores começam a regredir, até chegar a níveis insignificantes em torno de 6 meses.

Anti-DNAse:

A desoxirribonuclease B é um antígeno produzido pelos estreptococos do grupo A. O teste anti-desoxirribonuclease B é utilizado para detectar esses anticorpos. Se os anticorpos estão presentes, a pessoa teve uma infecção estreptocócica. O anti-DNAse B aumenta depois que a pessoa se recupera da infecção. Esse teste é considerado mais sensível que a antiestreptolisina-O (ASO). O teste é particularmente útil no diagnóstico da febre reumática e glomerulonefrite pós-estreptocócica.

Estudo laboratorial dos *Streptococcus*

Em cerca de 15 a 20% das crianças clinicamente normais, é possível isolar os estreptococos do grupo A em culturas de garganta ou nasofaringe. Contudo, para finalidades clínicas, não são considerados hospedeiros normais da garganta e nasofaringe, pois as culturas realizadas no estágio agudo da infecção não diferenciam facilmente o estado portador do verdadeiro patógeno. Acredita-se que o tratamento imediato da infecção nasofaríngea por estreptococos do grupo A possa diminuir a possibilidade de febre reumática aguda ou glomerulonefrite aguda. Verificou-se ainda que a incubação anaeróbica no lugar da aeróbica aumenta a sensibilidade em cerca de 15% e que a obtenção de amostras de dois swabs, ao invés de um, aumenta o rendimento em 10%.

O uso de meios diferenciais especiais, com adição de antibióticos, ajuda a reduzir o crescimento de outros microrganismos, por exemplo, espécies hemolíticas de *Haemophilus*, que podem simular colônias de estreptococos β hemolíticos. Porém, nem todas as técnicas produzem o mesmo efeito aditivo quando combinadas. Embora os estreptococos do grupo A sejam quase sempre sensíveis à penicilina nos antibiogramas, cerca de 10 a 30% dos pacientes tratados de forma adequada continuam apresentando os microrganismos considerados portadores.

Para os estreptococos do grupo B, o diagnóstico é mais frequentemente estabelecido através de cultura materna. O melhor resultado é obtido com a coleta de material com um ou mais swabs de múltiplos locais do terço distal da vagina e da área do períneo, colocados posteriormente em meio líquido seletivo de cultura (normalmente caldo Todd-Hewitt). Existem provas imunológicas

rápidas, contudo a sensibilidade dos kits é de apenas 40 a 60%. As taxas maiores se apresentam em pacientes com colonização maciça. Não há nenhuma relação segura entre o grau de colonização e a taxa de infecção do bebê, embora a colonização maciça apresente maior probabilidade de resultar em infecção neonatal. Em geral, as culturas positivas obtidas no início da gestação apresentam uma probabilidade de 70 a 80% de se apresentarem associadas a uma cultura positiva no parto, enquanto que uma cultura negativa obtida no início da gravidez é muito menos confiável. O método mais utilizado e confiável para profilaxia é a administração parenteral de antibióticos durante o parto (penicilina ou ampicilina), tendo o início do tratamento antes do parto. As recomendações mais frequentes para esse tratamento profilático são a obtenção de cultura positiva antes do parto ou a presença de fatores de risco materno.

Como já falamos anteriormente, a cultura é a principal prova diagnóstica para os estreptococos do grupo B. Além delas, as provas rápidas de aglutinação do látex para o antígeno do estreptococo do grupo B em líquidos corporais são bastante disponíveis e fornecidas por muitos fabricantes. Os registros existentes indicam que essas provas, quando realizadas com urina concentradas, detectam 90 a 100% dos casos de bacteremia neonatal por estreptococos do grupo B com culturas positivas. O soro ou a urina menos concentrada não é indicado.

Em geral, os pneumococos produzem hemólise muitas vezes incompleta, imitando os *Streptococcus viridans*, o que torna a diferenciação morfológica difícil. Como já discutimos, em laboratório a diferenciação é rapidamente efetuada utilizando-se disco de optoquina. Coloca-se um disco impregnado de optoquina na placa de cultura e a inibição de cocos alfa hemolíticos indica a presença de pneumococos. Além do diagnóstico por cultura, existem provas rápidas de aglutinação de látex em lâmina para antígeno pneumococócico, desenvolvidos para avaliar o líquido céfalo-raquidiano em pacientes com meningite. Contudo, nos poucos estudos existentes, a detecção do antígeno no soro ou na urina não concentrada tem sido menos de 40%. A sensibilidade na urina concentrada pode ser consideravelmente maior, porém os dados disponíveis ainda são insuficientes.

Sem medo de errar

Agora que você já aprofundou seus estudos sobre o gênero *Streptococcus*, poderá auxiliar o médico na explicação para o Sr. João sobre o tratamento de Marta.

Qual o tratamento indicado à paciente?

Nesse caso, há necessidade de solicitação de algum outro exame?

O tratamento indicado é o uso de antibiótico de amplo espectro, normalmente azitromicina, ceftriaxona ou levofloxacina.

Quando é feito o diagnóstico clínico, na maioria das vezes não é necessário fazer a diferenciação da bactéria, essa só é necessária quando o paciente não responde ao tratamento com o antibiótico de amplo espectro.

Como é conhecido que os principais agentes são os *Streptococcus pneumoniae*, o *Mycoplasma*, a clamídia e o *Hemophilus*, muitas vezes, o tratamento é realizado com antibióticos que cobrem todas essas bactérias sem a necessidade de identificar o agente causador. O antibiótico estando correto, a febre e a intoxicação causadas pelas toxinas melhoram entre 3 e 4 dias e os sintomas desaparecem entre 7 e 10 dias do início do tratamento. Importante ressaltar que a radiografia indica infiltração pulmonar até um mês após o paciente estar curado.

Se Marta apresentar resposta ao tratamento, não há necessidade de outros exames complementares.

Avançando na prática

O ar-condicionado e a pneumonia

Descrição da situação-problema

Nos dias atuais, quase todos os locais públicos, como bancos, escolas, hospitais, dentre outros, possuem ambiente climatizado em virtude das altas temperaturas. O ar-condicionado representa um fator de risco para infecções?

Resolução da situação-problema

Com certeza, sim. O ar-condicionado deixa o ar muito seco, o que favorece a penetração dos germes ao organismo. Além disso, o aparelho recicla o ar do ambiente e, se alguma pessoa contaminada estiver em locais públicos com ar-condicionado, mesmo sem apresentar a doença, o ar-condicionado irá disseminar as bactérias de forma rápida, dessa forma, funcionando como um vetor de transmissão.

Além disso, a falta de manutenção do aparelho pode agravar o problema.

Veja mais sobre esse tema com o artigo: "A qualidade do ar em ambientes hospitalares climatizados e sua influência na ocorrência de infecções". Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/revista6_2/ar.html>. Acesso em: 20 out. 2017.

Faça valer a pena

1. Os *Streptococcus* são cocos Gram-positivos que se apresentam em cadeias longas ou curtas.

São constituintes da microbiota normal da boca, pele, intestino e trato respiratório superior. São imóveis e não produzem catalase, portanto, diferente do *Staphylococcus*, são catalase-negativa. São muito resistentes, uma vez que não precisam da presença do oxigênio para sobreviver (anaeróbias), contudo as produtoras de ácido láctico não são sensíveis ao oxigênio. Dessa forma, podem crescer em sua presença, sendo, então, classificadas como anaeróbias facultativas.

De acordo com as características apresentadas pelos estreptococos, assinale a alternativa correta sobre a sua classificação:

- a) β – hemolítico: quando causa lise parcial da hemácia.
- b) Não β – hemolítico: quando não causa lise da hemácia.
- c) α - hemolítico: quando não causa lise nas hemácias.
- d) γ (gama) ou não hemolítico: quando causa lise total das hemácias.
- e) Os β hemolíticos podem ser subdivididos em α e γ .

2. As infecções estreptocócicas são causadas por bactérias Gram-positivas denominadas estreptococos. Os estreptococos são agrupados de acordo com seu comportamento, suas características químicas e seu aspecto.

Com base nos tipos de estreptococos estudados, assinale a alternativa correta:

a) *Streptococcus* do grupo D: constituem um conjunto de microrganismos com características menos definidas e padronizadas que os demais estreptococos.

b) *Streptococcus pyogenes*: possuem alto poder de adaptação ao organismo humano podendo causar várias doenças, em especial a faringite bacteriana comum.

c) *Streptococcus agalactiae*: β hemolítico, colonizador comum da vagina e é o causador frequente de infecção urinária.

d) *Streptococcus pneumoniae*: são cocos Gram-positivos que se dispõem em pares ou em cadeias curtas. Anaeróbios facultativos e produtores de catalase. São encontrados com frequência no trato respiratório superior de indivíduos normais.

e) *Streptococcus viridans*: possuem semelhança com os enterococos, principalmente no trato gastrointestinal. Importante responsável pela endocardite, que é o quadro mais associado a essa bactéria.

3. Os estreptococos provocam doenças muito graves e muitas vezes letais, sendo importante o rápido diagnóstico. O diagnóstico do gênero *Streptococcus* spp., bem como das diferentes espécies, pode ser feito em diversos níveis de complexidade.

Com relação aos testes existentes para o diagnóstico de estreptococos, assinale a alternativa correta:

a) O diagnóstico de doenças estreptocócicas pode ser realizado através de testes microbiológicos, sorológicos e imunológicos.

b) Para as faringites, são indicados esfregaços corados para que se possa isolar os *Streptococcus viridans*.

c) Culturas de swabs da faringe ou de lesões em placas de ágar sangue formam colônias não β hemolíticas. Se essas colônias forem inibidas com

discos de bacitracina, muito provavelmente são estreptococos do grupo A (*Streptococcus pyogenes*).

d) Os estreptococos do grupo B são caracterizados pela sua capacidade de hidrolisar o hipurato e pela produção de uma proteína que causa hemólise aumentada em sangue de ovelha quando combinada à β hemolisina de *S. agalactiae*.

e) Os estreptococos do grupo D (complexo *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus*) hidrolisam esculina na presença de bile, ou seja, produzem um pigmento marrom em meio bile-esculina-ágar.

Seção 2.3

Cocos Gram-positivos: família *Enterococcaceae* e Gram-negativas: família *Enterobacteriaceae*

Diálogo aberto

Caro aluno, dando início ao estudo do gênero *Enterococcus*, vamos retomar o caso de Marta, aquela paciente que deu entrada ao hospital com uma fratura de fêmur e, alguns dias depois, apresentou um quadro de pneumonia bacteriana. Ela ficou internada por mais alguns dias e iniciou seu tratamento.

Com base em seus conhecimentos, você deverá auxiliar o médico a explicar ao Sr. João sobre a resistência bacteriana.

Após 3 dias, Marta continuava a apresentar febre, fraqueza e dor no peito. Após realizar alguns exames de sangue, verificou-se que a paciente continuava a apresentar um quadro de infecção. O médico, então, chamou o Sr. João para conversar e explicou que Marta não estava respondendo aos antibióticos. Sendo assim, seria necessário um novo exame para então administrar um antibiótico eficaz e, dessa forma, a paciente começar a responder ao tratamento.

Qual exame seria necessário para identificar um antibiótico que não fosse resistente à bactéria?

Para entender melhor as patologias causadas pelas bactérias, sugerimos que você elabore uma tabela contendo as principais patologias causadas pelos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Não pode faltar

Patologias e sintomatologias associados à família *Enterobacteriaceae* e *Enterococcaceae*

Os enterococos são cocos Gram-positivos, constituintes da microbiota endógena do trato gastrointestinal. São patógenos oportunistas e a causa comum de cistites e infecções nosocomiais.



Infecção nosocomial é quando o paciente desenvolve um processo infeccioso produzido por bactérias dentro de um hospital. São infecções contraídas durante a “estadia” em um hospital, clínica e demais estabelecimentos de saúde.

Conforme já falamos anteriormente, os enterococos por muito tempo foram considerados uma das categorias dos estreptococos pertencentes ao grupo D. Os estreptococos eram diferenciados das espécies do grupo D não enterococos, devido as suas características fisiológicas e de sua fragilidade a agentes físicos e químicos, é o caso dos *Streptococcus bovis*. Essas diferenças somadas a sequenciamento de genes e dados de hibridização de ácidos nucleicos (pareamento complementar de bases entre os ácidos nucleicos de fita simples, os quais geram um produto de fita dupla como DNA/DNA, RNA/RNA, DNA/RNA) demonstram a distância genética do grupo D não enterococos dos *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, originando, assim, um novo gênero chamado *Enterococcus*. A seguir, outros estreptococos do grupo D foram alocados para o novo gênero, e também novas espécies têm sido adicionadas, muitas das quais têm surgido como agentes de infecção. Mais de 30 espécies são conhecidas. As mais frequentes são *E. faecalis* e *E. faecium*, as quais foram isoladas a partir de seres humanos.

Os *Enterococcus* constituem um gênero muito característico pela sua resistência intrínseca aos principais antimicrobianos e pela sua capacidade de manifestar novas formas de resistência adquirida, ganhando destaque entre as principais bactérias relacionadas à resistência bacteriana aos antibióticos e aos principais agentes de infecções hospitalares.

Enterococcus faecalis

É a espécie mais frequente do gênero, representando cerca de 80 a 85% das amostras de enterococos isoladas em material clínico. É um dos maiores responsáveis pela infecção hospitalar e, como agravante, adquiriu resistência à maior parte dos antimicrobianos, incluindo a tão eficaz vancomicina. Possui capacidade de crescer em condições variadas de temperatura e pH e também na presença

de concentração elevada de cloreto de sódio e bile. Membro da microbiota normal do trato gastrointestinal, pode também ser encontrado na mucosa oral e vagina e na pele. É encontrada com frequência em alimentos, água, solo e no meio ambiente em geral. A infecção se dá quando a bactéria migra para outros órgãos ou locais sensíveis. As mãos dos profissionais de saúde representam a maior fonte de transmissão, e a bactéria é capaz de sobreviver nas mãos, luvas e vestimentas desses profissionais.

O trato-urinário, as feridas, principalmente aquelas decorrentes de cirurgias, e a corrente sanguínea são os locais mais infectados. As endocardites enterocócicas são também muito frequentes com manifestações clínicas como febre, sopro, perda de peso, dores generalizadas e mal-estar. A complicação mais comum da endocardite é a insuficiência cardíaca.

Família *Enterobacteriaceae*

Bacilos Gram-negativos encontrados principalmente no cólon, tanto humano quanto animal. Muitos deles são constituintes da flora normal.

A família *Enterobacteriaceae* é uma das mais importantes das famílias bacterianas e nela está incluindo o ser vivo mais conhecido, a *Escherichia coli*, e muitos outros dos patógenos mais isolados para os homens e animais. Esses patógenos (no ser humano) estão entre os principais agentes de infecção hospitalar e são responsáveis pela principal causa de infecção intestinal em muitos países. A relação desses patógenos com os animais é de grande importância, uma vez que representa um vasto reservatório de patógenos humanos.

A família das enterobactérias é constituída por cerca de 30 gêneros e mais de 100 espécies.

Podem causar infecções intestinais e extraintestinais. As infecções extraintestinais podem ser localizadas ou sistêmicas. As infecções localizadas mais frequentes são das vias urinárias, pulmonares, do sistema nervoso central, da pele e do tecido celular subcutâneo, no caso das feridas. As bacteremias são muito frequentes, uma vez que as infecções intestinais e extraintestinais podem permanecer localizadas ou se tornarem infecções sistêmicas. As bacteremias podem ocorrer pela translocação para a corrente sanguínea de enterobactérias presentes nos intestinos.

Diagnóstico de doenças causadas por enterobactérias

Amostras com suspeitas de conter enterobactérias são inoculadas em dois meios de cultura: uma placa de ágar sangue e outra em um meio seletivo diferencial, como o ágar MacConkey ou ágar eosina azul de metileno. A capacidade diferencial se baseia na fermentação de lactose, critério metabólico mais importante utilizado na identificação. Nesse meio, os microrganismos não fermentadores de lactose (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*) formam colônias não incolores, enquanto os microrganismos fermentadores de lactose formam colônias coradas (róseas).

O diagnóstico das infecções extraintestinais se dá pelo isolamento das enterobactérias e sua identificação. O isolamento é realizado sem dificuldade, já que as enterobactérias crescem bem em meios de cultura simples sólidos e líquidos e em meios seletivos como MacConkey.

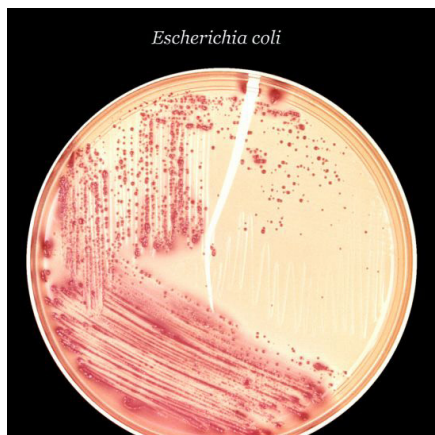
Para a identificação, é necessário considerar de forma separada as mais frequentes e típicas e as mais raras e difíceis.

A identificação das formas mais frequentes e simples é de forma simples, requerendo apenas algumas características culturais e algumas provas bioquímicas.

Características culturais:

- Odor de crescimento: alguns odores são clássicos e conhecidos, por exemplo: *E. coli*, que exala odor de esperma; *P. mirabilis*, um odor de putrefação; e *Providencia sp.*, um odor adocicado inconfundível. Vale lembrar que esses odores dependem de produtos do metabolismo de diferentes espécies.
- Morfologia das colônias: em placas de Macconkey, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* formam colônias altamente sugestivas de espécies.

Figura 2.3 | Morfologia de colônias de *E. coli* em placas de MacConkey



Fonte: <<https://pixnio.com/science/microscopy-images/escherichia-coli/inoculated-macconkey-agar-culture-plate-cultivated-colonial-growth-of-gram-negative-escherichia-coli-bacteria>>. Acesso em: 30 out. 2017.

Figura 2.4 | Morfologia de colônias de *Klebsiella pneumoniae* em placas de MacConkey



Fonte: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Klebsiella_pneumoniae_mucoid.jpg>. Acesso em: 30 out. 2017

- Pigmentação: algumas enterobactérias produzem pigmento característico. O mais típico é o pigmento vermelho produzido por *Serratia marcescens*.
- Testes bioquímicos: algumas espécies de *Enterobacteriaceae* podem ser submetidas a um número pequeno de testes bioquímicos, como lactose, glicose, urease, motilidade, indol, lisina e citrato dentre outros. Esses testes podem

ser feitos utilizando meios de cultura sólidos ou líquidos distribuídos em tubos de ensaio ou em diferentes tipos de kits, como o kit API.

Os testes bioquímicos atendem de forma satisfatória as espécies de enterobactérias que são comumente isoladas. Contudo, de acordo com o grau de exigência na identificação de espécie, muitos testes bioquímicos devem ser utilizados e também outros métodos de identificação, além do sequenciamento do gene ribossômico 16S.

Devido à presença dos antígenos O, K e H, as enterobactérias podem ser divididas em sorogrupos e sorotipos. O método vem sendo mais aplicado para o estudo dos agentes de infecção intestinal. A principal finalidade da sorotipagem é epidemiológica.

Coprocultura ou cultura de fezes é o exame bacteriológico de fezes para verificar a presença ou não de bactérias patogênicas causadoras de infecção intestinal. O exame é recomendado para pacientes com diarreias persistentes, em casos de intoxicação alimentar ou suspeita de doença intestinal.

Sua finalidade é identificar os germes patogênicos causadores de quadros de diarreia aguda ou crônica. São considerados germes enteropatogênicos mais frequentes: *E. coli* invasora; *E. coli* enteropatogênica, enterotoxigênica e enterohemorrágica, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersínea* e *Aeromonas*.



Pesquise mais

Para aprimorar seus conhecimentos em coprocultura, leia o protocolo Coprocultura – *Salmonella* e *Shigella*. Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=9&ved=0ahUKEwjgnN_MtYzXAhXhwFQKHwKDq8QFghTMAg&url=http%3A%2F%2Fwww.medcorp.com.br%2Fmedcorp%2Fupload%2Fdownloads%2FNEWSLAB_Especial%2520Protocolos%2520de%2520Microbiologia_2008724113035.pdf&usg=AOvVaw3mr9xVpL2ay6Kvqy3R1H9M>. Acesso em: 26 out. 2017.

Diagnóstico de doenças enterocociais

O diagnóstico é feito através do isolamento e identificação da amostra. O processo é simples, uma vez que os enterococos podem ser cultivados em meios de cultura comuns, incluindo meios

seletivos para bactérias Gram-negativas. São facilmente identificados pelas suas características fisiológicas, especialmente por serem positivos para os testes de hidrólise da esculina na presença de bile, hidrólise da pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e da leucina- β -naftilamida (princípio de leucina aminopeptidase — teste LAP), e também por crescerem em meios com altas concentrações de cloreto de sódio. Esses testes são importantes para diferenciar os enterococos de outros gêneros cocos Gram-positivos, catalase-negativa. Para identificar as espécies do gênero, são utilizados outros testes. Para a identificação das espécies mais frequentes (*E. faecalis* e *E. faecium*), estão sendo avaliados métodos moleculares e a identificação rápida de genes de resistência.



Exemplificando

Entenda melhor sobre os testes de hidrólise da esculina na presença de bile, hidrólise da pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e da leucina- β -naftilamida (princípio de leucina aminopeptidase — teste LAP):

A prova de bile-esculina baseia-se na hidrólise de esculina em presença de bile por determinadas bactérias. As bactérias bile-esculina positivas crescem em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina gera glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos, resultando em um complexo de cor preta. O escurecimento do meio indicará positividade da prova. Estreptococos do grupo *S.bovis* e *Enterococcus spp.* são positivos, enquanto os demais *Streptococcus spp.* terão resultados negativos (meio com cor inalterada). O ágar bile-esculina é usado, principalmente, para diferenciação e identificação de enterococos e estreptococos.

O teste da PYR é um procedimento qualitativo para determinação da capacidade dos estreptococos para hidrolisarem enzimaticamente a L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR). Facklam, Thacker, Fox e Eriquez referiram que 98% dos estreptococos do grupo A e 96% dos enterococos do grupo D hidrolisam a PYR. Apesar de as espécies de *Aerococcus* raramente serem isoladas em laboratórios clínicos, é esperado que esses microrganismos também hidrolisem a PYR. Facklam et al. referiram ainda que 98% dos estreptococos do grupo B, 100% dos estreptococos não pertencentes aos grupos A, B e D, 100% de enterococos não pertencentes ao grupo D e 82% de *estreptococos viridans* produzem resultados negativos para a PYR.

O teste de LAP é usado para a caracterizar cocos catalase negativa, bactérias Gram-positivas. No geral, *Streptococcus pneumoniae* e

Streptococcus pyogenes, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e SPS são todos LAP positivo, enquanto outros estreptococos beta-hemolítico e SPS *Aerococcus* *Leuconostoc* são LAP negativo*.

* Leucina aminopeptidase (LAP) de teste para a detecção da catalase positiva cocos Gram-negativos. Texto extraído de: <<http://pt.allanswers.site/quimica/leucina-aminopeptidase-lap-de-teste-para-a-deteccao-da-catalase-positiva-cocos-g.php>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

Figura 2.5 | *Enterococcus*



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ed/CPSE_Enterococcus.JPG>. Acesso em: 25 out. 2017

Estudo laboratorial das bactérias da família *Enterobacteriaceae*

Existe um grande número de espécies pertencentes a vários gêneros das *Enterobacteriaceae* que são patógenos menos comuns. Anteriormente, acreditava-se que esses microrganismos não eram patogênicos ou raramente patogênicos. Nos dias atuais, sabe-se que esses microrganismos causam doenças e, de forma mais frequente, infecções das vias urinárias e também septicemia, além de infecções pulmonares. A maioria desses microrganismos recebeu novo nome e foi submetida à nova classificação. Alguns desses microrganismos mais importantes incluem *Arizona*, *Providentia*, *Citrobacter* e *Serratia*. As infecções provocadas por esses microrganismos são normalmente associadas a uma redução da resistência do hospedeiro. No geral, a *Serratia* é considerada a mais perigosa desses microrganismos. Cerca de 90% das infecções causadas por *Serratia* afetam as vias urinárias, e a grande maioria ocorre após cirurgia do trato urinário ou em consequência do uso

de cateteres. Até 50% das infecções das vias urinárias causadas por essa bactéria são assintomáticas. Em 10% dos casos, pode-se desenvolver para bacteremia. Pode ainda desenvolver pneumonia em alguns pacientes.



Refleta

As enterobactérias podem ser naturalmente resistentes a vários antibióticos e também adquirir resistência a todos eles. A resistência adquirida pode ser em decorrência de mutações ou da aquisição de fatores R e em certos casos ocorrendo nas duas modalidades. A frequência dos diferentes tipos de amostras resistentes está ligada ao uso de antibióticos. Sendo assim, lembre-se de usar antibióticos de forma consciente, ou seja, apenas os prescritos pelo seu médico!

Estudo laboratorial das bactérias do gênero *Enterococcus*

A grande maioria das infecções graves do grupo D é causada por *Enterococcus*, os quais são normalmente encontrados no trato intestinal do homem e apresentam características laboratoriais especiais, como resistência ao calor, e crescimento em alguns meios, como bile-esculina e cloreto de sódio a 6,5%. Algumas espécies produzem hemólise alfa, outras provocam hemólise beta e algumas são gama (não hemolíticas).

Os *Enterococcus* se destacam por ser um dos responsáveis por causar endocardite infecciosa, estando presente em cerca de 10 a 12% dos casos, e, além desse, adquiriram importância por estarem quase sempre envolvidos em outras infecções hospitalares, especialmente nas urinárias, em cerca de 10% dos casos, e também por serem parcialmente resistentes ou resistentes à penicilina.

Sem medo de errar

Agora que você já aprofundou seus estudos sobre o gênero *Enterococcus*, poderá auxiliar o médico na explicação para o Sr. João sobre a necessidade de novos exames para o correto tratamento de Marta.

Qual exame seria necessário para identificar um antibiótico que não fosse resistente à bactéria?

No caso das pneumonias, existe uma grande dificuldade em determinar o agente causador. O diagnóstico realizado é clínico, pois, na maioria das vezes, não importa fazer a diferenciação. A diferenciação só é necessária quando o paciente não responde ao tratamento inicial com antibiótico de amplo espectro, o que ocorreu com a Marta. Nesse caso, será necessário realizar o teste de sensibilidade de antibióticos (antibiograma). O teste de sensibilidade a antibióticos “mede” a sensibilidade de uma bactéria a um determinado antibiótico, permitindo a escolha mais eficaz para atuar contra a bactéria. O teste só é possível de ser realizado se utilizarmos uma cultura bacteriana isolada. Deverá ser coletada uma amostra (escarro) que irá seguir para o laboratório de microbiologia. O laboratório irá analisar a amostra e realizar a cultura da bactéria. Na sequência, será aplicado o teste de sensibilidade.

Para conhecer melhor o teste de sensibilidade, acesse o manual para antibiograma – difusão em disco (Kirby & Bauer). Disponível em: <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKewjsl6Pj_JrXAhUGgpAKHQ-qAQkQFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.interlabdist.com.br%2Fdados%2Fnoticias%2Fpdf_190.pdf&usg=AOvVaw3_sSzdBbr2rjwMptxOq15W>. Acesso em: 31 out. 2017.

Avançando na prática

Pneumonia e cigarro

Descrição da situação-problema

Dando continuidade ao nosso tema de pneumonia, quais as relações do cigarro com a pneumonia?

Resolução da situação-problema

O cigarro é um dos principais fatores que facilitam o aparecimento de pneumonia. O fumante corre um risco maior de ter a doença, pois o fumo causa uma reação inflamatória que facilita a entrada de agentes agressores no pulmão. Além disso, para se defender do cigarro, o pulmão produz muito muco e as secreções são alvo das bactérias.

Faça valer a pena

1. Os enterococos são cocos Gram-positivos, constituintes da microbiota endógena do trato gastrointestinal. São patógenos oportunistas e a causa comum de cistites e infecções nosocomiais. Os enterococos por muito tempo foram considerados uma das categorias dos estreptococos pertencentes ao grupo D.

Com relação às patologias e sintomatologias associadas aos *Enterococcus*, é correto afirmar:

- a) Eram diferenciados das espécies do grupo D não enterococos (*Streptococcus bovis*) com base em suas características morfológicas e de sua fragilidade a agentes físicos e químicos.
- b) Outros estreptococos do grupo D foram alocados para o novo gênero, e também novas espécies têm sido adicionadas, muitas das quais têm surgido como agentes de inflamação. Mais de 30 espécies são conhecidas. As mais frequentes são *Streptococcus vermicularis*, as quais foram isoladas a partir de seres humanos.
- c) Constituem um gênero muito característico pela sua resistência intrínseca aos principais antimicrobianos.
- d) Não possuem capacidade de manifestar novas formas de resistência adquirida.
- e) Os enterococos ganharam destaque entre as principais bactérias em virtude de sua sensibilidade bacteriana a quase todos os antibióticos.

2. Bacilos Gram-negativos encontrados principalmente no cólon, tanto humano quanto animal. Muitos deles são constituintes da flora normal. A família *Enterobacteriaceae* é uma das mais importantes das famílias bacterianas e nela está incluído o ser vivo mais conhecido, a *Escherichia coli*, e muitos outros dos patógenos mais isolados para os homens e animais.

Com relação às patologias e sintomatologias associadas às enterobactérias, é correto afirmar:

- a) Estão entre os principais agentes de infecção hospitalar e são responsáveis pela principal causa de infecção intestinal infantil.
- b) Os animais não representam um reservatório de patógenos humanos.
- c) A família das enterobactérias é constituída por cerca de 5 gêneros e mais de 10 espécies.

- d) Podem causar apenas infecções intestinais.
- e) As bacteremias são muito frequentes e podem ocorrer pela translocação para a corrente sanguínea de enterobactérias presentes nos intestinos.

3. Os *enterococcus* constituem um importante grupo de microrganismos que se destacam cada vez mais como patógenos oportunistas. O diagnóstico do gênero *Enterococcus spp.*, bem como das diferentes espécies, pode ser feito em diversos níveis de complexidade.

Com relação ao diagnóstico de doenças enterocociais, assinale a alternativa correta:

- a) O diagnóstico é feito através do esfregaço sanguíneo.
- b) Os enterococos podem ser cultivados em meios de cultura comuns, incluindo meios seletivos para bactérias Gram- -negativas.
- c) São facilmente identificados pelas suas características fisiológicas, especialmente por serem positivos para os testes de hidrólise da esculina na presença de bile, hidrólise da pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e da leucina- β -naftilamida (princípio de leucina aminopeptidase – teste LAP), e também por crescerem em meios com baixas concentrações de cloreto de sódio.
- d) Os testes utilizados para a sua identificação são importantes para diferenciar os enterococos de outros gêneros cocos Gram-positivos, catalase-positiva.
- e) Para a identificação das espécies mais frequentes (*E. faecalis* e *E. faecium*), estão sendo avaliados métodos genéticos e a identificação tardia de genes de resistência.

Referências

ÁGAR **bile-esculina**. Disponível em: <http://www.mbiolog.com.br/?page_id=1422>. Acesso em: 30 out. 2017.

BD BBL **DrySlide PYR Kit**. Disponível em: <<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=19870>>. Acesso em: 30 out. 2017.

BURTON, Gwendolyn R.w.; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia: microbiologia para as Ciências da Saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Cocos de interesse em patologia humana. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/naiellyrodrigues/cocos-de-interesse-em-patologia-humana>>. Acesso em 10 out. 2017.

Colégio particular reforça segurança para evitar contaminação por bactéria. Disponível em: <http://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/cidades/2011/10/13/interna_cidadesdf,273703/colégio-particular-reforca-seguranca-para-evitar-contaminacao-por-bacteria.shtml>. Acesso em 19 out. 2017.

Enfermagem – Infecções por cocos. Disponível em: <<http://enfermeiropsf.blogspot.com.br/2009/12/infeccoes-por-cocos.html>>. Acesso em 19 out. 2017.

Estafilococos. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAApusAA/estafilococos?part=2>>. Acesso em 10 out. 2017.

ESTREPTOCOCOS B – **Exame do Cotonete na Gravidez**. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/2013/08/estreptococos-b.html>>. Acesso em: 19 out. 2017.

EXAME ASLO (Antiestreptolisina O ou ASO). Disponível em: <<http://medsimples.com/exame-aso-antiestreptolisina-o-aslo/>>. Acesso em 19 out. 2017.

EXAMES de Imunologia – Antidesoxiribonuclease B – DNASE. Disponível em: <<http://www.medicamentosesaude.com/exames-de-imunologia-antidesoxiribonuclease-b-dnase/>>. Acesso em: 19 out. 2017.

HIRATA, Mario Hiroyuki; HIRATA, Rosario Dominguez Crespo. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

LEUCINA **aminopeptidase (LAP) de teste para a detecção da catalase positiva cocos Gram-negativos**. Disponível em: <<http://pt.allanswers>>.

site/quimica/leucina-aminopeptidase-lap-de-teste-para-a-deteccao-da-catalase-positiva-cocos-g.php>. Acesso em: 30 out. 2017.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia médica e imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

Medicamento e saúde - Exames de Imunologia – Antidesoxiribonuclease B – DNASE. Disponível em: <<http://www.medicamentosesaude.com/exames-de-imunologia-antidesoxiribonuclease-b-dnase/>>. Acesso em 19 out. 2017.

MINHA vida – Tratamento de síndrome do choque tóxico. Disponível em: <<http://www.minhavidacom.br/saude/temas/sindrome-do-choque-toxico>>. Acesso em 10 out. 2017.

MÓDULO 4 gram positivos - Streptococcus spp. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_stre7.htm>. Acesso em 19 out. 2017.

NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha; MIGUEL, Lucieny de Faria Souza. Capítulo 3, **Bacteriologia. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Disponível em: <<http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/cap3.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

Pneumonia. Disponível em: <<https://drauziovarella.com.br/entrevistas-2/pneumonia-2>>. Acesso em 19 out. 2017>.

PNEUMONIA traz mais risco para idosos. Disponível em: <<http://www.pfizer.com.br/noticias/Pneumonia-traz-mais-risco-para-idosos>>. Acesso em: 10 out. 2017.

STAPHYLOCOCCUS aureus.. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAhPBEAI/medresumos-2016?part=8>>. Acesso em 10 out. 2017.

SÍNDROME da pele escaldada por estafilococos. Disponível em: <<http://www.msmanuals.com/pt/casa/dist%C3%BArbios-da-pele/infec%C3%A7%C3%B5es-bacterianas-da-pele/s%C3%ADndrome-da-pele-escaldada-por-estafilococos>>. Acesso em 10 out. 2017

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia: microbiologia médica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

Cocos patogênicos gram-negativos de interesse clínico

Convite ao estudo

Caro aluno, dando andamento em nossos estudos de Bacteriologia Clínica, nesta unidade você terá a oportunidade de conhecer e saber diferenciar bacilos fermentados de não fermentados e os diagnósticos de bacilos gram-negativos.

Você irá conhecer as patologias associadas aos gêneros, as principais infecções causadas por essas bactérias, como ocorrem as manifestações clínicas e seus principais sintomas, além de conhecer ainda os meios de cultura, colorações e testes bioquímicos utilizados para a identificação desses microrganismos, etapas essenciais para um tratamento eficaz.

Ao final desta unidade, você será capaz de elaborar uma tabela com as diferenças entre bacilos fermentados e bacilos não fermentados, o que irá facilitar ainda mais sua compreensão.

Para tanto, buscando auxiliar no desenvolvimento das competências e objetivos desta unidade, apresentamos o seguinte contexto: Cintia é uma moça de 21 anos, casada e que recentemente deu à luz a sua primeira filha, Mariana.

Cintia, mãe de “primeira viagem”, ainda está se acostumando à vida de mulher e mãe. Mariana tem sete meses, nasceu com 3.2 kg e é muito saudável. Passado o período de licença maternidade, Cintia precisou retornar ao trabalho e, desta forma, mesmo com o coração apertado, teve que deixar Mariana na creche.

Mariana se adaptou bem e, com o passar dos dias, Cintia foi

se acalmando ao ver que a filha estava bem cuidada.

Após um mês de início da creche, Mariana começou a apresentar febre e falta de apetite.

Cintia tentou o uso de analgésicos e, como a febre persistia levou Mariana ao pediatra para uma consulta.

Assim como os outros, este será mais um dos casos que você irá vivenciar em sua vida profissional e seus conhecimentos serão primordiais para auxiliar as equipes médicas e multidisciplinares no correto diagnóstico e tratamento dos pacientes.

Bons estudos!

Seção 3.1

Gram-negativos fermentadores

Diálogo aberto

Prezado aluno, dando início aos estudos sobre bacilos gram-negativos fermentadores, vamos retomar o caso de Mariana, aquele bebê de sete meses, que começou a frequentar a creche para que sua mãe pudesse retornar ao trabalho e, após um mês de convívio escolar, começou a apresentar febre e falta de apetite, o que fez com que sua mãe a levasse ao pediatra.

Cintia relatou ao médico os sintomas de Mariana. O médico examinou o bebê e fez algumas perguntas sobre alimentação, fezes, urina...

Após ouvir Cintia, o médico solicitou exame de sangue e urina, receitou um anti-inflamatório e pediu que ela retornasse assim que os exames ficassem prontos. O médico solicitou ainda que a mãe tentasse identificar os momentos em que a criança apresentava choro e irritabilidade (na hora de comer, urinar ou defecar).

Cintia saiu do consultório confusa, sem entender o que sua filha tinha e por que o médico solicitou os exames, mas não concluiu o diagnóstico.

Ajude Cintia entender por que o médico pediu os exames e não fechou o diagnóstico do bebê.

Era possível que o médico fechasse o diagnóstico sem os exames solicitados?

Caso negativo, de que forma os exames poderiam auxiliar?

Não pode faltar

Os bacilos gram-negativos fermentadores de glicose são constituídos por 42 gêneros e mais de 100 espécies. Algumas dessas espécies são patogênicas, causando infecções tanto no homem quanto nos animais, outras são patógenos oportunistas.



Assimile

A fermentação é um processo de liberação de energia que ocorre sem a presença de oxigênio. A fermentação compreende um conjunto

de reações enzimaticamente controladas, por meio das quais uma molécula orgânica é degradada em compostos mais simples, liberando energia. A glicose é uma das substâncias mais empregadas pelos microrganismos como ponto de partida na fermentação.

As enterobactérias podem ser diferenciadas com base em suas características bioquímicas:

- São bacilos gram-negativos.
- Fermentam a glicose com ou sem produção de gás.
- São aeróbios e anaeróbios facultativos.
- A maioria reduz nitrato a nitrito.
- A maioria é oxidase negativa e catalase positiva.
- Podem ser móveis por flagelos peritríquios ou imóveis.
- Crescem bem em meios comuns de cultura, como ágar MacConkey.

São encontradas no trato gastrointestinal de animais e seres humanos.

As principais enterobactérias de importância clínica são: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp.

O *Vibrio cholerae* é a espécie mais estudada da família *Vibrionaceae* e o causador da cólera humana. É um anaeróbio facultativo, gram-negativo com aspecto de bastonete curvado, móvel com flagelo polar único.

Aeromonas são bastonetes gram-negativos, anaeróbios facultativos. São encontradas em água doce, solo, verduras, leite e derivados de alimentos à base de peixe. A patologia se dá através do consumo de água e alimentos contaminados e está relacionada como causa de diarreia do viajante.

Pleisiomonas: possui uma única espécie, *Pleisiomonas shigelloides*. É semelhante à aeromonas e é comum nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Austrália, principalmente no verão, podendo ser mais propensos à infecção no México e Caribe.

Patologias e sintomatologia associadas aos bacilos fermentadores

As enterobacteriaceae podem causar infecções intestinais e

extraintestinais. As infecções extraintestinais podem ser localizadas ou sistêmicas. As infecções localizadas mais frequentes são as das vias urinárias, dos pulmões, do sistema nervoso central, da pele e de feridas. As infecções, tanto intestinais como extraintestinais, podem permanecer localizadas ou se transformarem em infecções sistêmicas, como as bacteremias. Esta transformação se dá em consequência da translocação das enterobactérias presentes no intestino para a corrente sanguínea. Vários fatores podem favorecer essa translocação.

Todos os representantes das enterobactérias, por serem organismos gram-negativos, contêm endotoxina na parede celular. Além disso, várias exotoxinas são produzidas causando diarreia.

Edwardsiella: *E. tarda* é a espécie mais importante. Encontrada em animais aquáticos, répteis, cobras e focas. É conhecida como o agente de gastroenterites e infecções de feridas.

Providencia: a espécie *P. alcalifaciens* é encontrada de forma mais frequente em crianças com diarreia. As demais espécies foram isoladas em pacientes com infecções urinárias.

Hafnia: *Hafnia alvei* é a única espécie do gênero e está associada à diarreia de turistas e crianças.

Klebsiella: causam infecções nosocomial, especialmente pneumonia e infecções do trato urinário. A *K. pneumoniae* é a de maior importância clínica. Causa pneumonias, bacteremias e infecções em outros órgãos. É uma bactéria com importância crescente nas infecções hospitalares e, como patógeno oportunista, causa infecções em pacientes imunocomprometidos.

Citrobacter: não são consideradas enteropatógenos, pois são encontradas como constituintes da microbiota intestinal. São bactérias de pouca importância clínica dentre as quais se destacam: *Citrobacter freundii*: ligada a infecções urinárias, bacteremias e infecções respiratórias.

Citrobacter diversus (*C. koseri*): suspeita de estar envolvida em meningites de recém-nascidos.

Enterobacter: duas espécies de importância clínica por causar infecções em vários órgãos: *E. cloacae* e *E. aerogenes*. São capazes ainda de contaminar equipamentos médicos e soluções para uso parenteral. Estão envolvidas em surtos de infecção hospitalar,

infecções urinárias e infecções respiratórias.

Proteus: *Proteus mirabilis* é a espécie mais importante e está relacionada com infecções urinárias adquiridas na comunidade e em hospitais.

Morganella: são conhecidas duas espécies de *Morganella morganii*, ambas estão relacionadas com infecções urinárias.

Serratia: a *Serratia marscescens*, assim como *Enterobacter*, costuma contaminar equipamentos médicos e soluções com baixo poder desinfetante. Pode causar infecção urinária, bacteremias e infecções respiratórias.

Escherichia coli: é um constituinte da microbiota intestinal normal do homem, sendo assim, encontrada nas fezes de todos os indivíduos normais. Possui uma vasta diversidade patogênica, dentre as quais ao menos cinco causam infecções intestinais e outras estão relacionadas com infecções urinárias, meningites e outras infecções extraintestinais.

O *Vibrio cholerae* é o responsável pela cólera humana. A cólera é transmitida pela via fecal-oral a partir de alimentos e água contaminados. A patogenicidade se dá pela ação da toxina colérica. O período de incubação pode variar de poucas horas a vários dias, dependendo da dose de microrganismos ingeridos e de pH do estômago. A cólera é caracterizada por diarreia aquosa, com aspecto de água de arroz, sem pus ou sangue, ocasionando uma perda intensa de fluídos e eletrólitos. Os sintomas da doença são câimbras musculares, tonturas e pressão sanguínea baixa.

Aeromonas podem causar infecções extraintestinais como septicemia e bacteremia. Em menor frequência podem causar meningite, pneumonia, peritonite, colecistite e infecções oculares. As infecções cutâneas estão ligadas a lesões de pele durante recreações em lagos e rios contaminados e em contato com a terra. Apresenta-se na forma de celulite e vem seguida de febre e leucocitose, podendo evoluir para necrose tecidual.

O quadro clínico se caracteriza por diarreia aguda (crianças) e enterocolite crônica (adultos). Os sintomas variam de diarreia aquosa a um quadro de disenteria típico apresentando fezes sanguinolentas e com muito muco.

Pleisimonas shigelloides: encontrada na água, solo, peixes,

mamíferos e aves. A transmissão se dá através do contato com animais colonizados pela bactéria. Causa gastroenterite. Os sintomas são dor abdominal, desidratação, febre, cefaleia, vômitos e diarreia, a qual normalmente é secretória e que pode se manifestar como disenteria.



Exemplificando

Veja na tabela que segue os principais sintomas associadas aos bacilos fermentadores:

Agente etiológico	Dados clínicos mais comuns
<i>E. coli</i> enterotoxinogênica (ETEC)	Diarreia, náuseas, cólicas abdominais.
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Diarreia, febre, cólicas abdominais.
<i>E. coli</i> êntero-hemorrágica (EHEC)	Púrpura trombocitopênica e insuficiência renal aguda; diarreia sanguinolenta, fortes cólicas abdominais.
<i>E. coli</i> enteroinvasora	Diarreia que pode ser sanguinolenta, febre e cólicas abdominais.
<i>Salmonella Typhi</i>	Febre, anorexia, indisposição, cefaleia, mialgia, diarreia e constipação.
Outras salmoneloses	Diarreia com febre e cólicas abdominais.
<i>Shigella spp.</i>	Diarreia, cólicas e febre.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarreia e dor abdominal severa.
<i>Vibrio cholerae</i>	Diarreia aquosa geralmente acompanhada de vômito.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Diarreia.
<i>Campylobacter</i>	Diarreia geralmente sanguinolenta, dor abdominal e febre.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diarreia, febre e cólicas abdominais.
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarreia, cólicas abdominais.
<i>Klebsiella</i>	Febre acima de 39 °C, aumento da frequência cardíaca, dificuldade para respirar.

Meios de cultura utilizados na semeadura e isolamento de bacilos gram-negativos

Amostras suspeitas de conter enterobactérias e organismos relacionados são, na maioria das vezes, inoculadas em dois meios de cultura, uma placa de ágar sangue e em um meio seletivo diferencial (ágar MacConkey (MC) ou ágar eosina azul de metileno (EMB)). A capacidade diferencial desses meios (MC e EMB) é baseada na fermentação de lactose. A fermentação de lactose é o critério mais importante utilizado na identificação dessas bactérias. Nestes meios, os organismos não fermentadores de lactose (*Salmonella* e *Shigella*), formando colônias incolores, enquanto os fermentadores de lactose formam colônias coradas (róseas).

As colônias de *E. coli*, em ágar EMB, possuem um brilho esverdeado característico.

Figura 3.1 | Ágar MacConkey – Colônias fermentadoras e não fermentadoras de lactose



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e7/MacConkey_agar_with_LF_and_LF_colonies.jpg>. Acesso em: 8 nov. 2017.

Colorações aplicadas no diagnóstico de bacilos Gram-negativos

O exame macroscópico e microscópico da cultura constitui a primeira etapa da identificação das enterobactérias. O exame microscópico se faz através da **coloração de Gram**.

As técnicas de coloração iniciadas por Paul Erlich e Robert Koch

permitiram distinguir as células bacterianas quanto a sua morfologia, tamanho e arranjo celular e diferenciá-las de acordo com suas características tintoriais.

Como vimos anteriormente, em 1884, o bacteriologista dinamarquês Christian Gram, desenvolveu um método que permite a distinção entre diferentes bactérias que podem apresentar morfologia similar, porém com propriedades tintoriais diferentes.

A coloração de gram, uma coloração diferencial, classifica as bactérias em dois grandes grupos: gram-positivos e gram-negativos.

1. A coloração de gram diferencia os cocos dos bacilos e ainda os classifica em positivos e negativos com base na diferença de permeabilidade da parede celular.

A parede celular das bactérias gram-negativas tem um elevado teor lipídico e uma fina camada de peptidoglicanos ao redor da membrana plasmática. Durante o processo de coloração, parte dos lipídeos são dissolvidos pelo álcool, formando-se poros na parede por onde o corante primário (violeta de genciana) sai das células. As células ficam transparentes com a saída do corante, sendo posteriormente coradas com o corante secundário (safranina ou fucsina).

O método de coloração gram é útil para a clínica médica, pois as bactérias gram-positivas tendem a ser mais susceptíveis a antibióticos como penicilinas e cefalosporinas. Já as bactérias gram-negativas tendem a ser mais resistentes a antibióticos, pois não conseguem atravessar a parede celular devido a sua camada de lipopolissacarídeos.

Figura 3.2 | Yersínia – bacilo gram-negativo



Fonte: <<https://pixnio.com/es/ciencia/imagenes-microscopia/plaga-yersenia-pestis/yersinia-pestis-gramo-negativos-bacilos>>. Acesso em: 8 nov. 2017.

Técnicas identificadoras de bacilos gram-negativos fermentadores

As bactérias podem ser identificadas pelas características de seu metabolismo, como sua capacidade em degradar certos substratos e produzir gases.

As provas bioquímicas utilizam meios de cultura e reagentes específicos, a fim de detectar metabólitos resultantes das atividades bacterianas e assim auxiliar no processo de identificação.



Refleta

Você sabe qual a importância da caracterização das espécies de bactérias?

Sem essa caracterização não seria possível chegarmos ao correto tratamento, além disso, a caracterização é muito importante para evitar falsos surtos* de bactérias e também para que não ocorra a falta de identificação dos mesmos.

*Surto: acontece quando há o aumento repentino do número de casos de uma doença em uma região específica. Para ser considerado surto, o aumento de casos deve ser maior do que o esperado pelas autoridades.

Oxidase: auxilia no processo de identificação dos bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose. O princípio do teste é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria. A capacidade de as bactérias produzirem essa enzima pode ser determinada pela adição do reagente das oxidases (dihidrocloreto de tetrametil p-fenilenodiamina). Após a adição do reagente, o desenvolvimento da coloração rosa, depois castanha e finalmente negra na superfície das colônias, é indicativo da produção de citocromo oxidase e representa uma prova positiva. Se não houver mudança de cor ou se as colônias apresentarem uma ligeira coloração rosa é indicativo da ausência de atividade da oxidase e é uma prova negativa.

OF glicose (Oxidação/Fermentação da glicose): o teste de oxidase é baseado na identificação da produção intracelular da enzima oxidase por determinada bactéria. Um teste positivo para oxidase indica a presença de citocromo oxidase C na célula

bacteriana. É utilizado como método importante na triagem para identificação de bactérias, ajuda na distinção entre microrganismos não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias.

O ágar tríplice açúcar é utilizado para identificar a capacidade de um microrganismo em utilizar carboidratos específicos existentes no meio.

Fermentação da lactose e da sacarose: na fermentação de sacarose e lactose, o meio possui uma concentração maior desses açúcares, permitindo que as bactérias que utilizam lactose, com ou sem sacarose, produzam quantidades elevadas de ácidos suficientes para superar a reação alcalina desenvolvida na superfície do meio. O tubo permanece com a coloração amarela e o indicador de pH do meio é o vermelho de fenol.

Produção de gás: ocorre a formação de gás devido à degradação de moléculas de ácido fórmico, sendo evidenciado pelo aparecimento de bolhas ou rachaduras no meio.

Produção de H_2S : é evidenciado pelo aparecimento de um precipitado de coloração negra (sulfeto de ferro), proveniente da reação do H_2S com o sulfato férrico amoniacal contido no meio.

Meio MILI (Motilidade, Indol, Lisina). Pesquisa do Movimento Bacteriano (prova de motilidade).

As bactérias flageladas crescem além do ponto de inóculo ("picada"), quando semeadas em ágar semissólido com uma agulha de platina, turvando o meio parcial ou o meio. As bactérias que não possuem flagelos crescem apenas no ponto de inóculo, deixando o meio translúcido.

Indol: degradação do triptofano com formação do indol. A presença deste é demonstrada pela adição ao meio de cultura de um reativo contendo p-dimetil-aminobenzaldeído (reativo de Kovacs), produzindo uma coloração rosa-avermelhada.

A prova de bile-esculina baseia-se na hidrólise de esculina em presença de bile por determinadas bactérias. As bactérias bile-esculina positivas crescem em presença de sais biliares. A hidrólise da esculina gera glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos resultando em um complexo de cor preta.

O ágar bile-esculina é usado, principalmente, para diferenciação e identificação de enterococos e estreptococos.

O escurecimento do meio indicará positividade da prova. *Streptococos* do grupo *S. bovis* e *Enterococcus* spp. são positivos, enquanto os demais *Streptococcus* spp. terão resultados negativos (meio com cor inalterada).

Teste de fermentação arabinose:

O objetivo é ver se a bactéria pode fermentar a arabinose de carboidratos (açúcar) como fonte de carbono. Se a arabinose for fermentada para produzir produtos finais ácidos, o pH do meio irá cair. Um indicador de pH no meio muda de cor para indicar a produção de ácido. O mais utilizado é o caldo de arabinose vermelho fenol. Um teste positivo consiste em uma mudança de cor de vermelho para amarelo, indicando que a mudança de pH se altera para a acidez.

Caldo Rhamnose (caldo verde-claro): meio de cultura destinado à diferenciação de enterobactérias com base na utilização de rhamnose. Permite verificar se o bacilo gram-negativo fermenta ou não esse açúcar. O meio tem a cor original verde tornando-se amarelo em caso de prova positiva e permanecendo verde para provas negativas.



Pesquise mais

Para aprender mais sobre a identificação de bactérias de importância clínica, leia o documento da ANVISA – Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde - Módulo 6: **Deteção e identificação de bactérias de importância médica.** Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

Sem medo de errar

Agora que você já aprofundou seus estudos sobre os bacilos gram-negativos fermentadores, poderá auxiliar Cintia a entender melhor a solicitação de exames da sua filha. Era possível que o médico fechasse o diagnóstico sem os exames solicitados? Caso negativo, de que forma os exames poderiam auxiliar?

Somente com os exames o médico poderá detectar se existe uma infecção ou não e também a presença de bactérias.

O exame de urina fica pronto em um curto período de tempo e analisa a presença de bactérias, o número de leucócitos (células de defesa do organismo) e outros sinais que identifiquem uma possível infecção.

O hemograma completo é um exame de sangue para avaliar a saúde de maneira geral e identificar possíveis desordens, como anemia, infecções e leucemia. O teste identifica diversos componentes do sangue e mostra se estão em níveis normais. Neste caso, se os leucócitos se apresentarem elevados, além do valor de referência, pode indicar a presença de um organismo ou substância estranha que precisa ser combatido e eliminado do corpo para não causar complicações, provavelmente uma infecção.

Avançando na prática

Prescrição médica inadequada

Descrição da situação-problema

Quais seriam os problemas se o médico de Mariana receitasse um antibiótico sem verificar os exames solicitados?

Resolução da situação-problema

Os antibióticos são substâncias que causam a morte ou impedem o crescimento de bactérias. A prescrição do antibiótico é individualizada, depende da infecção específica que a pessoa está acometida. Sem saber se a criança estava com infecção, e em caso positivo, dependendo do tipo de infecção, um antibiótico qualquer não iria auxiliar em nada o tratamento, não iria curar Mariana, além de causar problemas futuros de resistência à bactéria. Como vimos anteriormente, os antibióticos são perigosos quando utilizados de maneira incorreta, pois **podem tornar as bactérias mais resistentes no organismo**.

Um dos principais riscos ao tomar **antibiótico sem necessidade** é a **transformação de bactérias existentes em “superbactérias”** ou bactérias resistentes.

Faça valer a pena

1. Os bacilos gram-negativos fermentadores de glicose são constituídos por 42 gêneros e mais de 100 espécies. Algumas dessas espécies são patogênicas, causando infecções tanto no homem quanto nos animais, outras são patógenos oportunistas.

Com relação ao gênero das enterobactérias, assinale a alternativa correta:

- a) As enterobactérias podem ser diferenciadas com base em suas características físico-químicas.
- b) Crescem bem em meios de cultura seletivo e diferencial.
- c) Não são fermentadoras de glicose com produção de gás.
- d) A grande maioria não reduz nitrato a nitrito.
- e) São encontradas no trato gastrointestinal de animais e seres humanos.

2. As enterobacteriaceas podem causar infecções intestinais e extraintestinais. As infecções extraintestinais podem ser localizadas ou sistêmicas. As infecções localizadas mais frequentes são as das vias urinárias, dos pulmões, do sistema nervoso central, da pele e de feridas.

Sobre as patologias e sintomatologia associadas aos bacilos fermentadores assinale a alternativa correta:

- a) As infecções, tanto intestinais como extraintestinais não se transformam em infecções sistêmicas.
- b) Todos os representantes das enterobactérias, por serem organismos gram-positivos, contêm endotoxina no núcleo celular. Além disso, várias exotoxinas são produzidas causando diarreia.
- c) A *Escherichia coli* não é um constituinte da microbiota intestinal normal do homem, sendo assim, encontrada nas fezes de todos os indivíduos normais.
- d) A *Edwardsiella* é encontrada apenas em animais terrestres.
- e) *Klebsiella* causam infecções nosocomiais, especialmente pneumonia e infecções do trato urinário.

3. Amostras suspeitas de conter enterobactérias e organismos relacionados são na maioria das vezes, inoculadas em dois meios de cultura, uma placa de ágar sangue e em um meio seletivo diferencial (ágar MacConkey (MC) ou ágar eosina azul de metileno (EMB)).

Meios de cultura utilizados na semeadura e isolamento de bacilos gram-negativos

- a) A capacidade diferencial destes meios (MC e EMB) é baseada na fermentação de glicose.
- b) A fermentação de lactose não é o critério mais importante utilizado na identificação dessas bactérias.
- c) Nestes meios, os organismos não fermentadores de lactose (*Salmonella* e *Shigella*), formando colônias coradas (róseas).
- d) As colônias de *E. coli*, em ágar BEM, possuem um brilho esverdeado característico.
- e) Nestes meios os organismos fermentadores de lactose formam colônias incolores.

Seção 3.2

Gram-negativos não fermentadores

Diálogo aberto

Prezado aluno, dando início aos estudos sobre bacilos gram-negativos não fermentadores, vamos retomar o caso de Cintia, aquela mãe que levou sua filha ao pediatra após um quadro de febre e então, o médico solicitou ao bebê alguns exames.

No dia seguinte, Cintia volta ao consultório do médico com os exames de Mariana. Tanto o exame de sangue quanto o exame de urina apresentaram um número elevado de leucócitos. Desta forma, o médico explicou a Cintia que provavelmente se tratava de uma infecção urinária e receitou um antibiótico de amplo espectro para Mariana tomar por 10 dias.

Cintia saiu aliviada do consultório por saber que se tratava de uma simples infecção urinária, mas, ao mesmo tempo ficou pensando em como a criança poderia ter adquirido tal doença.

Ajude Cintia a entender quais as causas que levam uma criança a adquirir infecção urinária e qual o possível agente patogênico.

Não pode faltar

Patologias e sintomatologias associadas aos bacilos não fermentadores

Os bacilos gram-negativos não fermentadores são bactérias aeróbias com metabolismo estritamente respiratório, não esporulado, reto ou levemente curvo.

Tem grande importância nas infecções relacionadas à assistência à saúde (em ambiente hospitalar) sendo então, considerados patógenos em potencial, devido a sua capacidade de se multiplicar, a higiene precária, dentre outros.

São capazes de sobreviver em diversas condições ambientais, devido a sua riqueza enzimática, como a água, por exemplo. São amplamente distribuídos na natureza e estão no ambiente do hospedeiro: reservatório de água, alimentos, flores cortadas,

pias, sanitários, equipamentos respiratórios e de diálise e até em desinfetantes.

Dentre os principais gêneros podemos citar: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Complexo Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium*.

O representante mais importante é a *Pseudomonas aeruginosa* (mais de 70% das infecções se dão por bactérias aeróbias estritas).

Pseudomonas

São bastonetes gram-negativos muito semelhantes às enterobactérias, sua diferenciação desse gênero se dá por serem aeróbios estritos, ou seja, sua energia é derivada exclusivamente pela oxidação dos açúcares, em vez de fermentação. É um dos microrganismos mais encontrados, uma vez que se adapta a diversos meios, sendo encontrado no solo, água, vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares.

Pseudomonas aeruginosa e *Burkholderia cepacia* possuem uma elevada capacidade de resistir a desinfetantes, o que é em grande parte, consequência da incidência em infecções hospitalares. É encontrada ainda em soluções saponáceas contendo hexaclorofeno, em antissépticos e detergentes. Raramente causa infecções em indivíduos saudáveis, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos.

É encontrada nas regiões úmidas da pele podendo colonizar o trato respiratório superior de pacientes hospitalizados. Como é capaz de crescer em soluções aquosas simples, possui facilidade na contaminação de equipamentos de terapia respiratória e de anestesia, líquidos intravenosos e até água destilada.

P. aeruginosa é um patógeno oportunista, causando infecções em pacientes hospitalizados como pacientes com queimaduras extensas, nas quais as defesas da pele estão destruídas, nos portadores de doença respiratória crônica, nos imunodeprimidos, naqueles com contagem de neutrófilos abaixo de 500 neutrófilos/mm³ e nos pacientes com sondas internas. Responsável por 10 a 20% das infecções hospitalares.

Pode causar infecção em qualquer parte do corpo, contudo infecção no trato urinário, pneumonia e infecção de ferimentos

(principalmente queimaduras) são as mais frequentes. A partir do local de infecção, a bactéria pode penetrar na corrente sanguínea causando septicemia (taxa de mortalidade acima de 50%). Pode ocorrer ainda otite externa severa e outras lesões em usuários de piscinas, nas quais a dosagem de cloro está inadequada. *P. aeruginosa* é a causa mais comum de osteocondrite dos pés em indivíduos com ferimentos de perfurações por meio da sola do tênis. As infecções da córnea também são frequentes em usuários de lentes de contato.

Os sintomas causados pela *P. aeruginosa* dependem do local da infecção. Em casos de infecção de ouvidos, dor de ouvido, em casos de pneumonia, a tosse, em casos de ferida pode haver a formação de pus em torno da área, e infecções em outras partes do corpo podem causar febre e sensação de cansaço.

Acinetobacter baumannii

Apresentam-se em formato de diplococos semelhantes a *Neisseria*. Anteriormente pertenciam à família da *Neisseriaceae*, contudo recentemente foi transferida para a família *Moraxellaceae*. Sua denominação anterior era *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. Alguns laboratórios separaram as linhagens de *Acinetobacter saccharolíticas* em dois grupos: um grupo chamado *Acinetobacter calcoaceticus* *A. baumannii* e em outro grupo denominado de *Acinetobacter não sacarolítico*. *A. baumannii* se diferencia de *A. calcoaceticus* pelo crescimento a 44 °C. Vive na água e no solo e pode ser encontrada na microbiota normal da pele, conjuntiva, nariz, faringe e trato gastrointestinal, assim como em animais silvestres e domésticos. Por ser normalmente comensal, frequentemente ocasiona infecção hospitalar sendo o segundo organismo não fermentador encontrado em laboratório clínico, depois da *Pseudomonas aeruginosa*.

As principais patologias causadas pelo microrganismo são pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, meningite, peritonite em pacientes com diálise peritoneal, infecções de pele e ferida, celulite e ainda casos esporádicos de conjuntivite, otite média, osteomielite e sinovite. Nos pacientes com queimaduras

ou imunodeficientes, atua como patógeno oportunista produzindo seps.

Burkholderia

Anteriormente chamados de *Pseudomonas* que apresentam resistência às polimixinas. São duas as espécies mais encontradas como patógenos humanos: *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia cepacea*.

A *Burkholderia pseudomallei* causa uma doença endêmica chamada melioidose, semelhante ao mormo de animais e humanos, ocorrendo principalmente na Ásia e Austrália.



Reflita

Você já parou para pensar que o homem pode adquirir uma doença que ocorre predominantemente em animais? Sabia que a simples exposição ambiental, seja de forma ocupacional ou recreativa são formas de adquirir a doença? Saiba mais sobre Melioidose lendo os artigos:

A Melioidose. Disponível em: <<https://www.melioidose.com.br/melioidose>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

Melioidose. Disponível em: <<http://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilos-gram-negativos/melioidose>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

É isolada no solo de água e de plantas. A infecção nos seres humanos se dá por meio de contaminação de feridas de pele, ingestão ou inalação.

A infecção epizootica por *B. pseudomallei* ocorre em animais como carneiros, suínos e cavalos.

A melioidose se manifesta como uma infecção aguda, subaguda ou crônica. A forma mais comum da doença é a infecção pulmonar, e muitos pacientes podem apresentar infecções supurativas crônicas. É sensível a teraciclina, sulfametaxazol-trimeto-prima, cloranfenicol e amoxicilina.

A espécie *B. cepacia* é um patógeno do bulbo da cebola que

produz no homem a decomposição dos pés. É encontrada em inúmeras fontes de água e superfícies úmidas, incluindo soluções detergentes como a clorohexidina e também em fluidos intravenosos e anestésicos. Por se apresentar como um patógeno oportunista e nosocomial de baixa virulência, causa infecção no trato respiratório e trato urinário, septicemia, endocardite, peritonite, conjuntivite e artrite séptica. É resistente aos antibióticos aminoglicosídicos e sensível à sulfametaxazol-trimetoprima.

A espécie *B. mallei* provoca o mormo, uma doença de cavalo que compromete os pulmões, causa lesões ulcerativas e subcutâneas e também doenças sistêmicas. Pode ser transmitida aos humanos se iniciando normalmente na forma de úlcera de pele e mucosas, seguida de linfangite e sepse. É sensível a ceftazidima, imipeném e ciprofloxacina. Não é capaz de crescer em temperatura de 42 °C e é a única espécie imóvel do gênero.

Chryseobacterium

A espécie *Chryseobacterium meningosepticum* causa bacteremia sendo a espécie mais envolvida com infecções nosocomiais. Está relacionada com a meningite neonatal (mortalidade 55%), causando raramente pneumonia em adultos e septicemia. Resistente a aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol e sensível a eritromicina, rifampicina e sulfametoxazol-trimetoprima. Não são capazes de crescer em ágar MacConkey.

Stenotrophomonas maltophilia

Anteriormente chamada de *Pseudomonas maltophilia* e *Xantomonas maltophilia*. Tem surgido como um importante patógeno oportunista adquirido em hospital, sendo o terceiro bacilo não fermentador mais frequentemente encontrado nos laboratórios clínicos. Causam inúmeras doenças como pneumonia, bacteremia, endocardite, colangite, infecção do trato urinário, meningite e infecções de feridas, principalmente em pacientes com câncer. Têm sido isoladas em secreções das vias aéreas, lesões cutâneas e sangue. Produz duas enzimas β -lactamase, sendo resistentes aos aminoglicosídeos e à maioria dos antibióticos usados contra pseudomonas. É sensível à sulfametoxazol-trimetoprima. O uso de fármacos aos quais a bactéria é resistente favorece o aumento da frequência dessa infecção.

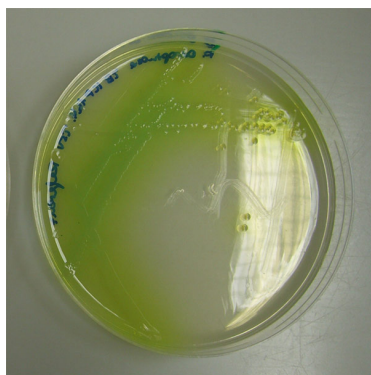
Semeadura e isolamento de bacilos gram-negativos em meios de cultura ricos, seletivos e diferencial indicador

Os meios de cultura utilizados para o primeiro isolamento são: Ágar sangue, Ágar MacConkey e meios seletivos para amostras provenientes de pacientes com fibrose cística, tais como ágar *B. cepacia* e meios seletivos para *Stenotrophomonas maltophilia*.

As características das colônias após incubação devem ser observadas macroscopicamente quanto ao tamanho, forma, consistência, cor, produção de pigmento, presença ou ausência de reações hemolíticas em ágar sangue e presença ou ausência de crescimento em ágar MacConkey.

O diagnóstico microbiológico de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* é feito por meio do isolamento, da identificação e do estudo da sensibilidade aos antibióticos. Ao contrário de outras bactérias, o isolamento e a identificação são favorecidos pela versatilidade do microrganismo na utilização de nutrientes, o que possibilita um crescimento rápido em praticamente todos os meios líquidos e sólidos usados na rotina, inclusive em meios seletivos como o ágar MacConkey (lactose negativa). A identificação é simples quando a bactéria tem comportamento típico, ou seja, quando produz piocianina e/ou pioverdina que conferem cor verde azulada ao meio de cultura e odor característico. Quando não há produção de pigmento é necessária a realização de testes bioquímicos. Colônias grandes (mucoídes ou secas), achatadas, com bordas irregulares, odor de “uva”.

Figura 3.3 | *P. aeruginosa* com pigmento Piocianina amarelo-verde em ágar cetrimida



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3a/P-aeruginosa_pigment.jpg>. Acesso em: 19 set. 2017.



Pesquise mais

Conheça mais sobre a utilização do ágar cetrímida nos links a seguir:

PLASTLABOR. **Ágar cetrímide**. Disponível em: <<http://www.plastlabor.com.br/produtos-diagnostico/meios-de-cultura-em-placas/%C3%81gar-cetrimide-49mm/4-1856>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

BIOKAR DIAGNOSTICS. **Ágar cetrímida**. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0ahUKEwixulCc18vXAhVDGpAKHU9fDLMQFggwMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.solabia.com.br%2FDownload%2FProduto%2FArquivo%2Fa1d0c6e83f027327d8461063f4ac58a6&usq=AOvVaw3Yk-3Sq2W5ToudOg-b70cQ>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

Acinetobacter baumannii cresce em ágar MacConkey apresentando coloração levemente rosada. Cocobacilo gram-negativo, aeróbio estrito, imóvel, colônias convexas, bordas regulares. Cresce bem em MacConkey (lactose positiva).

Chryseobacterium não são capazes de crescer em ágar MacConkey.



Assimile

O Ágar MacConkey é um meio de cultura seletivo-indicador, utilizado para isolamento de bacilos gram-negativos.

Os sais biliares e o cristal violeta inibem o crescimento da microbiota gram-positiva porventura existente no material (seletividade para gram-negativo). A lactose junto com o indicador de pH (vermelho neutro) serve para comprovar a degradação (fermentação) desse carboidrato (o que é feito por apenas parte dos membros desta família). Quando ocorre a fermentação, a bactéria é classificada como Lactose +.

Interpretação do resultado: colônias lactose-positiva (Lac. +): degradação (fermentação) da lactose com acidificação do meio que produzirá colônias de cor rosa com halo central mais claro. Colônias lactose-negativa (Lac. -): não utilização da lactose, formação de colônias incolores e transparentes. As colônias assumem a coloração do meio, que se apresentará um pouco alterado, devido à utilização dos outros componentes (só não utilizará a lactose).

Técnicas identificadoras de bacilos gram-negativos não fermentadores

Pseudomonas aeruginosa

Quando não há produção de exopigmentos é necessária a realização de testes bioquímicos isolados ou agrupados em kits, métodos automatizados ou técnicas moleculares com hibridação ou ribotipagem, entre outros. Bioquimicamente a bactéria se diferencia de outros microrganismos do gênero e dos não fermentadores em geral, por ser oxidase positiva, ser móvel, crescer a 42 °C e descarboxilar arginina. Para o controle de vigilância epidemiológica e principalmente, o controle de infecção nosocomial, a espécie pode ser caracterizada fenotipicamente pela análise de perfil de resistência antibacteriana (antibiograma ou teste de sensibilidade), sorotipagem (antígenos somáticos "O"), piocinotipagem, fagotipagem e/ou por métodos genótipos mais caros e de acesso mais restrito à população.

Acinetobacter baumannii

É sacarolítica (metabolismo dependente de sacarose para produção de energia), e se caracteriza por apresentar reações bioquímicas negativas para: oxidase, motilidade, indol, lisina descarboxilase, esculina, urease e redução de nitrato.

Burkholderia

Não tem capacidade de crescimento a 42 °C e é a única espécie imóvel do gênero. A *Burkholderia cepacea* é uma das únicas bactérias não fermentadoras que são lisina descarboxilase positiva, juntamente com *Stenotrophomonas maltophilia*. É móvel e apresenta reação de oxidase fracamente positiva e possui capacidade de crescimento a 42 °C. Os testes de oxidação/fermentação da glicose, oxidação/fermentação da lactose e de redução de nitrato são positivos.

Chryseobacterium

Apresenta reação positiva para os testes de oxidase, indol, catalase, DNase, gelatinase, ONPG e hidrólise da esculina (bile-esculina). São imóveis e possuem reações de oxidação tardias em meio OF glicose e OF manitol, não apresentando urease.

Stenotrophomonas maltophilia

A bactéria se distingue de outras pseudomonas de forma fácil por ser lisina descarboxilase, DNase positivas e oxidase negativa. São móveis e se caracterizam pela reação de oxidação da glicose fraca e uma reação fortemente positiva de OF maltose e de OF lactose.



Entenda melhor sobre alguns testes bioquímicos que citamos neste contexto:

Métodos fenotípicos (sorotipagem, piocinotipagem, fagotipagem) e métodos genotípicos: os métodos usados na discriminação de gêneros, espécies e estirpes de microrganismos podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenômenos bioquímicos, fisiológicos e biológicos, enquanto os métodos genotípicos detectam polimorfismos em ácidos nucleicos, ou variação alélica em enzimas.

Redução de nitrato: o teste identifica a presença de nitrato através da presença de nitrito e alteração de cor do meio. A bactéria é adicionada a um meio com nitrato e incubada por 24 horas. Após esse período adiciona-se corante e, havendo a presença de nitrito, o meio se torna vermelho (redução de nitrato a nitrito).

Catalase: a catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. O teste detecta a presença ou ausência da enzima.

DNAse: o Ágar DNAse é utilizado para a determinação da atividade enzimática desoxirribonuclease dos microrganismos, cepas de alguns microrganismos produzem DNAse e endonuclease termoestável. Essas enzimas hidrolisam o ácido desoxirribonucleico (DNA) contido no meio de cultura após um período de incubação. Posteriormente esse meio é acidificado com HCl 1N para a revelação da prova. Não havendo crescimento bacteriano, constata-se amostra isenta de bactérias.

Prova de gelatinase: determina a habilidade do microrganismo de produzir enzimas proteolíticas (gelatinases) que liquefaz/hidrolisa gelatina. É utilizada para identificar e classificar bactérias fermentadoras, não fermentadoras e bacilos gram-positivos esporulados.

Teste da urease: utilizado para diferenciar organismos que têm habilidade de hidrolisar ureia com a enzima urease. O *Proteus*, que é um patógeno do trato urinário, é diferenciado de outras bactérias entéricas.

Teste da β -galactosidase (ONPG): é utilizado para identificar bactéria que fermenta lactose em glicose + galactose pela enzima β -galactosidase. ONPG reage com β -galactosidase para produzir a cor amarela.

Sorotipagem: é o processo de determinação e distinção de espécies de bactérias ou vírus baseado nos antígenos que apresentam.

Antígenos O: antígenos somáticos de proteína lipossacarídica, geralmente de bactérias gram-negativas, são importantes na classificação de bacilo entérico. As cadeias O específicas determinam a especificidade do antígeno O de um dado sorotipo. Os antígenos O são a parte imunodominante da molécula de lipossacarídeo da célula bacteriana intacta.

Sem medo de errar

Agora que você já aprendeu mais sobre bacilos gram-negativos não fermentadores, poderá auxiliar Cintia a entender melhor como Mariana pode ter adquirido tal infecção.

Quais as causas que levam uma criança a adquirir infecção urinária e qual o possível agente patogênico?

A contaminação provavelmente se deu por bactérias da pele em torno dos órgãos genitais ou do ânus.

Como a criança começou a frequentar a creche, provavelmente ao trocar as fraldas, a higienização não foi feita de forma adequada. O ideal para meninas é sempre limpar a área da frente para trás a fim de não levar bactérias do bumbum para a vagina.

A contaminação também pode ocorrer pelas **fezes**. Na época das **fraldas**, por mais que a troca aconteça constantemente, elas podem entrar no canal da uretra e causar a infecção.

Avançando na prática

Infecção urinária em mulheres

Descrição da situação-problema

O médico através do exame detectou a infecção urinária de Mariana e disse à mãe que se tratava de uma infecção comum em mulheres.

Por que as infecções urinárias acometem mais as mulheres do que os homens?

Resolução da situação-problema

Como sabemos a anatomia de homens e mulheres é diferente. A uretra da mulher é bem menor que a do homem, desta forma, a bactéria precisa percorrer um caminho muito menor até chegar à bexiga. A abertura da uretra da mulher é mais próxima do ânus do que a de um homem. Consequentemente, existe um risco maior das bactérias passarem do ânus para a uretra.

O uso de hormônios e a menopausa são fatores que aumentam o risco de infecção no trato urinário. Além disso, a proximidade do canal da uretra com a região perianal é cheia de bactérias que não causam problemas no intestino, mas que podem causar infecções se estiverem nas vias urinárias.

Faça valer a pena

1. Os bacilos gram-negativos não fermentadores são bactérias aeróbias com metabolismo estritamente respiratório, não esporulado, reto ou levemente curvo, e que não utilizam o carboidrato como fonte de energia.

Sobre os bacilos gram-negativos não fermentadores, assinale a alternativa correta:

- a) Têm grande importância nas infecções relacionadas à assistência domiciliar e são considerados patógenos em potencial, devido a sua incapacidade de se multiplicar, à higiene precária, dentre outros.
- b) Não conseguem sobreviver em diversas condições ambientais.
- c) São amplamente distribuídos na natureza e estão no ambiente do hospedeiro: reservatório de água, alimentos, flores cortadas, pias, sanitários, equipamentos respiratórios e de diálise e até em desinfetantes.
- d) Dentre os principais gêneros podemos citar: *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Acinetobacter*.
- e) O representante mais importante é a *Acinetobacter* (mais de 40% das infecções se dão por bactérias aeróbias estritas).

2. As *Pseudomonas* são bastonetes gram-negativos muito semelhantes às enterobactérias, sua diferenciação desse gênero se dá por serem aeróbios estritos, ou seja, sua energia é derivada exclusivamente pela oxidação dos açúcares, em vez de fermentação.

Sobre as pseudomonas assinale a alternativa correta:

- a) É um dos microrganismos mais encontrados, uma vez que se adapta a diversos meios, sendo encontrado no solo, água, vegetais, animais, alimentos e nos mais diversos ambientes hospitalares.
- b) *P. aeruginosa* e *P. cepacia* possuem uma baixa capacidade de resistir a desinfetantes.
- c) Causa infecções em indivíduos saudáveis e é um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos.
- d) É encontrada nas regiões secas da pele e possui facilidade na contaminação de equipamentos de terapia respiratória e de anestesia, líquidos intravenosos e até água destilada.
- e) Pode causar infecção em qualquer parte do corpo, contudo infecção no trato intestinal, pneumonia e infecção de ferimentos (principalmente queimaduras) são as mais frequentes.

3. Na semeadura e isolamento de bacilos gram-negativos em meios de cultura, os meios mais utilizados para o primeiro isolamento são: Ágar sangue, Ágar MacConkey e meios seletivos para amostras provenientes de pacientes com fibrose cística, tais como Ágar B. cepacia e meios seletivos para *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sobre a semeadura e isolamento de bacilos gram-negativos é correto afirmar:

- a) O diagnóstico microbiológico de infecções por *Pseudomonas aeruginosas* é feito através do isolamento, da identificação e do estudo da sensibilidade aos antibióticos. A identificação é simples quando a bactéria tem comportamento típico, ou seja, quando não produz piocianina e/ou pioverdina que conferem cor verde azulada ao meio de cultura e odor característico. Quando não há produção de pigmento é necessária a realização de testes bioquímicos.
- b) *Acinetobacter baumannii* é sacarolítica e se caracteriza por apresentar reações bioquímicas positivas para: oxidase, motilidade, indol, lisina descarboxilase, esculina, urease e redução de nitrato.
- c) *Burkholderia* possui capacidade de crescimento a 42 °C e é a única espécie imóvel do gênero.
- d) *Chryseobacterium* apresenta reação negativa para os testes de oxidase, indol, catalase, DNase, gelatinase, ONPG e hidrólise da esculina (bile-esculina). São móveis e possuem reações de oxidação tardias em meio OF glicose e OF manitol, não apresentando urease.
- e) *Stenotrophomonas maltophilia* se distingue de outras pseudomonas de forma difícil por ser lisina descarboxilase, DNase positivas e oxidase negativa.

Seção 3.3

Diagnósticos de bacilos gram-negativos

Diálogo aberto

Caro aluno, dando início aos nossos estudos sobre diagnóstico de bacilos gram-negativos, vamos novamente retomar o caso de Cintia, aquela mãe que levou sua filha ao médico com queixas de falta de apetite e choro constante. Após os exames, o médico diagnosticou uma infecção de urina e prescreveu antibiótico por 10 dias.

Após seis dias de tratamento, Mariana estava ótima. A criança não apresentava mais febre, voltou a comer normalmente e só chorava quando estava com fome. Cintia entendeu que sua filha já estava curada e resolveu suspender o antibiótico.

Após sete dias, Mariana voltou a apresentar febre, falta de apetite e choro intenso.

Sem entender o que estava acontecendo, Mariana retornou ao médico. A mãe se queixou com ele dizendo que o medicamento indicado para sua filha não surtiu efeito. O médico examinou novamente a criança e perguntou à mãe sobre o uso do antibiótico. Após o relato da mãe, o médico solicitou novamente um exame de urina, desta vez, acompanhado de urocultura.

Ajude o médico a explicar a Cintia por que a infecção retornou, o erro cometido pela mãe e os problemas que poderiam acarretar. Explique ainda qual a necessidade de se realizar a urocultura.

Não pode faltar

Métodos de identificação com testes convencionais

Para um correto diagnóstico e por consequência, um tratamento eficaz, é muito importante que seja realizada a identificação do microrganismo patógeno. A realização inadequada de um teste preliminar pode confundir ou prejudicar o processo de identificação. Como vimos anteriormente, o primeiro passo para a identificação dos bacilos gram-negativos é a realização de isolamento em meio sólido apropriado e esfregaço, por meio da técnica de coloração de gram.

Após o recebimento do microrganismo deve ser realizada a inoculação ou semeadura, utilizando a técnica de esgotamento por estrias. O processo de identificação se inicia com a observação a olho nu das características das colônias isoladas, devendo ser observadas as características de:

- Forma – puntiforme (até 1 mm de diâmetro); circular, com mais de 1 mm de diâmetro; irregular; filamentosa; radiada, dentre outras.
- Tamanho – (em milímetros).
- Elevação – achatada (alta, baixa), espalhada, convexa, umbilicada ou umbonada, mamelonada, papilífera, etc.
- Bordos – inteiros, ondulados, lobados, denticulados, franjados, etc.
- Superfície – lisa, rugosa.
- Estrutura – amorfa, granulosa, filamentosa.
- Caracteres ópticos – opaca, translúcida e transparente.
- Cromogenia ou Pigmentação – amarela, branca, preta, rósea, etc.

Podem ser observadas ainda outras características de acordo com o meio a ser trabalhado como hemólise (ágar sangue), fermentação de açúcares (MacConkey, SS), dentre outros.

As características das culturas também podem ser observadas em meios líquidos e sólidos inclinados (em tubos):

- Tipo de crescimento na superfície - sem crescimento, película, grumosa, membranosa, anel (circular).
- Opacidade ou turvação - nula, ligeira ou suave, regular, intensa, transitória, persistente.
- Cheiro - nenhum, pronunciado, semelhante a...
- Sedimento - compacto, grumoso, viscoso, granular, escamoso, quantidade do sedimento (abundante, escasso, nulo).
- Pigmentação.

E em meio sólido inclinado, onde as principais características são:

- Crescimento - nulo, escasso, abundante.
- Pigmentação - cor.
- Lustro ou brilho - fosco, luzidio.
- Caracteres ópticos - transparência, translúcido ou opaco.
- Fluorescência - positiva, negativa (em fonte de luz UV).
- Consistência - butirosa, viscosa, membranácea, quebradiça.
- Emulsionabilidade - nula, fácil, difícil.
- Odor - ausente, presente, semelhante a...

Após a observação dessas características devem ser realizados esfregaços para colorações especiais, observação de morfologia microscópica, presença de esporos, flagelos, cápsulas, dentre outros.

Sistemas de kits comerciais

Após a coloração de gram, na qual foi realizada a provável identificação da bactéria, as colônias devem ser isoladas e identificadas até a classificação da espécie, conforme sua importância clínica.

Para esse fim são utilizados os testes químicos, os quais tentam responder a algumas perguntas como, o tipo de substrato que a bactéria usa, qual a enzima produzida pela bactéria, qual o produto do metabolismo da bactéria, se a bactéria precisa de substâncias especiais para seu crescimento, etc.

As provas bioquímicas podem identificar a grande maioria das enterobactérias.

Existem disponíveis no mercado vários kits para a identificação de bactérias:

Rugai modificado

É um meio utilizado para identificação presuntiva de enterobactérias, vibrios e aeromonas.

O Rugai modificado consiste de um tubo contendo substratos

para visualização de nove provas bioquímicas. Em um único tubo é possível realizar a leitura das seguintes reações: motilidade, lisina descarboxilase, fermentação de glicose e sacarose, produção de gás-glicose, ácido sulfídrico, indol, urease e L-triptofano desaminase.

O procedimento é realizado de forma a replicar uma colônia com um fio bacteriológico estéril e introduzir até quase o final do tubo. Na volta da sementeira, estriar a superfície do ágar. Incubar de 35 a 37 °C 1 °C por 18 a 24 horas. Após a incubação, proceder à identificação comparando o tubo com a tabela de interpretação das reações que vem junto com o kit. Para determinadas espécies, é necessária a confirmação da identificação por meio de outros testes bioquímicos, tais como: Ornitina, Citrato, Malonato, Oxidação/Fermentação, DNase, etc.

Enterokit B ou Conjunto EPM / MILI */ CITRATO

MILI * (Motilidade, Indol e Lisina-descarboxilase)

Trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai modificado, separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL (Rugai modificado), para o meio MILI após adição do reativo de Kovacs.

Procedimento tubo MILI: fazer picada central apenas e incubar 24hs/35 °C - adicionar 3 gotas de reativo de Kovacs após a leitura da lisina para o teste de indol.

Interpretação:

- Motilidade: as imóveis crescem apenas na linha de picada.
- Descarboxilação da lisina: lisina positiva o meio torna-se roxo, na prova negativa o meio permanece amarelado nos 2/3 inferiores.
- Indol: a formação de um anel rosa na superfície do meio indica positividade para o indol.



O reagente de Kovac é um reagente bioquímico consistindo de álcool isoamílico, para-dimetilaminobenzaldeído e ácido clorídrico concentrado. É utilizado para a análise diagnóstica chamada comumente de teste de indol, para determinar a capacidade do organismo para dividir indol a partir do aminoácido triptofano. O indol produzido gera um complexo vermelho com o n-dimetilaminobenzaldeído nas condições dadas.

Enterokit C

O ENTEROKIT C consiste nos testes de descarboxilação da lisina, arginina e ornitina (base Moeller), fermentação de adonitol e arabinose e liquefação da gelatina. Sua finalidade principal é complementar o Enterokit B na identificação das espécies mais importantes de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia*. Assim, todas as vezes que o Enterokit B não identificar o microrganismo com precisão, recorre-se ao Enterokit C. A soma dos testes do Enterokit B e C permite diagnosticar com segurança as espécies mais importantes de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia* e *Serratia*. O Enterokit C também é extremamente útil na identificação de amostras atípicas pertencentes aos outros gêneros de enterobactéria.

Procedimento:

- Inocular os meios de Moeller (lisina, arginina, ornitina e controle) da maneira usual, e os meios de adonitol e arabinose por picada central, introduzindo a agulha até o fundo do tubo.
- Pingar 10 gotas de salina estéril, no tubo identificado como Gelatina, com o auxílio do conta-gotas, que acompanha o produto.
- Com o auxílio de uma alça, turvar a salina (inóculo pesado).
- Incubar a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 24 a 48 hs.

Leitura e interpretação:

Descarboxilação de lisina, arginina e ornitina: quando positiva, o meio adquire cor púrpura discreta ou intensa; se negativa, a cor do meio permanece inalterada.

Fermentação de adonitol e arabinose: quando positiva, o meio se torna rosa intenso*; se negativa, a cor do meio permanece inalterada.

Liquefação da gelatina: Gelatinase + (positiva): utilização da gelatina impregnada na fita, com alteração da cor cinza esverdeada opaca para azul transparente.

Gelatinase – (negativa): a cor da fita de gelatina permanece inalterada.

NOTA: Os meios podem apresentar cor ligeiramente rosa e por este motivo considerar reação positiva a viragem para rosa intenso. Se necessário, utilizar um tubo não inoculado (controle negativo) como comparativo no momento da leitura.

Identificação sorológica

Nas enterobactérias algumas espécies, em um mesmo gênero, são muito semelhantes (bioquimicamente homogêneas e, sorologicamente relacionadas) sendo necessário grande número de provas para diferenciá-las.

Algumas espécies de enterobactérias são divididas em tipos sorológicos, ou sorotipos, de acordo com a presença dos antígenos: somático (O), flagelar (H) e de envoltório ou cápsula (K) especificidade imunológica dos chamados antígenos O, K e H.

Desse modo, os sorotipos são divisões baseadas no relacionamento antigênico, enquanto os biotipos são amostras do mesmo sorotipo que diferem em características bioquímicas.

Em atividades de rotina de Bacteriologia Clínica, a identificação ou confirmação sorológica é feita apenas com germes comprovadamente patogênicos e de importância epidemiológica como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, e mesmo assim utilizando-se esquemas simplificados, através do seguinte procedimento técnico:

- Preparar uma suspensão bastante densa (aspecto leitoso), da bactéria a ser testada, utilizando solução salina a 0,85%. A massa bacteriana é proveniente do Ágar TSI usado na identificação bioquímica ou, de preferência, em ágar nutriente inclinado após repique para obtenção de massa de germes.

- Colocar a salina sobre o crescimento bacteriano ocorrido na superfície inclinada do meio.
 - Agitar o tubo após alguns minutos de modo a obter a suspensão bacteriana.
 - Bactérias em fase rugosa tendem a se autoaglutinar e não devem ser utilizadas na classificação sorológica.
- Sobre uma lâmina limpa misturar uma gota do antissoro conhecido e da suspensão bacteriana a ser testada, e, com movimentos circulares, tornar a mistura bastante homogênea continuando o movimento durante um ou no máximo dois minutos. O aparecimento de aglutinação, nesse intervalo de tempo, indica positividade da reação.
 - Algumas vezes, é necessário o aquecimento da suspensão bacteriana em banho-maria fervente, durante 15 minutos, com a finalidade de eliminar estruturas mais externas da célula que têm ação interferente na reação. Após o resfriamento da suspensão, repetir o teste. Caso ocorra a aglutinação, confirmar a prova.

Observações importantes:

Bactérias isoladas com o mesmo padrão de provas de materiais nobres em surtos de infecção hospitalar, ou isoladas de infecções da comunidade que possam suspeitar de um surto, ou pela gravidade da doença, ou por um padrão não esperado de resistência, devem ser remetidas ao laboratório de referência para melhor caracterização.

Sistemas automáticos de identificação

Os métodos automatizados em geral utilizam as mesmas provas bioquímicas (kits comerciais) ampliando o número de testes para poder caracterizar com maior segurança e melhor poder de discriminação de gêneros e espécies não comuns. Métodos rápidos em geral utilizam substratos cromogênicos para detectar as enzimas produzidas pelas bactérias, as quais se revelam após 4 a 6 horas de incubação.

Na rotina bacteriológica, existem várias alternativas e, com base em conjuntos ou sistemas simplificados de provas bioquímicas, é possível realizar a triagem e identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. Desse modo, das enterobactérias

isoladas de amostras clínicas, cerca de 90% podem ser perfeitamente identificadas através desses esquemas, podendo o resultado ser entregue dentro de um espaço de tempo relativamente curto, geralmente, entre 48 a 72 horas.

KIT NF – Identificação de bacilos não fermentadores de glicose

O KIT NF III destina-se à identificação dos bacilos gram-negativos não fermentadores da glicose isolados no laboratório clínico. O kit é constituído por provas realizadas em microplacas, tubos, discos e fitas e um aplicativo com um banco de dados que permite identificar os resultados das leituras em forma informatizada. A identificação ocorre através das alterações de pH, hidrólise dos substratos e produção de produtos metabólicos.

- O painel é constituído por 19 provas: Descarboxilação da Lisina, Arginina e Controle; Crescimento em NaCl 6,5% e Ágar MacConkey; liquefação da Gelatina, Hidrólise da Esculina e Ureia; utilização da Glicose, Maltose, Lactose, Manitol, Citrato e ONPG; produção de Indol e DNase; sensibilidade à Polimixina; redução de Nitratos e Desaminação da Fenilalanina.

- Provas realizadas em tubos: provas para realização do teste de motilidade e crescimento a 42 °C.

- Prova realizada em disco: teste de PYR.

- Prova realizada em fita: teste da oxidase.

- Aplicativo com banco de dados para diagnóstico informatizado com cálculo de probabilidade do isolado: todas as 23 provas devem ser feitas para a identificação de um isolado de bacilo gram-negativo não fermentador, porém a leitura de determinadas provas e sua inserção no aplicativo dependerá dos resultados de algumas provas fundamentais. Essas provas são motilidade, oxidase e produção de indol, que associadas à morfologia do isolado na coloração de gram, classificarão o microrganismo em uma das opções abaixo citadas permitindo introduzir somente os resultados necessários solicitados pelo aplicativo:

- Oxidase negativa e motilidade negativa
- Oxidase negativa e motilidade positiva
- Oxidase positiva e motilidade negativa: cocos

Resultados: Após a leitura das provas, os resultados devem ser preenchidos no banco de dados. O sistema indicará qual o nome e espécie do microrganismo isolado e sua probabilidade.

Antes de utilizarmos o KIT NF, que oferece todas as provas bioquímicas necessárias deve-se fazer o teste de oxidase, para ter certeza que se trata de uma bactéria não fermentadora (oxidase positiva).

Antibiograma de bacilos gram-negativos e estudo dos mecanismos de resistência

Surtos de doenças causadas por bacilos gram-negativos resistentes a inúmeras drogas têm ocorrido em muitos países desenvolvidos, especialmente infecções hospitalares. Como discutimos anteriormente, existem alguns pontos focais no uso inapropriado de antibióticos que aumentam ainda mais o problema.



Refleta

Você já parou para pensar em quais medidas você pode tomar para minimizar a resistência bacteriana?

Saiba mais a respeito lendo o arquivo resistência bacteriana. Disponível em: <<http://resistenciabacteriana.webnode.com.pt/news/medidas%20que%20devemos%20tomar%20para%20evitar%20a%20resist%C3%Aancia%20bacteriana/>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

Desta forma, para muitas infecções os resultados dos testes de sensibilidade são fundamentais para a escolha do antibiótico.

Antibiograma

O antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana in vitro diante de agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA). O método tem como vantagem a grande flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, o baixo custo e a constante padronização metodológica pelo CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), além da fácil interpretação.

A realização do antibiograma não é uma tarefa fácil, por suas limitações e principalmente pela crescente descoberta de novos mecanismos de

resistência, o que exige cada vez mais atualização e treinamento dos profissionais. Apesar de sua relativa simplicidade de execução, a técnica de Kirby e Bauer exige que as instruções sejam seguidas rigorosamente de forma que os resultados obtidos correspondam à realidade e possam ser comparados com as tabelas internacionais.

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente, inoculação dessa suspensão na superfície de uma placa de Ágar Müeller Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. A droga presente nos discos se difunde no meio de cultura de forma que a concentração do antimicrobiano diminui (decrece) à medida que se distancia do disco, formando então uma espécie de gradiente de concentração ao redor do disco. Após a incubação em estufa, é analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise.

Essa metodologia proporciona uma avaliação qualitativa da sensibilidade caracterizando os microrganismos testados em: sensíveis, intermediários ou resistentes.

1. Sensível: identifica que a infecção devida ao microrganismo estudado pode ser tratada com a dosagem habitual do antimicrobiano testado e recomendado para esse tipo de infecção.
2. Intermediário: significa que o microrganismo pode ser inibido por concentrações maiores de certas drogas, se doses maiores puderem ser administradas ou se a infecção ocorre em local onde o antimicrobiano é fisiologicamente mais concentrado (trato urinário, por exemplo).
3. Resistente: quando o microrganismo isolado não é inibido pela concentração do antimicrobiano obtida no local da infecção ou quando esta bactéria apresenta mecanismos específicos de resistência.

A interpretação dos resultados pode ser feita com o auxílio de uma régua, paquímetro ou dispositivo semelhante, medindo o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco, e consultando uma tabela apropriada para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano testado.



Veja um exemplo de antibiograma em que as áreas claras ao redor de cada um dos discos de antibióticos indicam as regiões de inibição bacteriana.

Figura 3.4 | Cultura de *Enterobacter sakazakii* num estudo de antibiograma



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Bacterial_lawn_01.jpg>. Acesso em: 30 nov. 2017

Antibiograma quantitativo – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Método utilizado para determinar a menor concentração do agente antimicrobiano necessário para inibir ou matar um determinado microrganismo. Pode ser realizado em meio sólido (ágar) ou meio líquido.

O MIC é determinado pela inoculação do organismo isolado em uma série de tubos contendo a droga em concentrações crescentes (1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). Após uma incubação de 18 horas a 35 °C, a menor concentração da droga que inibir o crescimento visível do organismo é o MIC.

A escolha do número de concentrações a serem testadas varia de acordo com o antimicrobiano, com a espécie do microrganismo e eventualmente com o local da infecção.

Os resultados quantitativos também são relatados em sensíveis, intermediários ou resistentes.

Esse método possibilita aos médicos o conhecimento da menor concentração precisa de droga, auxiliando-os na escolha da droga e dose a ser utilizada para o combate da infecção, reduzindo assim o risco de resistência aos antibióticos.



Pesquise mais

Saiba mais sobre a técnica de difusão em disco (antibiograma) lendo o manual para antibiograma. Disponível em: <www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2017.

Sem medo de errar

Agora que você já aprendeu mais sobre o diagnóstico de bacilos gram-negativos, poderá auxiliar Cintia a entender melhor sobre o processo infeccioso de sua filha e os erros cometidos no tratamento.

Ajude o médico a explicar a Cintia por que a infecção retornou, o erro cometido pela mãe e os problemas que poderiam acarretar. Explique ainda qual a necessidade de se realizar a urocultura.

Cintia errou quando interrompeu o tratamento de sua filha antes do prazo indicado pelo médico. Mesmo que o paciente apresente melhora em poucos dias, é necessário tomar o antibiótico até o último dia conforme receitado pelo médico, a fim de evitar que a infecção retorne ainda mais forte. A interrupção do tratamento antes do final contribui para que as bactérias retornem mais fortes, com maior poder de resistência, podendo inclusive agravar a situação inicial. O tratamento realizado de forma incompleta não mata todas as bactérias, restando as mais resistentes. As bactérias que restaram provavelmente vão dar continuidade ao processo infeccioso inicial. Além disso, a longo prazo, essa interrupção contribui com o processo de resistência bacteriana.

O teste de urocultura irá identificar qual bactéria está provocando a infecção e, com base nessa informação, definir qual o tipo de antibiótico mais recomendado para o processo infeccioso.

A urocultura, é o exame mais indicado para o diagnóstico da infecção urinária, seja ela uma cistite ou uma pielonefrite.

A urocultura é realizada como um meio propício à reprodução de bactérias, chamado meio de cultura onde se coloca a urina do paciente. Caso a urina contenha microrganismos patógenos, em 48 horas será possível identificar a formação de colônias de bactérias, podendo, deste modo, identificarmos qual tipo de bactéria está presente e quais antibióticos são eficazes em combatê-las (antibiograma).

O médico solicitou o exame no retorno da paciente para verificar o antibiograma e decidir qual o melhor antibiótico para o caso, já que a paciente interrompeu o tratamento antes do final e o antibiótico inicial pode não mais surtir efeito.

Avançando na prática

Coleta de urocultura

Descrição da situação-problema

Cintia se esqueceu de solicitar ao médico orientações sobre a coleta da urocultura e, quando foi ao laboratório ficou preocupada com os questionamentos da recepcionista sobre o procedimento de coleta.

Qual a importância e quais os cuidados necessários para uma correta coleta de urocultura?

Resolução da situação-problema

O paciente deve ter ciência de que a coleta de urina não pode ser contaminada por fatores externos (ambiente e a própria pele do paciente), deve ser estéril.

Desta forma, importante seguir algumas orientações:

- Limpar bem a região genital. O ideal é usar gazes (compressas) estéreis para limpar e depois secar a região.
- O pote usado para colher a urina deve ser estéril.
- Na hora de urinar, deve-se evitar o contato da urina com a pele ao redor, como grandes lábios ou o prepúcio do pênis.
- O primeiro jato de urina é sempre desprezado, pois este serve apenas para limpar as impurezas que ficam na uretra.
- A urocultura deve ser levada imediatamente para o laboratório

após a sua coleta. Só é preciso refrigerá-la se o tempo entre a coleta e a entrega for muito longo.

- A melhor urina para a urocultura é a primeira da manhã, pois durante a noite é quando a urina permanece por mais tempo na bexiga, favorecendo a multiplicação das bactérias. Entretanto, esta coleta de manhã nem sempre é possível, pois o paciente costuma colhê-la logo após sair do consultório médico.

Estes cuidados são muito importantes para evitar contaminação da amostra e levar a um resultado falso-negativo da urocultura.

Faça valer a pena

1. Para um correto diagnóstico, e por consequência, um tratamento eficaz, é muito importante que seja realizada a identificação do microrganismo patógeno. A realização inadequada de um teste preliminar pode confundir ou prejudicar o processo de identificação.

Sobre os métodos de identificação com testes convencionais, é correto afirmar:

- a) O primeiro passo para a identificação dos bacilos gram-negativos é a realização de isolamento em meio sólido PDA e esfregaço, através da técnica de coloração de gram.
- b) Após o recebimento do microrganismo deve ser realizada a inoculação ou semeadura utilizando a técnica de disseminação.
- c) O processo de identificação se inicia com a observação a olho nu das características das colônias isoladas, devem ser observadas as características de forma, tamanho, elevação, bordos, superfície, estrutura, caracteres ópticos e cromogenia ou pigmentação.
- d) Podem ser observadas ainda outras características de acordo com o meio a ser trabalhado, como hemólise (ágar manitol), fermentação de açúcares (MacConkey, SS), dentre outros.
- e) Após a observação das características das culturas devem ser realizados esfregaços para colorações especiais, observação de morfologia microscópica, presença de esporos, flagelos, cápsulas, dentre outros.

2. Após a coloração de gram, na qual foi realizada a provável identificação da bactéria, as colônias devem ser isoladas e identificadas até a espécie, conforme sua importância clínica.

Para este fim são utilizados os testes químicos, os quais tentam responder algumas perguntas como o tipo de substrato que a bactéria usa, qual a

enzima produzida pela bactéria, qual o produto do metabolismo da bactéria, se a bactéria precisa de substâncias especiais para seu crescimento, etc.

Sobre o método de identificação com kits comerciais é correto afirmar:

- a) Rugai modificado é um meio utilizado para identificação presuntiva de enterococos, vibrios e aeromonas. A técnica consiste em um tubo contendo substratos para visualização de seis provas bioquímicas nas quais é possível realizar a leitura das seguintes reações: motilidade, lisina descarboxilase, fermentação de glicose e sacarose, produção de gás-glicose e ácido sulfídrico.
- b) Enterokit B ou Conjunto EPM/ MILI/CITRATO trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai modificado, separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL (Rugai modificado) para o meio MILI após adição do reativo de Kovacs.
- c) O Enterokit C consiste nos testes de oxidação da lisina, arginina e ornitina (base Moeller), fermentação de adonitol e arabinose e liquefação da gelatina. Sua finalidade principal é complementar o Enterokit B na identificação das espécies mais importantes de Klebsiella, Enterobacter, Hafnia e Serratia.
- d) A soma dos testes do Enterokit B e C não permite diagnosticar com segurança as espécies mais importantes de Klebsiella, Enterobacter, Hafnia e Serratia.
- e) Em atividades de rotina de Bacteriologia Clínica, a identificação ou confirmação sorológica é feita apenas com germes comprovadamente não patogênicos.

3. Surto de doenças causadas por bacilos gram-negativos resistentes a inúmeras drogas têm ocorrido com muita frequência, especialmente infecções hospitalares.

Sendo assim, para muitas infecções os resultados dos testes de sensibilidade são fundamentais para a escolha do antibiótico.

Sobre os testes de antibiograma de bacilos gram-negativos é correto afirmar:

- a) O antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana in vitro diante de agentes antimicrobianos, também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA).
- b) O método do antibiograma tem como vantagem a grande flexibilidade na escolha dos antimicrobianos, o baixo custo e a constante padronização metodológica pelo CLSI (Clinical laboratory Standards Institute), porém é de difícil interpretação.

- c) A metodologia do antibiograma proporciona uma avaliação quantitativa da sensibilidade caracterizando os microrganismos testados em: sensíveis, extrassensíveis ou resistentes.
- d) O antibiograma quantitativo é um método utilizado para determinar a maior concentração do agente antimicrobiano necessária para inibir ou matar um determinado microrganismo. Pode ser realizado em meio sólido (ágar) ou meio líquido.
- e) O método do antibiograma quantitativo possibilita aos médicos o conhecimento da menor concentração precisa de droga, auxiliando-os na escolha da droga e dose a ser utilizada para o combate da infecção, aumentando assim o risco de resistência aos antibióticos.

Referências

ÁGAR bile-esculina. Disponível em: <www.mbiolog.com.br/produtos/Agar_Bile_esculina.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2017.

ÁGAR DNase. Disponível em: <www.mbiolog.com.br/site/wp-content/uploads/2012/07/Bula-Agar-DNase-vs02.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ALVES, A. et al. **Tipagem genética de microrganismos**. 2003. Disponível em: <<http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ANVISA. **Gram-negativos fermentadores**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/introducao.htm>. Acesso em: 6 nov. 2017.

_____. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviço de saúde**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia.asp>>. Acesso em: 6 nov. 2017.

ARABINOSE Fermentation Test. Disponível em: <http://www.vumicro.com/vumie/help/VUMICRO/Arabinose_Fermentation_Test.htm>. Acesso em: 10 nov. 2017.

AUGUSTO BERALDO (Brasil). Laboratório Fleury S/s Ltda. (Ed.). **Manual de Exames**. São Paulo: Laboratório Fleury S/c Ltda., 1996. 402 p.

BACTÉRIAS gram-negativas não fermentadoras. Disponível em: <http://pt-br.aia1317.wikia.com/wiki/Bact%C3%A9rias_gram_negativas_n%C3%A3o-fermentadoras>. Acesso em: 14 nov. 2017.

BIONE GENIOS. **Bacilos gram-negativos não fermentadores**. Disponível em: <<http://bioneogenios.blogspot.com.br/2013/01/bacilos-gram-negativos-nao-fermentadores.html>>. Acesso em: 17 nov. 2017.

BIOMEDICINAPADRAO. **Provas para identificação de bactérias – Catalase**

coagulase. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2011/04/provas-para-identificacao-de-bacterias.html>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BIOMEDICINATOTAL. **Identificação de enterobactérias.** Disponível em: <<http://www.biomedicinatotal.com.br/2015/07/identificacao-de-enterobacterias.html>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

BRASILBABYCENTER. **Infecção urinária no bebê.** Disponível em: <<https://brasil.babycenter.com/a3200058/infec%C3%A7%C3%A3o-urin%C3%A1ria-no-beb%C3%AA#ixzz4zulsKP87>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

BURTON, Gwendolyn R. W.; ENGELKIRK, Paul G. **Microbiologia: microbiologia para as ciências da saúde.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 426 p.

EBAH. **Bacilos gram-negativos não fermentadores.** Disponível em <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABElcAE/bacilos-gram-negativos-nao-fermentadores>>. Acesso em: 14 nov. 2017.

EBAH. **Identificação de bactérias – microbiologia clínica.** Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFPOwAD/identificacao-bacterias>>. Acesso em: 6 nov. 2017.

_____. **Teste catalase mais ou mens 7.** Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAFQKwAJ/teste-catalase-mais-mens7?part=3>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

EBC. **Como identificar a infecção urinária em crianças?** Disponível em: <<http://www.ebc.com.br/infantil/para-pais/2015/04/como-identificar-infeccao-urinaria-em-criancas>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

ENTEROBACTÉRIAS. Disponível em: <<http://microbiologia.comunidades.net/enterobacterias2>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

HIRATA, Mario Hiroyuki; HIRATA, Rosario Dominguez Crespo. **Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1997. 616 p.

IBB.UNESP. **Roteiros para aulas práticas – Ciclo de bacteriologia.** Disponível em: <<http://www.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/MicrobiologiaeImunologia/APOSTILA-CICLO-DE-BACTERIOLOGIA-MICRO-VET-2012.pdf>>. Acesso em: 9 nov. 2017.

ISOLAMENTO de Microrganismos. Disponível em: <<http://www.microbiologia.ufba.br/aulas/provas%20bioquimicas.doc>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

KEITE NOGUEIRA. **Bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose**. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/3989402/>>. Acesso em: 16 nov. 2017.

LABCLIN. **Identificação de bactérias gram-negativas**. Disponível em: <<http://laudos.labclim.com.br/intranet/documentos/micro/PROMIC-0027-1.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

LABORCLIN. **Manual para antibiograma**: difusão em disco (Kirby & Bauer). Disponível em: <www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2017.

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 415 p.

LOOKFORMEDICAL. **Testes de aglutinação**. Disponível em: <<https://lookformedical.com/definitions.php?q=Testes+de+Aglutina%C3%A7%C3%A3o&lang=3>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MARTINS, Douglas. **Provas de identificação**. Disponível em: <<http://biomedicinaemicro.blogspot.com.br/p/provas-de-identificacao.html>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MASTER DIAGNÓSTICA. **Kit NF III**. Disponível em: <<http://www.masterdiagnostica.com.br/produto/kit-nf-iii>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

MBIOLOG DIAGNÓSTICOS. **Pessoa & Silva – Rugai Modificado**. Disponível em: <http://www.mbiolog.com.br/?page_id=252>. Acesso em: 27 nov. 2017.

MD.SAÚDE. **Exame urocultura**: quando fazer e como colher. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/2010/09/exame-urocultura.html>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

PIRES, B. F. de M. **Acompanhamento das atividades do laboratório de microbiologia médica veterinária da faculdade de agronomia e medicina veterinária da universidade de Brasília**. 2013. Relatório de estágio de curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Disponível em:

<http://bdm.unb.br/bitstream/10483/6628/1/2013_BrunoFernandesDeMouraPires.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2017.

Provas de Identificação. Disponível em: <<http://biomedicinaemicro.blogspot.com.br/p/provas-de-identificacao.html>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

PROBAC. **Enterokit B**. Disponível em: <<http://probac.com.br/Produto/Detalhe/pt-BR/257>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

SCIENTIA. **Reagente de Kovac**. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/scientiaestpotentiaplus/reagente-de-kovac>>. Acesso em: 28 nov. 2017.

SÓ BIOLOGIA. **Fermentação**. Disponível em: <<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica3.php>>. Acesso em: 6 nov. 2017.

TESTE de oxidase. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/doc/76156739/teste-de-oxidase>>. Acesso em: 7 nov. 2017.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**: Microbiologia médica. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

Características gerais e patogênicas de bactérias fastidiosas

Convite ao estudo

Caro aluno, dando andamento aos nossos estudos de Bacteriologia Clínica, nesta unidade, você terá a oportunidade de conhecer os espiroquetídeos, gênero *Mycobacterium* e *Corynebacterium diphtheriae* e *Chlamidia sp.*

Você conhecerá as patologias associadas aos gêneros, as principais infecções causadas por essas bactérias, como ocorrem as manifestações clínicas e seus principais sintomas, e, ainda, os principais testes utilizados para o diagnóstico destes microrganismos.

Ao final desta unidade, você será capaz de elaborar uma tabela contendo as diferentes patologias causadas por estes microrganismos, apresentando e elencando as diferenças entre eles.

Para tanto, buscando auxiliar no desenvolvimento das competências e dos objetivos desta unidade, apresentamos o seguinte contexto: Rafael é estudante de Medicina e está cursando o 5º ano. Em um de seus trabalhos da faculdade, seu professor solicitou à turma que buscasse um tema para apresentar a uma comunidade carente, a fim de orientar e evitar novos surtos de doenças. Rafael se prontificou a dar uma palestra aos moradores de uma comunidade ribeirinha sobre leptospirose. Ele escolheu o tema devido aos frequentes surtos divulgados na TV. Estes eram em virtude dos alagamentos ocorridos pela enchente do rio local. Rafael tinha quatro semanas para se preparar e começou a estudar e levantar os dados de notificação local para poder conversar com os moradores da região.

Assim como os demais casos estudados anteriormente, este será mais um dos quais você irá vivenciar em sua vida profissional, e seus conhecimentos serão primordiais para auxiliar as equipes médicas e multidisciplinares no correto diagnóstico e tratamento dos pacientes. Bons estudos!

Seção 4.1

Espiroquetídeos

Diálogo aberto

Caro aluno, iniciando nossos estudos sobre espiroquetídeos, vamos retomar o caso de Rafael, o estudante de Medicina que se prontificou a dar uma palestra a uma comunidade ribeirinha sobre leptospirose. Seu tempo era curto, então Rafael começou a levantar os dados para preparar o material.

Ele verificou que 55 pessoas foram diagnosticadas com a infecção e que a água contaminada é apontada como o agente proliferador da doença; ainda, que todos apresentavam um quadro diarreico e que, além disso, a cidade ficou isolada devido à subida do rio.

Com esses dados em mãos, ajude Rafael a levantar os principais tópicos de orientação que deverão ser repassados à comunidade.

Não pode faltar

Os espiroquetídeos são bactérias móveis e helicoidais. Possuem flagelos localizados no interior da membrana externa, a qual é formada por múltiplas camadas e denominada de bainha externa. O gênero *Spirillum* é uma exceção, pois possui flagelos externos.

Sua motilidade difere de outras bactérias, pois os espiroquetídeos são impulsionados por rotação em ambiente líquido, mantendo sua motilidade mesmo em meios altamente viscosos.

Não são visíveis em microscopia óptica, sendo observados apenas em campo escuro, impregnação de prata ou imunofluorescência.

Possuem três gêneros de importância médica, por causarem infecção humana: *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*. O gênero *Treponema* possui quatro espécies patogênicas ao homem, as quais, apesar de muito semelhantes, causam diferentes tipos de doenças.

Características gerais e patogenia do *Treponema pallidum*

O *Treponema pallidum*, patógeno predominante entre os espiroquetídeos, é o responsável por causar a sífilis. Morfologicamente, é uma célula afilada com hélices regulares e extremidades delgadas, que possui filamentos, os quais são os responsáveis pelos movimentos em rotação e flexão, que facilitam sua invasão nos tecidos.

O *T. Pallidum* não é cultivável em meios bacteriológicos ou em cultura de células. Sua transmissão se dá através de uma pessoa infectada para outras, pelo contato a partir de lesões cutâneas ou membranas mucosas, como genitália, boca e reto, que contenham espiroquetas. Raramente, o sangue para transfusões coletado durante os primeiros estágios da sífilis é infeccioso.

A sífilis é uma doença que acomete o mundo todo de forma frequente. É uma das principais doenças de notificação compulsória nos EUA. O diagnóstico laboratorial dessa doença se baseia na detecção direta de espiroquetas no cancro. O método usual é o exame por microscopia de campo escuro do raspado da superfície lesionada; um método alternativo é a imunofluorescência. As provas sorológicas são usadas para o diagnóstico das demais etapas da doença.

Conforme já citado, a sífilis é transmitida através do contato sexual, de agulhas contaminadas ou transfusão, contato de mucosas com lesões infeccionadas ou de transferência placentária. A transmissão é mais comum no início da doença, e o paciente contaminado deixa de transmitir quatro anos depois do início da doença. Nos casos de bacteremia intensa, pode haver a morte do feto e/ou aborto. Se o bebê conseguir sobreviver à infecção, as lesões irão se manifestar nos primeiros dois meses de vida.

Infelizmente, ainda não existe vacina para a doença, sendo necessário fazer a prevenção, a qual se dá com o uso de preservativos, o acompanhamento sorológico dos indivíduos infectados e de pessoas próximas e um diagnóstico correto e precoce, a fim de se iniciar o tratamento o mais rápido possível.

A penicilina continua eficaz no tratamento de todos os estágios da doença. Uma única injeção de penicilina G benzatina pode erradicar o *T. Pallidum* e curar a sífilis inicial. Para pacientes alérgicos à penicilina, podem ser usados tetraciclina, eritromicina ou cefalosporina, porém o período de administração é longo. Até o momento, não se observou nenhuma resistência à penicilina.

Mais da metade dos pacientes com sífilis secundária tratados com penicilina apresenta febre, calafrios, mialgias e outros sintomas muito semelhantes à influenza, momentos após a administração do antibiótico. Essa manifestação é denominada de Reação de Jarisch-Herxheimer, e é atribuída à lise dos treponemas e à liberação de substâncias semelhantes à endotoxina. Os pacientes devem ser alertados sobre esta possibilidade e informados de que os sintomas podem durar por até 24 horas e o alívio deles se dá com o uso de aspirina.

Importante lembrar que, em pacientes tratados dois anos após o início da infecção, os testes sorológicos se mantêm, geralmente, positivos, mesmo após a cura.



Pesquise mais

Aprenda mais sobre a Reação de Jarisch-Herxheimer lendo o artigo a seguir:

SANTOS, Talita Batalha Pires dos. Reação de Jarisch-Herxheimer na sífilis secundária - apresentação incomum. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 12-15, [s.d.]. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5755>. Acesso em: 7 dez. 2017.

Características gerais e patogenia do *Treponema* e da *Leptospira sp*

As leptospiros são espiroquetas finos, firmemente enrolados, móveis e que não se coram com corante, mas podem ser observadas por microscopia de campo escuro em preparações a fresco, por contraste de fase ou por técnicas de impregnação de prata, imunofluorescência e imunoperoxidase. Não são coradas pela coloração de gram e não podem ser visualizadas através de microscopia óptica convencional, por terem dimensões reduzidas, sendo visíveis pela microscopia eletrônica.



Assimile

Conforme o dicionário, imunoperoxidase é a "técnica realizada em lâmina de microscópio, que permite a detecção e a localização de antígenos ou anticorpos em células ou no tecido" (DIFERENÇA..., on-line, [s.d]). Já a imunofluorescência é o "método de identificação

de material antigênico de natureza bacteriana, virótica ou de outra origem em que se empregam anticorpos marcados com fluoresceína" (DIFERENÇA..., on-line, [s.d.]).

Aprimore ainda mais seus conhecimentos lendo a reportagem a seguir:

TESTE de imunoperoxidase e teste imunoenzimático. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/medicina/teste-de-imunoperoxidase-e-teste-imunoenzimatico/33861>>. Acesso em: 11 abr. 2018.

São conhecidas quatorze espécies patogênicas, sendo a mais importante a *Leptospira interrogans*, a qual é a responsável por causar a leptospirose. É dividida em sorogrupos, que ocorrem em diferentes animais e em diferentes localizações geográficas.

As leptospirosas infectam vários animais, como ratos e outros roedores, animais de criação e até animais domésticos. Os animais excretam as leptospirosas na urina, as quais contaminam a água e o solo. O nado em águas contaminadas ou a ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas podem ocasionar infecção humana. Os mineradores, os fazendeiros e as pessoas que trabalham em esgoto correm alto risco de infecção. A transmissão de uma pessoa para outra é muito rara.

Como citado, a infecção em humanos acontece quando as leptospirosas são ingeridas ou penetram através da pele ou das membranas mucosas. Os microrganismos circulam pela corrente sanguínea e se multiplicam por vários órgãos, produzindo febre e disfunção hepática renal e no sistema nervoso central.

O diagnóstico é realizado com base no relato de uma possível exposição, sinais clínicos sugestivos e um aumento acentuado de anticorpos de aglutinação. Eventualmente, as leptospirosas são isoladas de cultura de sangue e de urina.

O tratamento também é feito com antibióticos, pois as leptospirosas são sensíveis a todos os antibióticos usados clinicamente. A penicilina é o mais utilizado, e é administrada em altas doses, porém, em casos de pacientes alérgicos, é utilizada a eritromicina.

A prevenção é feita evitando contato com ambientes contaminados, mas, em casos que os indivíduos estão expostos a esses ambientes, a doxiciclina é eficaz para prevenir a doença, e o

tratamento de profilaxia deve ser de curta duração.

Vale lembrar que nenhum antibiótico é capaz de reverter o dano tecidual, desta forma, a administração dele deve ser precoce.

Manifestações clínicas

Sífilis primária: no local da inoculação, as espiroquetas se multiplicam e, entre duas a dez semanas, ocorre a formação de uma úlcera, denominada de cancro duro. A úlcera é cicatrizada de forma espontânea, porém as espiroquetas se disseminam nos tecidos.

Sífilis secundária: é a fase mais evidente da doença, na qual os microrganismos são mais numerosos. Tem início entre duas e oito semanas após o aparecimento do cancro e sua duração varia de poucos dias a meses. Nesta fase, podem aparecer lesões secundárias com uma erupção macular, maculopapular ou pustulosa nas palmas das mãos e nas solas dos pés, ou com placas úmidas na pele e nas membranas mucosas. As lesões úmidas nos órgãos genitais são denominadas de condiloma nata. Podem ocorrer sintomas sistêmicos, com linfadenopatia generalizada (alteração no tamanho e na consistência dos linfonodos em virtude da doença disseminada pelo corpo), febre, mal-estar geral, perda dos cabelos ou redução das sobrancelhas. Pode ocorrer, ainda, um envolvimento do órgão, ocasionando meningite, nefrite, hepatite, etc. Estas lesões são altamente infecciosas, uma vez que são ricas em espiroquetas, contudo, cicatrizam de forma espontânea. Estes estágios podem se apresentar sem quaisquer sintomas, porém, mesmo assim, a doença pode evoluir.



Assimile

Maculopapular é um tipo de erupção cutânea que não se eleva acima da superfície da pele. Contém máculas, que são uma mancha sobre a pele pálida, e pápulas, pedaços pequenos e sólidos que causam a inflamação da pele. Eles contêm pus e são eritematosos, uma vez que fazem a pele parecer vermelha (MACULOPAPULAR..., [s.d.]).

Sífilis latente: esta fase é assintomática, embora não seja uma fase necessariamente inativa. Ela foi dividida em um período inicial

de quatro anos, chamado latente precoce, e após este período foi denominada latente tardio. Na latência precoce, pode ocorrer recaída e o paciente apresentar um processo infeccioso, e a latência tardia pode evoluir sem qualquer complicação.

Sífilis tardia ou terciária: pode apresentar granulomas, principalmente, na pele e nos ossos, além de envolver o sistema nervoso central ou lesões cardiovasculares. A sífilis neuromuscular pode ser sintomática ou assintomática. A infecção sintomática é semelhante à meningite asséptica do estágio secundário, em que qualquer nervo craniano pode ser atingido pela inflamação, ocasionando surdez e alterações visuais. O comprometimento cerebral se manifesta com uma grande variedade de alterações físicas e psíquicas. O intervalo entre a doença primária e as complicações neurológicas ocorre, em média, entre cinco e dez anos.

Sífilis congênita: uma mulher infectada pode transmitir o *Treponema pallidum* para o feto após o terceiro mês de gestação. Se não tratada imediatamente, pode ocorrer o parto de um natimorto ou anormalidades fetais múltiplas, como meningite, anemia, lesões ósseas, entre outras.

A infecção em humanos por leptospiros ocorre quando os microrganismos são ingeridos ou penetram através das mucosas ou da pele. Os microrganismos circulam pela corrente sanguínea e se multiplicam em vários órgãos, causando febre, disfunção hepática, renal e no sistema nervoso. A doença ocorre tipicamente em duas fases, com um quadro sintomatológico de febre, calafrios e dores de cabeça intensa, no estágio inicial da doença, que parece ter seus sintomas resolvidos em um curto período, quando os microrganismos saem da corrente sanguínea. A segunda fase é caracterizada pelo aparecimento de uma meningite asséptica e, em casos mais graves, causa danos hepáticos e disfunção renal.

Teste de VDRL – sorologia para sífilis

O **teste VDRL** (*Veneral Disease Research Laboratory*) é um teste laboratorial utilizado na identificação da sífilis. É um teste de floculação, não treponêmico, o qual busca anticorpos (reaginas) no soro ou no líquido cefalorraquidiano.

A lecitina, o colesterol e a cardiolipina, combinados, possuem semelhanças imunológicas com os antígenos do *Treponema pallidum*, formando um antígeno não treponêmico. A reação dos anticorpos da amostra com o antígeno formado produz uma floculação, a qual pode ser visualizada em microscopia óptica.

O teste é positivo quando é possível observar uma floculação formada pela interação da amostra coletada do paciente com o reagente. Esse método é utilizado para triagem dos pacientes, contudo o diagnóstico conclusivo não deve ser tomado com base somente por esse exame. Desta forma, o resultado do exame deve ser somado aos sinais clínicos do paciente.

Importante ressaltar que os pacientes que tiveram sífilis e tratamento de forma correta ainda podem apresentar resultados positivos, o que chamamos de cicatriz sorológica.

O teste também é utilizado no acompanhamento do tratamento dos pacientes, já que apresenta uma resposta rápida na queda das frações.

Técnica de teste com soro

Pipetar a amostra (50 ml) e o reagente nº 1 (20 ml) em uma placa escavada, agitar e examinar no microscópio (100X).

Para evitar o efeito prozona, recomenda-se uma diluição com cloreto de sódio (NaCl).

Quadro 4.1 | Prova semiquantitativa

Cavidade nº	1	2	3	4	5	6
Diluição	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64

Fonte: elaborado pela autora.

Proceder com as pipetagens em cada cavidade escavada, conforme diluição apresentada no quadro.

Pipetar 50 ml de cloreto de sódio 0,85% em cada uma das cavidades (de 1 a 6). A seguir, pipetar 50 ml da amostra na cavidade nº 1 e homogeneizar. Desta solução formada (cloreto de sódio + amostra), transferir 50 ml para a cavidade nº 2, homogeneizar e repetir o processo até a cavidade nº 6. Na última cavidade, será formado um excesso de 50 ml, o qual deverá ser desprezado.

Adicionar 20 ml do reagente nº 1 nas cavidades de 1 a 6 e agitar.

Observar em microscopia óptica (100X) assim que finalizada a agitação. O título é correspondente à maior diluição de amostra em que houve floculação.

Teste com líquido cefalorraquidiano

1. Proceder a diluição do reagente nº 1 com o cloreto de sódio 10% e deixar repousar por 4 minutos.
2. Pipetar 50 ml do líquido cefalorraquidiano centrifugado e 10 ml do reagente nº 1 diluído.
3. Agitar e observar em microscopia óptica (100X).

Recomenda-se realizar um teste com uma amostra sem diluição e, também, outro com uma diluição de 1:8 com cloreto de sódio 0,85% em todas as amostras, para evitar o efeito prozona.



Exemplificando

O fenômeno de prozona trata-se da ausência de reatividade em uma amostra que, embora contenha anticorpos não treponêmicos, apresenta resultado não reagente quando é testada sem diluir – ou mesmo em baixas diluições. Esse fenômeno decorre da relação desproporcional entre as quantidades de antígenos e anticorpos presentes na reação não treponêmica, gerando resultados falso-negativos. Ocorre nas amostras de pessoas com sífilis, em virtude da elevada quantidade de anticorpos presentes.

O fenômeno de prozona não é observado nos testes treponêmicos. É observado, principalmente, na sífilis secundária, fase em que há produção de grande quantidade de anticorpos. Além disso, o fenômeno é facilmente identificado fazendo-se o teste qualitativo com a amostra pura e diluída a 1:8 ou a 1:16.

Fonte: DIAGNÓSTICO da Sífilis. [s.d.]. Disponível em: <<https://bit.ly/2HQezlk>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

Resultados:

O teste é considerado positivo quando é possível observar a floculação com formação de grânulos em vários tamanhos.

Para as suspensões com aspecto heterogêneo, recomenda-se a

diluição das amostras e a realização da prova semiquantitativa.

O teste é considerado negativo quando não há floculação e as suspensões formadas possuem aspecto homogêneo. Pode ocorrer um falso negativo, isto acontece em casos que a infecção é recente (menos de três meses) e a doença ainda não se manifestou (fase latente).

O teste é muito utilizado para o diagnóstico e o acompanhamento de pacientes com a doença. Os títulos se apresentam elevados nas fases agudas e, à medida que o paciente evolui com o tratamento, eles tendem a diminuir. Os títulos baixos podem se manter mesmo após a finalização do tratamento, o que é denominado de cicatriz sorológica.

O teste é muito utilizado em virtude do baixo custo e da facilidade na realização do procedimento.

O VDRL é um teste não treponêmico muito utilizado no Brasil devido ao seu baixo custo e à sua praticidade na realização do procedimento.

Teste FTA-Abs (*fluorescent treponemal antibody absorption*)

O teste é utilizado para a identificação de anticorpos contra o *Treponema pallidum* em soro humano e líquidos biológicos, ou seja, para a confirmação da sífilis.

O método consiste na capacidade que os anticorpos possuem de se unir com alguns corantes sem alterar as propriedades imunológicas. O procedimento se baseia em duas reações:

1. Soro do paciente + substrato antigênico = formação de um complexo antígeno-anticorpo (se houver presença de anticorpos no soro).
2. Complexo antígeno anticorpo (formado na etapa 1) + antigamaglobulina humana marcada com isotiocianato de fluoresceína = reação positiva (fluorescência verde maçã brilhante, observada através de um microscópio de fluorescência).

Procedimento:

1. Restabelecer o tampão salina fosfato através de diluição com água destilada (1 L).

2. Preparar diluição dos soros controles na proporção de 1:5 e, também, das amostras com o absorvente na mesma proporção.
3. Verter sobre as áreas reagentes as diluições do controle positivo e negativo das amostras de forma que todos fiquem completamente cheios.
4. Incubar em câmara úmida por 30min (temperatura ambiente).
5. Proceder a lavagem com o tampão salina fosfato. A lavagem deve ser feita em duas etapas, com duração de cinco minutos cada uma.
6. Colocar as lâminas na jarra de Coplin, contendo tampão salina fosfato, agitando com cuidado durante cada etapa de lavagem.
7. Fazer a diluição da antigamaglobulina total humana marcada com isotiocianato de fluoresceína no tampão salina fosfato, conforme indicação de titulação do fornecedor.
8. Secar as bordas laterais com cuidado para que as áreas reagentes se mantenham úmidas.
9. Cobrir as áreas reagentes com a diluição da antigamaglobulina.
10. Incubar na câmara úmida 30min (temperatura ambiente).
11. Repetir as etapas 7 e 9.
12. Colocar o meio de montagem sobre a lâmina e cobrir a área reagente com a laminula com muito cuidado. Importante não pressionar.

Interpretação dos resultados

O teste é considerado positivo quando os treponemas se coram com uma coloração típica verde-maçã; é considerado negativo quando não é possível observar a fluorescência ou em situações em que a coloração formada é muito fraca.

Pode ocorrer resultado falso-negativo em casos de infecções precoces, nos quais os anticorpos ainda não se desenvolveram.

Confirmação:

- VDRL positivo e FTA-ABS positivo confirmam o diagnóstico de sífilis.

- VDRL positivo e FTA-ABS negativo indicam outra doença que não sífilis.
- VDRL negativo e FTA-ABS positivo indicam sífilis em fase bem inicial, ou sífilis já curada, ou sífilis terciária.
- VDRL negativo e FTA-ABS negativo descartam o diagnóstico de sífilis (PINHEIRO, 2018, [s.p.]).



Refleta

Você sabe quais são as diferenças entre os testes não treponêmicos e os treponêmicos?

"A diferença principal é que os testes não treponêmicos detectam anticorpos que não são específicos contra *Treponema pallidum*, e os testes treponêmicos detectam anticorpos específicos para antígenos de *Treponema pallidum*. Podem ocorrer resultados falso-positivos em diferentes situações, tendendo a apresentar títulos baixos nos testes não treponêmicos" (DIAGNÓSTICO..., [s.d.], p. 2).

Sem medo de errar

Caro aluno, agora que você já aprofundou seu conhecimento sobre os espiroquetídeos, poderá auxiliar Rafael na elaboração de sua palestra e a solucionar a seguinte questão: quais são os principais tópicos de orientação que deverão ser repassados à comunidade?

Rafael deverá informar a população sobre:

1. O que é a leptospirose e como ocorre a transmissão da doença.
2. Quais são os principais sintomas.
3. Como pode ser realizada a prevenção.
4. Esclarecer a população sobre o que ela deve fazer ao perceber esses sintomas.
5. Informar o tempo que leva para a doença aparecer.
6. Informar como é o tratamento.
7. Ressaltar quais são os cuidados a serem tomados se o contato com água contaminada for inevitável.

8. Informar por quanto tempo o microrganismo é capaz de sobreviver no meio ambiente.

Para se aprofundar mais sobre cada tópico citado, leia o documento do Governo do Estado de Rondônia sobre leptospirose. Disponível em: <<http://www.rondonia.ro.gov.br/agevisa/institucional/vigilancia-ambiental/controle-de-zoonoses-e-animais-peconhentos/leptospirose/>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

Avançando na prática

Risco de contaminação de leptospirose em latas de sucos, refrigerantes ou cervejas

Descrição da situação-problema

Um dos participantes da palestra de Rafael perguntou ao estudante se existe o risco de uma pessoa contrair leptospirose bebendo líquido em latinhas de refrigerantes, sucos, cerveja ou água. Ajude Rafael nesta explicação.

Resolução da situação-problema

Apesar de a transmissão ocorrer, principalmente, pela penetração da leptospira através da pele ou das mucosas, já foi descrita pela ingestão de água ou alimentos contaminados com a urina de ratos, ainda que raramente.

Se for ingerida, a leptospira morre ao entrar em contato com o suco gástrico. A possibilidade de alguém se infectar bebendo em latinhas contaminadas com a urina de ratos é teoricamente possível, se houver uma ferida na boca, que possa permitir a entrada da leptospira no organismo pela circulação sanguínea. Apesar desse risco teórico, até o momento não foram comprovados casos de transmissão de leptospirose por latinhas de cerveja, refrigerantes ou outras bebidas envasadas.

De qualquer modo, é essencial que se lave bem com água limpa qualquer latinha ou recipiente antes de ser levado à boca, para não se correr o risco de contaminação por algum tipo de bactéria. Esse hábito de higienização não deve isentar os comerciantes de

verificarem as condições de armazenamento de seus estoques, das condições de acondicionamento de seu lixo e de manter implantado um sistema de controle de roedores em todas suas instalações (RONDONIA, [s.d.]).

Faça valer a pena

1. O *Treponema pallidum* é o responsável por causar a sífilis. É o patógeno predominante entre os espiroquetídeos. Morfologicamente, é uma célula afilada com hélices regulares e extremidades delgadas, que possui filamentos, os quais são os responsáveis pelos movimentos em rotação e flexão. Esses movimentos facilitam sua invasão nos tecidos.

Sobre as características gerais e a patogenia do *Treponema pallidum*, é correto afirmar:

- a) O *T. pallidum* é cultivável em meios bacteriológicos ou em cultura de células.
- b) A transmissão do *T. pallidum* não ocorre de uma pessoa infectada para outra.
- c) O sangue para transfusões coletado durante os primeiros estágios da sífilis é sempre infeccioso.
- d) O diagnóstico laboratorial da sífilis se baseia na detecção direta de espiroquetas no cancro.
- e) Um método usual é o exame macroscópico do raspado da superfície lesionada.

2. As leptospiras são espiroquetas finas, firmemente enroladas, móveis e que não se coram com corante, mas podem ser observadas por microscopia de campo escuro em preparações a fresco, observadas por contraste de fase ou por técnicas de impregnação de prata e imunofluorescência e imunoperoxidase.

Sobre as características gerais e patogenia da *Leptospira* sp, é correto afirmar:

- a) São coradas pela coloração de gram e podem ser visualizadas através de microscopia óptica convencional.
- b) São conhecidas apenas duas espécies patogênicas, sendo a mais importante a *Leptospira interrogans*, a qual é a responsável por causar a leptospirose.

- c) As leptospiras infectam vários animais, como ratos e outros roedores, animais de criação e até animais domésticos. Os animais excretam as leptospiras nas fezes, as quais contaminam a água e o solo.
- d) A transmissão de uma pessoa para outra é frequente.
- e) A infecção em humanos acontece quando as leptospiras são ingeridas ou penetram através da pele ou das membranas mucosas.

3. O teste VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) é um teste laboratorial que permite a identificação de pacientes portadores da sífilis. Ele consiste em um teste de floculação, não treponêmico, que busca anticorpos (reaginas) no soro ou líquido cefalorraquidiano.

Sobre o teste VDRL, é correto afirmar:

- a) A combinação de lecitina, colesterol e cardiolipina possui semelhança imunológica com antígenos do *Treponema pallidum*, consistindo em um antígeno não treponêmico. A interação das reaginas da amostra com este antígeno produz floculação, a qual não pode ser detectada no microscópio óptico.
- b) A amostra coletada do paciente é colocada em uma placa junto ao reagente, sendo possível observar uma floculação quando o teste for negativo.
- c) O método é indicado para teste de triagem. O diagnóstico final é baseado somente no resultado laboratorial.
- d) Pacientes com infecção por sífilis tratada podem apresentar resultados positivos em títulos baixos (cicatriz sorológica).
- e) O VDRL pode ser utilizado para acompanhar a terapêutica, contudo não possui uma resposta rápida pela queda de títulos, pela negatificação e pelas modificações mais lentas ou mesmo inexistentes para os testes treponêmicos.

Seção 4.2

Gênero *Mycobacterium*

Diálogo aberto

Prezado aluno, dando início aos nossos estudos sobre o gênero *Mycobacterium*, vamos retomar o caso de Rafael, o estudante de Medicina que estava se preparando para dar uma palestra sobre leptospirose em uma comunidade ribeirinha. Rafael levantou os dados necessários e se aprofundou bastante no tema, a fim de esclarecer toda a doença à comunidade.

Como o município é muito carente e desprovido de profissionais da saúde, Rafael também se prontificou a falar com a prefeitura local, a fim de prestar auxílios. Ele explicará o motivo do surto e, também, fará algumas orientações, com o propósito de minimizar os sintomas dos pacientes e evitar novas contaminações.

Ajude Rafael a explicar às autoridades os principais cuidados a serem tomados.

Não pode faltar

Micobactérias: tipos, características gerais e patogenia

As micobactérias são bacilos aeróbios, coradas fracamente pela técnica de coloração de gram e são as únicas bactérias álcool-ácidos resistentes (capacidade do organismo de reter o corante carbolfucsina). Esta resistência se dá em virtude da alta concentração de lipídios presentes na parede celular. Não possuem flagelos, não formam esporos, não produzem toxinas e não possuem cápsulas. São microrganismos intracelulares que infectam e se proliferam no interior de macrófagos.

O gênero possui cerca de 60 espécies conhecidas e somente algumas são patogênicas ao homem. Os principais patógenos são o *Mycobacterium tuberculosis*, agente responsável por causar tuberculose, e o *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra.

Entre as espécies do gênero, a *Mycobacterium leprae* é a única que até o momento não pode ser cultivada em ambiente laboratorial.

Tuberculose

É uma doença infectocontagiosa causada por algumas micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e, especialmente, *Mycobacterium tuberculosis*. A transmissão ocorre, principalmente, por meio de partículas infectantes expelidas através da tosse, espirros ou perdigotos, os quais podem permanecer no ar por horas, sendo, assim, uma doença altamente contagiosa.

Mycobacterium tuberculosis

Cresce lentamente, com um tempo de geração em torno de 18 horas, ao contrário da maioria das bactérias, que cresce em cerca de uma hora. Desta forma, as culturas de amostras clínicas devem ser mantidas por seis a oito semanas antes de serem diagnosticadas como negativas. Pode ser cultivada em meios bacteriológicos, os quais contêm nutrientes complexos, como a clara do ovo e os corantes. Estes inibem o crescimento de representantes da flora normal presentes em amostras de escarro.

É um organismo aeróbio obrigatório, por isso causa doenças, preferencialmente, em tecidos altamente oxigenados, como o lóbulo superior do pulmão e do fígado.

É resistente à desidratação, o que explica sua resistência ao catarro expectorado desidratado, o que contribui para a transmissão por aerossol (eliminação de partículas através da tosse, da fala ou de espirros, as quais permanecem no ar por horas). Ainda, é resistente a múltiplos antibióticos devido a mutações cromossômicas.

A transmissão ocorre de um indivíduo para outro por aerossóis respiratórios, e o local inicial da infecção é o pulmão. É um patógeno intracelular de macrófagos. O homem é o reservatório natural da *Mycobacterium tuberculosis*, nos animais não existe reservatório.

Nos Estados Unidos, a tuberculose é uma doença quase que exclusivamente humana; já nos países subdesenvolvidos, o *Mycobacterium bovis* também pode causar tuberculose em humanos. O *Mycobacterium bovis* é encontrado no leite da vaca

e, se não pasteurizado, pode causar tuberculose gastrointestinal nos homens, contudo a doença ocorre apenas em uma pequena proporção dos indivíduos infectados.

Mycobacterium tuberculosis não produz toxinas e não contém endotoxinas. As lesões dependem da presença do organismo e da resposta do hospedeiro, ocorrendo em dois diferentes tipos:

1. Lesões exsudativas, que são uma resposta inflamatória aguda e ocorrem, principalmente, nos pulmões.
2. Lesões granulomatosas, que consistem em uma área central de células gigantes com um tubérculo envolto por uma zona de células epiteliais.



Assimile

Tubérculo é um granuloma circundado por tecido fibroso, com uma necrose central, e cicatriza por fibrose e calcificação.

As lesões podem se disseminar pelo organismo de duas formas:

- Um tubérculo pode se desgastar, formando uma cavidade vazia do conteúdo caseoso (aspecto de queijo cremoso amarelado), que dissemina o microrganismo para outras partes dos pulmões, trato gastrointestinal (se engolido) e para outros indivíduos (se expectorado).
- Pela corrente sanguínea, para muitos órgãos internos. Essa disseminação pode ocorrer em um estágio precoce da doença se o sistema imune falhar em conter a infecção inicial, ou em estágio tardio, quando o sistema imune estiver imunodeprimido.

Os processos patológicos e inflamatórios se apresentam como enfraquecimento, febre, perda de peso, sudorese noturna, dor no peito, insuficiência respiratória, tosse e, em casos de rompimento de um vaso sanguíneo, a tuberculose pulmonar pode causar hemoptise (expectoração com presença de sangue).

Mycobacterium leprae

Responsável por causar a lepra ou doenças de Hansen, a hanseníase, a *Mycobacterium leprae* é um bacilo, medindo cerca

de 0,3 a 0,5 μm de diâmetro e 4,0 a 7,0 μm de comprimento. Cresce em temperatura em torno de 30 °C, o que justifica a preferência do microrganismo em infectar as áreas mais frias do corpo humano.

O microrganismo ainda não foi cultivado em laboratório, ou em meio artificial, ou em cultura de células, portanto o homem é o hospedeiro natural. É a única bactéria patogênica conhecida por invadir o sistema nervoso periférico, afetando, predominantemente, a pele, as vias aéreas superiores, o sistema nervoso periférico e os olhos.

A doença é infectocontagiosa e sua transmissão acontece pelo contato prolongado com pacientes com lepra lepromatosa, que dissemina grandes quantidades de *Mycobacterium leprae* nas secreções nasais e nas lesões cutâneas.

O microrganismo se replica dentro das células, no interior dos histiócitos, das células endoteliais e das células de Schwann dos nervos. A doença se apresenta de duas formas distintas: tuberculoide e lepromatosa, com formas intermediárias entre os dois extremos.

1. Lepra tuberculoide: a resposta imune celular do organismo limita seu crescimento. Caracteriza-se por lesões cutâneas e nervosas localizadas e limitadas com poucos bacilos e pelo desenvolvimento de uma vigorosa resposta celular, a qual confere proteção contra a doença e inviabiliza a disseminação do bacilo.
2. Lepra lepromatosa: apresenta-se com lesões generalizadas, muitos bacilos e fraca resposta celular do organismo. As lesões se encontram nas superfícies mais frias do corpo, como mucosa nasal e extremidades dos nervos periféricos (cotovelos, pulsos, joelhos e tornozelos).

O período de incubação da doença pode alcançar vários anos e se estabelece de forma gradual. Na lepra tuberculoide, aparecem lesões cutâneas hipopigmentadas, endurecimento superficial dos nervos e efeito anestésico nas lesões de pele. Já na lepra lepromatosa ocorrem lesões cutâneas nodulares múltiplas.

A aparência desfigurada da doença ocorre em virtude da anestesia da pele, a qual resulta em queimaduras e outros traumas;

da reabsorção dos ossos, que ocasiona a perda da forma do nariz e das pontas dos dedos; e da infiltração da pele e dos nervos, que causa endurecimento e enrugamento da pele.

***Mycobacterium* e técnicas de isolamento: abordagem laboratorial para isolamento e identificação**

A coloração de bacilos álcool-ácido resistentes de escarro, ou outras amostras, é o passo inicial na identificação. A coloração realizada com auramina (corante fluorescente) pode ser utilizada para visualizações por microscopia com fluorescência. Também pode ser realizado o cultivo em meios especiais, como ágar de Löwenstein-Jansen (por até oito semanas), desde que as amostras sejam previamente tratadas com cloreto de sódio.

O microrganismo não cresce em ágar sangue, já em meio BATEC o crescimento pode ser verificado pela produção de dióxido de carbono. É preferível o uso de meio líquido, uma vez que os microrganismos crescem mais rápido do que em meios sólidos. Havendo o crescimento do microrganismo em cultura, eles podem ser identificados nos testes bioquímicos.

Em virtude de alguns microrganismos possuírem resistência a alguns antibióticos (em especial, a isoniazida), o antibiograma deve ser utilizado, embora o crescimento seja muito lento. O ensaio de luciferase (ou luceferase) pode detectar os organismos resistentes em poucos dias, sendo, então, mais favorável.



Assimile

O ensaio de luciferase é capaz de detectar, em poucos dias, microrganismos resistentes a fármacos. "A luciferase é uma enzima isolada de vagalumes, que produz luz na presença de trifosfato de adenosina (ATP). Se o microrganismo isolado do paciente for resistente, ele não será danificado pelo fármaco (produzirá quantidade normal de ATP), e a luciferase produzirá quantidade normal de luz. Quando o organismo for sensível ao fármaco, haverá menor produção de ATP, bem como de luz " (LEVINSON; JAWETZ, 1998, p. 184).

Na lepra lepromatosa, os bacilos são identificados de forma fácil através da coloração de Ziehl-Nielsen de lesões cutâneas ou de secreções nasais. Já na forma tuberculoide, poucos organismos são observados e a presença de granulomas característicos já é suficiente para o diagnóstico.

Deteção e identificação de micobactérias

O PPD (teste de tuberculina), conhecido como teste de Mantoux, pode ser utilizado para identificar uma infecção que ocorreu há muito tempo ou uma mais recente. É a única forma de diagnosticar uma infecção latente em virtude da reação de hipersensibilidade do tipo tardia desenvolvida contra antígenos micobacterianos.

Este teste é realizado com a aplicação de uma injeção intradérmica de 0,1 ml de tuberculina na face anterior do antebraço. Se após 48 horas formar uma área endurecida de pelo menos 5 mm de diâmetro no local da injeção, o teste é considerado positivo. Contudo, pacientes que tomaram a vacina contra a tuberculose (BCG) também podem produzir essa reação, diminuindo a confiança no teste, uma vez que é crescente o número de crianças vacinadas ano após ano.

Desta forma, a técnica de baciloscopia ou esfregaço de escarro continua sendo um dos métodos mais rápidos para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis*.

Técnicas moleculares aplicadas à bacteriologia

Com o progresso, as técnicas moleculares permitiram o desenvolvimento de testes mais sensíveis e rápidos para a identificação das micobactérias. Hoje, temos muitas técnicas disponíveis no mercado que possuem sensibilidade e especificidade maior que 90%. Contudo, o elevado custo e a complexidade dessas técnicas restringem o uso a países desenvolvidos.

A ampliação *in vitro* das sequências do genoma do patógeno, a partir de técnicas específicas, como PCR, permite um diagnóstico rápido e eficaz, sobressaindo-se frente aos métodos tradicionais padrões anteriormente utilizados. Em apenas algumas horas, é possível identificar características clínicas importantes dos patógenos tanto diretamente nas amostras como em culturas precoces. Desta forma, o diagnóstico de tuberculose pode ser confirmado em

apenas um dia, o que, nas técnicas mais antigas, levava de um a dois meses.

A técnica de PCR e suas variações, como a *nested*-PCR, se destacam como técnicas moleculares promissoras para o diagnóstico rápido da tuberculose.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

É uma técnica de amplificação do DNA *in vitro*, capaz de fazer várias cópias do fragmento de DNA que pretende ser examinado e estudado.

O teste clona cópias de fragmento de DNA em um plasmídeo para, então, estudá-lo e realizar outros experimentos. A técnica de PCR consiste em avaliar este fragmento de DNA e verificar se ele está predisposto à doença.

Nos dias atuais, o teste é muito utilizado para a investigação de doenças hereditárias, teste de paternidade, investigação de microrganismos causadores de infecção, entre outros.

A técnica se inicia com a extração do DNA da célula (material genético), contudo o RNA também pode ser utilizado. Após a extração do material genético, adiciona-se dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) em uma solução tampão. Esta mistura é colocada em um aparelho específico, chamado termociclador, o qual aquecerá e resfriará o material em ciclos preestabelecidos, para que ocorra a desnaturação do DNA (separação das fitas) e, depois, a hibridação ou o anelamento, em que os *primers* irão se ligar especificamente às sequências complementares de DNA. A seguir, a temperatura se eleva novamente para que ocorra a síntese da polimerase, a extensão de uma nova molécula. Na sequência, inicia-se um novo ciclo. São realizados, em média, 25 a 40 ciclos por reação, apresentando grande relevância na taxa de replicação.

O resultado é analisado através de uma técnica de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.



Pesquise mais

Aprofunde seus conhecimentos sobre a técnica de PCR, seu histórico, sua padronização e aplicação, lendo o arquivo a seguir:

VIEIRA, Daniel Perez. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

A técnica é capaz de identificar todos os principais patógenos: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. pinnipedii*, contudo não é capaz de distingui-los, o que não é um problema, uma vez que as micobactérias compartilham perfis de sensibilidade semelhantes e, desta forma, a mesma conduta terapêutica.



Refleta

A técnica de PCR tem com diferencial o alto teor de sensibilidade, contudo esta sensibilidade também pode ser um grande problema, causando interferências e comprometendo o resultado.

Você já parou para pensar que existem boas práticas que devem ser adotadas pelos laboratórios, a fim de minimizar as interferências e aumentar o grau de confiabilidade dos resultados emitidos?

Saiba mais lendo:

LABORATÓRIOS DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA. **Guia de boas práticas laboratoriais**. São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.limhc.fm.usp.br/portal/wp-content/uploads/2015/11/Manual_Guia_de_Boas_Praticas.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2018.

BOROVÍK, Cleide Largman et al. **Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana**. [s.d.]. Disponível em: <<https://www2.ib.unicamp.br/caeb/Eduardo%20Becker/art%2016.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

O diagnóstico da lepra, ou hanseníase, é clínico e depende dos sinais da doença evidenciados na pele do paciente, desta forma, só é possível quando ela já está evoluída. A Organização Mundial de Saúde estabeleceu alguns critérios para o diagnóstico, como manchas na pele, perda de sensibilidade, entre outros. Contudo, conforme o estágio da doença em que o paciente se encontra, nem sempre o diagnóstico é eficaz, pois, muitas vezes, esses sintomas visíveis ainda não se manifestaram.



Exemplificando

Veja os principais sinais clínicos da doença lendo o *Guia para controle da hanseníase*, do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_hanseniasse_cab10.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2017.

Desta forma, a sorologia e a reação de cadeia de polimerase (PCR) são utilizadas para o diagnóstico. A maior vantagem da PCR sobre outros métodos diagnósticos assenta-se na sua rápida, específica e sensível identificação do microrganismo, que pode ser feita analisando amostras biológicas brutas. Isto é muito importante quando tratamos de microrganismos, cuja cultura é difícil, como o *M. leprae* (KANG et al., 2003).

Desde a sua descoberta, em 1993, até os dias atuais, a técnica vem sendo aprimorada, sendo a mais atual a qPCR ou PCR em tempo real.



Exemplificando

Observe a linha do tempo dos principais acontecimentos e a da evolução dessa técnica:

1983 – Concepção da PCR

Em uma das mais significantes descobertas do século XX, o cientista Ph.D. Kary Mullis, da extinta Cetus Corporation, desenvolve a reação em cadeia da polimerase, ou PCR, um processo que replica um pedaço de DNA milhões de vezes.

1985 – Revolucionando a ciência

No primeiro debate público sobre PCR, os cientistas da Cetus apresentam aos colegas da Sociedade Americana de Genética Humana. Os resultados são publicados no periódico *Science* posteriormente. A apresentação representou o começo da revolução da PCR e um melhor entendimento dos nossos genes.

1986 – Taq polimerase

O cientista da Cetus, David Gelfand, descobre que a Taq polimerase, uma enzima isolada de *Thermus aquaticus*, uma bactéria encontrada

em águas quentes, é capaz de resistir às altas temperaturas necessárias para a PCR.

1987

O órgão de patentes dos Estados Unidos concede à Cetus Corporation a primeira patente dos EUA para PCR. Outra empresa de biotecnologia, PerkinElmer, lança o primeiro termociclador automatizado, permitindo a automação do aquecimento e esfriamento durante o processo da PCR.

1989 – Focando no diagnóstico

Roche e Cetus concordam em desenvolver aplicações diagnósticas para a PCR. É o começo de uma nova era do diagnóstico molecular.

1990 – Resolvendo crimes

O primeiro kit de PCR forense, desenvolvido pela Cetus e vendido pela PerkinElmer, torna-se útil para a identificação humana individual. O DNA usado como evidência torna-se um poderoso aliado do sistema judiciário.

1991 – Criando a Roche Molecular Diagnostics

Roche compra os direitos da PCR e cria a Roche Molecular Diagnostics para desenvolver testes diagnósticos baseados na PCR. No mesmo ano, um cientista da Cetus publica o método de teste TaqMan, marcando o começo da PCR em tempo real.

1992 – Primeiro teste diagnóstico

O primeiro teste baseado em PCR para *Chlamidia trachomatis* e HIV-1 começam a ser vendidos. São os primeiros no mundo.

1993 – Nobel

10 anos depois, Kary B. Mullis é premiado com o Nobel de Química por sua invenção, a PCR.

1994 – Detectando retrovírus

Roche recebe a patente para a transcriptase reversa termoestável, permitindo que a PCR copie e detecte RNA, importante na detecção de vírus, como o HIV e HCV.

1996 – Medicina personalizada

É aprovado pela FDA o *AMPLICOR HIV-1 MONITOR*, teste para determinar a carga viral de pessoas com AIDS. Esse é o primeiro teste de diagnóstico da “medicina personalizada”.

2003 – Resultados em tempo real

Roche lança o primeiro instrumento de PCR em tempo real para amplificação e detecção do DNA amplificado.

2005 – Prevendo resposta aos medicamentos

FDA comprova o *AmpliChip CYP450*, teste para a análise do gene CYP2C19. Os resultados preveem como uma pessoa pode responder a certos medicamentos.

2007 – Melhorando a automação

São desenvolvidas técnicas, aprovadas pela FDA, com automação do começo ao fim. Os aparelhos *COBAS AmpliPrep* e *COBAS TaqMan* preparam as amostras e completam a amplificação e detecção, respectivamente.

2011 – Teste para o HPV de alto risco

FDA aprova o teste de genotipagem do HPV, para detectar os genótipos de alto risco, como o HPV 16 e 18.

Hoje – Indo em direção à medicina personalizada

Com todo esse avanço, muitas doenças, atualmente, podem ser detectadas e tratadas precocemente. Os rumos desses avanços levam à medicina personalizada, visto que cada pessoa reage de uma maneira diferente a um tratamento, por isso, escolher o melhor pode ser eficaz na cura e melhora da qualidade de vida das pessoas.

Fonte: CÂMARA, Brunno. **A evolução da PCR**. 2013. Disponível em: <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/12/aevolucao-da-pcr.html>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

A qPCR ou PCR em tempo real é uma variação da técnica de PCR, com a vantagem de permitir que as etapas de amplificação e detecção ocorram ao mesmo tempo. Desta forma, o resultado é

observado em tempo real, durante a amplificação da fita analisada. A técnica possibilita, ainda, resultados quantitativos mais precisos que a técnica de PCR convencional, o que a torna mais viável.



Pesquise mais

Os avanços das técnicas moleculares não param por aí. O Instituto Oswaldo Cruz divulgou recentemente que já possui um protótipo para um teste rápido de diagnóstico precoce da hanseníase, o qual está em fase de validação e registro, conforme reportagem da agência EBC Brasil: TESTE para diagnóstico precoce da hanseníase deve ficar pronto em dois anos. 2017. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/vida/noticia/2017/05/teste-para-diagnostico-precoceda-hanseniasi-deve-ficar-pronto-em-dois-anos-9804404.html>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

Sem medo de errar

Caro aluno, agora que você aprofundou um pouco mais seu conhecimento sobre a bacteriologia clínica, poderá auxiliar Rafael na explicação do motivo do surto e nas orientações que o aluno deverá fazer às autoridades locais, a fim de minimizar os sintomas dos pacientes e evitar novas contaminações. Ajude Rafael a explicar às autoridades os principais cuidados a serem tomados.

Rafael deverá orientar as autoridades locais para implementarem ações integradas de melhorias com outros setores, como o de saneamento básico e obras, a fim de evitar que roedores se proliferem, e também com o setor de educação, para auxiliar no esclarecimento da população. O aluno, ainda, deverá ressaltar a responsabilidade que a Secretaria de Saúde tem em tratar os doentes e notificar os casos confirmados e, se o município não tiver condições, deve solicitar auxílio ao Estado.

Além desses cuidados, é importante o fornecimento de medicação à população, para o tratamento dos sintomas, e a distribuição de hipoclorito de sódio, para o tratamento da água. Para finalizar, o município deve distribuir água mineral à população, para que se evite o consumo de água contaminada.

Avançando na prática

Surto de tuberculose – prevenção

Descrição da situação-problema

A Organização Mundial de Saúde divulgou, em 2016, que a epidemia de tuberculose era grave, afetando mais de 10 milhões de pessoas em países como Índia e África do Sul. Quais são as medidas que as pessoas devem tomar para evitar ainda mais a proliferação da doença?

Resolução da situação-problema

- Vacina BCG.
- Prevenção secundária com isoniazida. Vale ressaltar que essa prevenção é recomendada apenas para as pessoas que possuem convívio com os doentes (casa ou trabalho).
- Tratamento correto, o qual deve ser realizado até o final, entre 6 e 9 meses. Um dos maiores problemas é em virtude do abandono do tratamento. Como este é longo, quando os pacientes sentem melhoras, o abandonam antes do fim, aumentando a resistência bacteriana.
- Pasteurização do leite e eliminação do gado infectado (para evitar a tuberculose intestinal).
- Divulgar os problemas causados pela doença à população e esclarecer as dúvidas relacionadas.

Faça valer a pena

1. As micobactérias são bacilos aeróbios, coradas fracamente pela técnica de coloração de gram e as únicas bactérias álcool-ácidos resistentes (capacidade do organismo de reter o corante carbolfucsina).

Sobre as micobactérias, é correto afirmar:

- a) A álcool-ácido resistência das micobactérias é em virtude da baixa concentração de lipídios presente na parede celular.
- b) Não possuem flagelos, não formam esporos, não produzem toxinas e possuem cápsulas.
- c) São microrganismos extracelulares que infectam e se proliferam no interior de macrófagos.
- d) O gênero possui cerca de 60 espécies conhecidas e todas são patogênicas ao homem.
- e) Os principais patógenos são o *Mycobacterium tuberculosis*, agente responsável por causar tuberculose, e o *Mycobacterium leprae*, agente causador da lepra. Entre as espécies do gênero, a *Mycobacterium leprae* é a única que até o momento não pode ser cultivada em ambiente laboratorial.

2. A tuberculose é uma doença muito conhecida. É infectocontagiosa e causada por algumas micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, incluindo *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e, principalmente, *Mycobacterium tuberculosis*.

Sobre a tuberculose, é correto afirmar:

- a) O *Mycobacterium tuberculosis* é um organismo anaeróbico obrigatório, por isso causa doenças, preferencialmente, em tecidos altamente oxigenados, como o lóbulo superior do pulmão e do fígado.
- b) O *Mycobacterium tuberculosis* não é resistente à desidratação.
- c) O *Mycobacterium tuberculosis* é sensível a múltiplos antibióticos, devido a mutações cromossômicas.
- d) A transmissão do *Mycobacterium tuberculosis* ocorre de um indivíduo para outro por aerossóis respiratórios, e o local inicial da infecção é o pulmão. É um patógeno intracelular de macrófagos.
- e) A transmissão da doença ocorre, principalmente, através de partículas infectantes expelidas através da tosse, espirros ou perdigotos, os quais permanecem no ar por poucos minutos, não sendo, então, uma doença altamente contagiosa.

3. O *Mycobacterium leprae*, um bacilo que mede cerca de 0,3 a 0,5 μm de diâmetro e 4,0 a 7,0 μm de comprimento, é o responsável por causar a lepra ou doenças de Hansen, hanseníase. Ele cresce em temperatura em torno de 30 °C, o que justifica a preferência do microrganismo em infectar as áreas mais frias do corpo humano.

Sobre a lepra ou hanseníase, é correto afirmar:

- a) O microrganismo responsável por causar a doença (*Mycobacterium leprae*) foi recentemente cultivado em laboratório.
- b) O homem e o animal são os hospedeiros naturais. É a única bactéria patogênica conhecida por invadir o sistema nervoso periférico.
- c) Afeta predominantemente a pele, as vias aéreas inferiores, o sistema nervoso central e os olhos.
- d) O PPD (teste de tuberculina) pode ser utilizado para identificar uma infecção que ocorreu há muito tempo e até uma mais recente. É a única forma de diagnosticar uma infecção latente em virtude da reação de hipersensibilidade do tipo tardia desenvolvida contra antígenos micobacterianos.
- e) A doença não é infectocontagiosa e sua transmissão acontece pelo contato prolongado com pacientes com lepra lepromatosa, que dissemina grandes quantidades de *Mycobacterium leprae* nas secreções nasais e nas lesões cutâneas.

Seção 4.3

***Corynebacterium diphtheriae* e *Clamidia* sp**

Diálogo aberto

Caro aluno, dando início aos estudos sobre *Corynebacterium diphtheriae* e *Clamidia* sp, vamos retomar o caso de Rafael, o estudante de Medicina que se preparou para ministrar uma palestra sobre leptospirose, levantou os dados locais e orientou as autoridades do município para conterem o surto da doença.

No dia da palestra, Rafael foi à praça da pequena cidade para falar com os moradores locais. Ele estava tranquilo, pois havia se preparado muito bem. Fez as orientações à comunidade e abriu espaço para perguntas.

Um dos moradores locais perguntou ao estudante porque ele tinha adquirido a doença, já que não era pescador e não havia entrado em contato com a água da enchente.

Ajude Rafael a explicar o questionamento ao morador local.

Não pode faltar

Características gerais

As corinebactérias são bastonetes gram-positivos, com formato semelhante ao de um taco de beisebol. Suas células são organizadas formando um "V" ou "L". Os bastonetes possuem aparência semelhante a pérolas, que consistem em grânulos de polifosfatos muito polimerizados (mecanismos de ligações de fosfato de alta energia). Seus grânulos possuem um corante que cora as células em azul e os grânulos de vermelho, o que é denominado de grânulos metacromáticos.

O *Corynebacterium diphtheriae* causa difteria, e as outras espécies de *Corynebacterium* estão relacionadas com infecções oportunistas. É anaeróbio facultativo e pode ser cultivado em diferentes meios de cultura, até nos seletivos.

Os humanos são os únicos hospedeiros naturais da bactéria, que habita o trato respiratório superior e é transmitida através do ar. A bactéria também pode infectar a pele, em áreas lesionadas, especialmente em pessoas com higiene precária. Nos dias atuais, a doença é bem controlada nos países que praticam regularmente a vacinação, contudo, nos países onde isso não ocorre (campanhas de vacinação irregulares), houve o reaparecimento da doença.



Exemplificando

Figura 4.1 | *Corynebacterium diphtheriae*



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/06/Corynebacterium_diphtheriae_Gram_stain.jpg>. Acesso em: 19 dez. 2017.

Família Chlamydiaceae está entre os patógenos mais frequentes no ser humano e é associada a várias infecções, como uretrite, pneumonia, linfogranuloma venéreo, tracoma e psitacose.

As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias (não crescem em meios intracelulares) que perderam a capacidade de produzir energia (ATP) para crescerem de forma independente, desta forma, só podem crescer dentro de células hospedeiras. São imóveis, gram negativas e possuem parede celular rígida, contudo não possuem peptidoglicano. Sua parede celular é muito semelhante às bactérias gram negativas, porém não possuem ácido murâmico.

As clamídias possuem um ciclo de replicação diferente de outras bactérias, o qual se inicia quando o corpo elementar, extracelular, inerte, semelhante a um esporo, penetra na célula e se reorganiza em um corpo reticulado, sendo maior e metabolicamente ativo. No interior da célula, o sítio de replicação se apresenta com um corpo de inclusão, podendo ser corado e visualizado em microscopia óptica. Essas inclusões são muito importantes, pois auxiliam no diagnóstico destes microrganismos em laboratório.

Patogenia e manifestações clínicas

O bacilo *Corynebacterium diphtheriae* pode causar infecções em vários locais, como pele, laringe e órgãos genitais, porém a forma mais importante da difteria é a faríngea, adquirida pela inalação de aerossóis de indivíduos doentes ou portadores do bacilo. Após a inalação dos bacilos diftéricos, eles se fixam na mucosa faríngea, proliferam-se e produzem a toxina diftérica. A toxina produzida pode atuar no local ou a distância, após alcançar a corrente sanguínea. Na atuação local, ocorre a formação de uma membrana acinzentada, composta por fibrina, bactérias e células inflamatórias, as quais podem se estender para a laringe, a traqueia e até os pulmões. Outros aspectos não específicos são febre, dor de garganta e adenopatia cervical (inflamação dos gânglios linfáticos). Quando atuam a distância, as toxinas podem causar lesões no coração, rins e nos nervos. Os bacilos que não produzem toxinas podem colonizar a garganta e causar uma faringite insignificante, sem maiores consequências. Desta forma, a difteria é uma doença toxigênica, embora dependa de um processo infeccioso inicial para se manifestar.

A imunidade da doença é verificada por anticorpos adquiridos após uma infecção ou em indivíduos vacinados.

As clamídias infectam, basicamente, as células epiteliais das membranas mucosas dos pulmões.

Chlamydia psittaci infecta pássaros e mamíferos, e os humanos são infectados através da inalação dos organismos das fezes secas de pássaros. Nos humanos, ela infecta, especialmente, os pulmões, e sua infecção pode ser assintomática ou pode produzir febre alta e pneumonia. A psitacose humana, normalmente, não é transmissível.

Chlamydia pneumoniae causa infecções no trato respiratório superior e inferior em adultos jovens. A bactéria infecta apenas os humanos e é transmitida de um indivíduo para outro por aerossol.

Chlamydia trachomatis infecta apenas os humanos e, normalmente, é transmitida através do contato pessoal (sexualmente ou durante o nascimento). No tracoma, a bactéria é transmitida pelo contato dos dedos nos olhos ou por fômites. Apresenta-se em mais de 15 imunotipos (A-L). Os tipos A, B e C causam tracoma (conjuntivite crônica endêmica na Ásia e na África). A doença pode se reincidir por muitos anos, levando à cegueira, mas não causa doença sistêmica. Os tipos D-K causam infecção do trato genital, geralmente transmitida para os olhos ou para o trato respiratório. Esses tipos são, provavelmente, a causa mais comum da doença sexualmente transmitida, sendo, nos homens, a causa mais comum de uretrite não gonocócica, e nas mulheres, podem se desenvolver para cervicite. As crianças nascidas de mães infectadas, frequentemente, desenvolvem infecção mucopurulenta nos olhos, que é a conjuntivite neonatal, a qual ocorre de sete a doze dias após o nascimento, e algumas ainda podem desenvolver pneumonite clamidiana de duas a doze semanas após o nascimento.



Assimile

Um fômite é qualquer objeto inanimado ou substância capaz de absorver, reter e transportar organismos contagiantes ou infecciosos de um indivíduo a outro.

Qualquer partícula capaz de transportar germes patogênicos.

Os imunotipos L1-L3 causam linfogranuloma venéreo, que é uma doença sexualmente transmitida, com lesões na genitália e nos linfonodos.

As infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* levam à formação de anticorpos e suas reações são mediadas por células.

Diagnóstico e características diferenciais

Corynebacterium diphtheriae

O diagnóstico bacteriológico é realizado pelo isolamento do microrganismo e, na sequência, sua identificação. Também, são

utilizados esfregaços corados com gram ou azul de metileno para exames bacterioscópicos, contudo estes fornecem apenas algumas informações que não possuem valor significativo para o diagnóstico final.

O diagnóstico laboratorial envolve, ainda, a demonstração de produção de toxina. Para isolar o bacilo diftérico, as secreções devem ser semeadas em ágar sangue ou ágar chocolate, contendo telurito de sódio. O telurito não interfere no crescimento do bacilo e inibe o crescimento da microbiota normal, o que torna mais fácil o isolamento do bacilo. Nos meios com telurito, o bacilo reage, formando colônias escuras. Mesmo sendo praticamente obrigatório o uso de meios com telurito para o diagnóstico, outros meios também podem ser usados simultaneamente. Um dos mais comuns é o meio de Loeffler (peptona, glicose, sais e soro de cavalo), no qual os bacilos se proliferam de forma mais rápida do que as outras bactérias, podendo ser observadas suas características morfológicas após 12 horas de incubação em microscopia óptica.

A identificação do bacilo é realizada através de testes bioquímicos, os quais, em conjunto com as características das colônias observadas, permitem sua diferenciação e de outras espécies de *Corynebacterium*.

Para a identificação definitiva, faz-se necessário incluir a pesquisa da toxina diftérica ou do gene *tox*, que pode ser realizada através de testes imunológicos. Uma alternativa muito vantajosa e satisfatória é a amplificação do gene *tox* por PCR.

Os métodos moleculares se mostraram mais vantajosos do que os de biotipagem para a diferenciação e o rastreamento das amostras.

Clamídias

As clamídias formam inclusões citoplasmáticas que podem ser visualizadas com auxílio de corantes especiais, como o Giemsa, ou por imunofluorescência.

Nos exsudatos, o organismo pode ser identificado no interior das células epiteliais através de coloração com anticorpos fluorescentes, ELISA, ou por hibridização com uma sonda de DNA.



Exsudato é um fluido inflamatório extravascular que possui alta concentração de proteínas e fragmentos celulares, o que implica alteração significativa na permeabilidade normal dos pequenos vasos sanguíneos na área danificada.

Processo pelo qual alguns dos constituintes do sangue passam lentamente através das paredes dos pequenos vasos congestionados para os espaços ou tecidos vizinhos, durante a inflamação.

Você sabia que o exsudato é um auxiliar da cicatrização, uma vez que evita o ressecamento do leito das feridas, auxilia na migração das células que participam do processo de regeneração dos tecidos, aporta nutrientes essenciais para o metabolismo celular, contribui para a difusão de fatores de crescimento e imunitários e participa do desbridamento autolítico?

As clamídias podem crescer em culturas de células tratadas com ciclo-heximida, que inibe a síntese da proteína da célula hospedeira, mas não a da bactéria, aumentando, assim, sua replicação. Em cultura, *Chlamydia trachomatis* forma inclusões que contêm glicogênio; já a *Chlamydia psittaci* e a *Chlamydia pneumoniae* formam inclusões sem glicogênio. As inclusões com glicogênio podem ser visualizadas através de colorações com iodo. Os antígenos clamidianos podem ser detectados nos exsudatos por ELISA.

Os testes sorológicos são úteis para o diagnóstico de infecções por *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pneumoniae* e, em casos muito raros, para *Chlamydia trachomatis*, já que, como a frequência da infecção é tão alta, muitos indivíduos já possuem anticorpos contra o organismo.

Características diferenciais de espécies do gênero

Febre do papagaio

A psitacose, também conhecida como febre do papagaio, é uma pneumonia rara causada por uma espécie de Clamídia, a *Chlamydia psittaci*, a qual é uma bactéria encontrada, principalmente, em aves, como papagaio, periquito, arara, entre outras.

A transmissão ocorre quando o pó das penas ou as fezes das aves infectadas é inalado, ou através de picada de uma ave infectada, mas raramente a transmissão se dá de uma pessoa para outra através de perdigotos.

O período de incubação da doença é de 2 a 4 semanas e, após esse período, o indivíduo infectado apresenta febre, arrepios, cefaleia, cansaço, perda de apetite e, por fim, os sinais e sintomas de infecção pulmonar com acessos de tosse, que é, inicialmente, uma tosse seca e, aos poucos, torna-se produtiva, com expectoração mucosa ou sanguinolenta, dificuldade em respirar e falta de ar.

Se o tratamento for feito de forma adequada e rápida, a infecção desaparece em algumas semanas. Caso o tratamento não seja realizado de forma adequada, os sintomas persistirão, evoluindo para um quadro típico de pneumonia com complicações graves ao coração, ao fígado, ao baço, às glândulas suprarrenais ou aos outros órgãos.

A psitacose é a principal doença ocupacional de quem trabalha com criações aviárias ou com animais domésticos. Além disso, pessoas que trabalham em lojas de animais ou possuem uma ave em casa, como o papagaio, também podem ser infectadas com a doença.

O tratamento é realizado com a administração de doxiciclina, em adultos, e eritromicina, em crianças. Para as aves, é administrado tetraciclina. A psitacose em humanos é controlada pela restrição à importação de pássaros psitacídeos, pelo tratamento das aves doentes e pela adição de tetraciclina ao alimento dos pássaros. As criações domésticas de perus e patos devem ser inspecionadas para verificar a presença de *Chlamydia psittaci*.

O gênero *Corynebacterium* compreende mais de 30 espécies, e estas, quando não identificadas completamente, são classificadas como difteroides. As espécies associadas ao homem pertencem à microbiota normal da pele e às mucosas e raramente causam infecções. Quando ocorrem, as infecções são em virtude de manipulação médica dos pacientes.

Outras patologias por bacilos gram-positivos

Existem outros bacilos gram-positivos de importância médica:

Bacillus, *Clostridium* (formadores de esporos) e *Listeria* (não formador de esporo).

Bacillus

Existem duas espécies de *Baccillus* de importância médica: *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*.

O *Bacillus anthracis* causa antrax, doença comum nos animais e mais rara nos homens. Os esporos do microrganismo permanecem no solo por muito tempo (vários anos) e os homens são contaminados pelos esporos presentes em produtos animais, como pele, pelo e lã, ou pelo contato com animais doentes. As portas de entrada da contaminação são a pele, as mucosas e o trato respiratório. O bacilo invade o hospedeiro e produz a toxina do antrax. A lesão típica é uma úlcera não dolorosa, com uma cicatriz necrótica escura e, se não houver tratamento, progride para a bacteremia e pode causar a morte.

O *Bacillus cereus* causa intoxicação alimentar. Seus esporos estão presentes em grãos, como arroz, e sobrevivem ao vapor e a frituras rápidas. Os esporos germinam quando o arroz é mantido morno (requeentado), e a porta de entrada é o trato gastrointestinal. O bacilo pode causar duas síndromes, sendo uma com um período de incubação curto, causando náuseas e vômitos, e a outra, com um período de incubação longo, causando diarreia.

Clostridium

Existem quatro espécies de importância médica: *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*.

Clostridium tetani causa o tétano. Seus esporos estão espalhados no solo e a contaminação se dá através de um ferimento (como quando um prego perfura o pé). Os sintomas são fortes espasmos musculares, trismos e riso sardônico (em virtude da contração rígida dos músculos da mandíbula que impedem a abertura da boca). O colapso respiratório é seguido de morte.

Clostridium botulinum causa o botulismo. Os esporos espalhados no solo contaminam os vegetais e a carne. Esses alimentos, quando enlatados ou embalados a vácuo sem a devida

esterilização, permitem que os esporos sobrevivam e germinem no ambiente anaeróbico. A toxina é produzida no interior dos enlatados, contudo pode ser inativada por fervura durante vários minutos, já que o microrganismo é termolábil. Os sintomas da doença são fraqueza e paralisia, ocorrendo duas manifestações clínicas: ferimento botulínico (microrganismo cresce em um ferimento contaminado, germina e produz a toxina no local) e botulismo infantil (microrganismo cresce nos intestinos e produz a toxina).

Clostridium perfringens causa gangrena gasosa e intoxicação alimentar. A transmissão se dá através dos esporos localizados no solo. A gangrena gasosa está associada a ferimentos de guerra, acidentes de automóveis e septicemia por abortos. As células vegetativas são membros da flora normal do cólon e da vagina. Os microrganismos crescem em tecidos traumatizados e produzem várias toxinas, as quais danificam as membranas celulares, provocando hemólise. As enzimas degradativas produzem gás nos tecidos. Os principais sintomas são dor, edema e infecções celulares na região do ferimento, e pode levar à morte.

Nos casos de intoxicação alimentar, os esporos localizados no solo e nos alimentos são resistentes ao calor, portanto, sobrevivem ao cozimento e germinam, formando uma enterotoxina. A manifestação da doença se dá através de diarreia aquosa, com contrações e pouco vômito, e os sintomas desaparecem em 24 horas.

Clostridium difficile causa colite pseudomembranosa associada ao uso de antibióticos. O microrganismo está presente na flora normal do trato gastrointestinal e é transmitido através da rota fecal oral. A doença causa diarreia.



Pesquise mais

Saiba mais sobre as frequentes causas de diarreia hospitalar, causada pela bactéria *Clostridium difficile*, lendo o artigo a seguir: SILVA Júnior, M. Recentes mudanças da infecção por *Clostridium difficile*. **Einstein**, São Paulo, v. 10, n. 1, ano 23, p. 105-109, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/eins/v10n1/pt_v10n1a23.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2017.

Listeria

Listeria monocytogenes causa meningite e septicemia em recém-nascidos e em adultos imunodeprimidos. As infecções

causadas pelo bacilo ocorrem de duas formas: no feto ou em recém-nascidos, como resultado de transmissão através da placenta ou durante o parto, e em adultos imunodeprimidos, principalmente em pacientes de transplante renal. A transmissão se dá através do contato com os animais ou pelas fezes, por leite não pasteurizado ou por vegetais contaminados, uma vez que o microrganismo é amplamente distribuído em animais, plantas e no solo. Infecções durante a gravidez podem levar ao aborto, ao parto prematuro ou à septicemia durante o parto. Bebês infectados durante o parto poderão desenvolver meningite aguda. Infecções por *Listeria monocytogenes* em adultos imunodeprimidos pode ocasionar septicemia ou meningite.

Sem medo de errar

Caro aluno, agora que você aprofundou ainda mais seus estudos sobre bactérias fastidiosas, poderá auxiliar Rafael a explicar a dúvida do morador local.

Como aquele morador, que não era pescador e não entrou em contato com a água da enchente, pode ter adquirido a leptospirose?

Provavelmente, a contaminação se deu pela ingestão de água ou alimentos contaminados por dejetos da cheia, uma vez que a cidade ficou isolada devido à subida do rio e, desta forma, os moradores ficaram sem acesso à água mineral ou água tratada (clorada).

Rafael deve informar à população que evite o consumo de água das comunidades locais, que esta não seja ingerida até que se detecte a causa do surto. As pessoas devem apenas ingerir água mineral, a qual será oferecida pela prefeitura até que o surto seja controlado. Os moradores podem, ainda, fazer uso de água fervida.

Avançando na prática

Principais doenças relacionadas a enchentes

Descrição da situação-problema

Além da leptospirose, Rafael poderia também alertar a população sobre o risco de outras doenças relacionadas a enchentes.

Indique as principais doenças que ele deveria citar, como se dá a transmissão delas e qual delas é causada por bactéria.

Resolução da situação-problema

Principais doenças: hepatites A e E, febre tifoide, cólera e dengue.

Hepatites A e E: a contaminação se dá por águas e alimentos contaminados, ou de uma pessoa para outra. A infecção é causada pelo vírus da hepatite.

Febre tifoide: a transmissão ocorre por água e alimentos contaminados, ou pelo contato com pessoas doentes. A doença é causada pela bactéria *Salmonella typhi*.

Cólera: a transmissão se dá por água e alimentos contaminados. A responsável por causar a doença é a bactéria *Vibrio cholerae*.

Dengue: a transmissão se dá pela picada do mosquito *Aedes aegypti* (fêmea). O responsável por causar a doença é o vírus da dengue dos tipos 1, 2, 3 e 4.

Faça valer a pena

1. As corinebactérias são bastonetes gram-positivos, com formato semelhante ao de um taco de beisebol. Suas células são organizadas formando um "V" ou "L". Os bastonetes possuem aparência semelhante a pérolas, que consistem em grânulos de polifosfatos muito polimerizados (mecanismos de ligações de fosfato de alta energia).

Com relação às espécies de *Corynebacterium*, é correto afirmar:

- a) O *Corynebacterium diphtheriae* causa disenteria, e as outras espécies de *Corynebacterium* estão relacionadas com infecções oportunistas.
- b) O *Corynebacterium diphtheriae* é anaeróbio facultativo e pode ser cultivado em diferentes meios de cultura, exceto nos seletivos.
- c) Os humanos são os únicos hospedeiros naturais da bactéria, a qual habita o trato respiratório superior e é transmitida pelo ar.
- d) A bactéria também pode infectar a pele, em áreas saudáveis, especialmente em pessoas com higiene precária.

e) Até o momento, não existe vacina para controle da doença causada pela bactéria.

2. A família *Chlamydiaceae* (clamídias) está entre os patógenos mais frequentes no ser humano e é associada a várias infecções, como uretrite, pneumonia, linfogranuloma venéreo, tracoma, psitacose, entre outras. São imóveis e gram negativas.

Sobre as clamídias, é correto afirmar:

- a) As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias (não crescem em meios intracelulares), contudo mantêm sua capacidade de produzir energia (ATP).
- b) Possuem parede celular rígida e uma espessa camada de peptidoglicano.
- c) Sua parede celular é muito semelhante às bactérias gram positivas, porém não possuem ácido murâmico.
- d) As clamídias possuem um ciclo de replicação diferente de outras bactérias, o qual se inicia quando o corpo elementar, extracelular, inerte, semelhante a um esporo, penetra na célula e se reorganiza em um corpo reticulado, sendo maior e metabolicamente ativo.
- e) No processo de replicação, no interior da célula, o sítio de replicação se apresenta com um corpo de inclusão, podendo ser corado e visualizado em microscopia eletrônica.

3. Existem outros bacilos gram-positivos, de importância médica que causam patologias: *Bacillus*, *Clostridium* (formadores de esporos) e *Listeria* (não formador de esporo).

Existem duas espécies de *Bacillus* de importância médica: *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*.

Com relação a outras patologias causadas por bacilos gram-positivos, é correto afirmar:

- a) O *Bacillus anthracis* causa antrax, doença comum nos homens e mais rara nos animais.
- b) O *Bacillus cereus* causa intoxicação medicamentosa.
- c) Existem quatro espécies de *Clostridium* de importância médica: *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*.
- d) *Clostridium tetani* causa o tétano; *Clostridium botulinum* causa o botulismo; *Clostridium perfringens* causa gangrena gasosa e intoxicação

alimentar; e *Clostridium difficile* causa colite pseudomembranosa associada ao uso de anti-inflamatórios.

e) *Listeria Monocytogenes* causa meningite e septicemia em idosos imunodeprimidos.

Referências

- ANGIOLOGIA ONLINE. O exsudato das feridas. 2017. Disponível em: <<https://www.angiologiaonline.com/exsudato>>. Acesso em: 20 dez. 2017.
- ATLAS DA SAÚDE. Psitacose. 2014. Disponível em: <<http://www.atlasdasaude.pt/publico/content/psitacose>>. Acesso em: 20 dez. 2017.
- BERALDO, Augusto. **Manual de Exames**. São Paulo: Laboratório Fleury S/c Ltda., 1996. 402p.
- BIOCLIN. **VDRL**: pronto para uso – K045. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.bioclin.com.br/produtos/vdrl/>>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- CÂMARA, Brunno. **VDRL X FTA-ABS**. 2012. Disponível em: <<http://www.biomedicinapadiao.com.br/2012/07/vdrl-x-fta-abs.html>>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- DIAGNÓSTICO da Sífilis. [s.d.]. Disponível em: <<https://bit.ly/2JcBruM>>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- DIFERENÇA entre imunoperoxidase e imunofluorescência. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.dicionarioinformal.com.br/diferenca-entre/imunoperoxidase/imunofluoresc%C3%Aancia/>>. Acesso em: 11 abr. 2018.
- EDUCACIONAL. **Doenças relacionadas às enchentes**. 2017. Disponível em: <<http://www.educacional.com.br/reportagens/enchentes/doencas.asp>>. Acesso em: 20 dez. 2017.
- FRANCO, Amanda. Mais de 30 casos de tuberculose são notificados em 2017 em Petrolina, PE. 2017. Disponível em: <<http://g1.globo.com/pe/petrolina-regiao/noticia/2017/03/mais-de-30-casos-de-tuberculose-sao-notificados-em-2017-em-petrolina-pe.html>>. Acesso em: 15 dez. 2017.
- INTERLAB. Imunofluor FTA/Abs. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/659932384480f3d2f6eb9c.pdf>>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- KASVI. Boas Práticas em PCR (Reação em cadeia da polimerase) 2017. Disponível em: <<http://www.kasvi.com.br/boas-praticas-em-pcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase/>>. Acesso em: 14 dez. 2017.
- KANG, T. J. et al. Comparision of two diferente amplification products in the diagnosisog Mycobacterium leprae. **Clinical and Experimental Dermatology**, on-line, n. 28, p. 420-424, 2003.
- LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 415p.
- MACULOPAPULAR, o que é maculopapular, sintomas e aparência, causas, opções de tratamento, disclaimer. [s.d.]. Disponível em: <<http://sulla-salute.com/saude/cuidados-com-a-pele/maculopapular.php>>. Acesso em: 7 dez. 2017.
- MARTINS, F. S. V.; CASTIÑEIRAS, T. M. P. Leptospirose. 2009. Disponível em: <<http://www.cives.ufrj.br/informacao/leptospirose/lep-iv.html>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

MINUTO Biomedicina. Exame para diagnóstico da tuberculose. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.minutobiomedicina.com.br/postagens/2014/06/17/exames-para-diagnostico-da-tuberculose/>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

PINHEIRO, Pedro. **Sífilis**: sintomas, VDRL e tratamento. 2018. Disponível em: <<https://www.mdsaude.com/2009/01/dst-sifilis.html>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

PSITACOSE. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/doencas/psitacose/>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

REAÇÃO em cadeia da Polimerase. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/genetica/reacao-em-cadeia-da-polimerase/>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

Rondônia. Agência Estadual de Vigilância em Saúde. Leptospirose. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.rondonia.ro.gov.br/agevisa/institucional/vigilancia-ambiental/controle-de-zoonoses-e-animais-peconhentos/leptospirose/>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

SAMPAIO, Jorge L. M.; GRANATO, Celso; LÁZARI, Carolina S. Pesquisa molecular de micobactérias. 2012. Disponível em: <<http://www.fleury.com.br/medicos/educacao-medica/artigos/Pages/pesquisa-molecular-de-micobacterias.aspx>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

SEVERIANO, Adneison. Surto de diarreia afeta comunidades ribeirinhas alagadas pela cheia no AM. 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2014/03/surto-de-diarreia-afeta-comunidades-ribeirinhas-alagadas-pela-cheia-no-am.html>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

SILVA, Annalu P. da. Tuberculose: médica explica os sintomas, o diagnóstico e como se prevenir. 2014. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/tuberculose-especialista-explica-os-sintomas-o-diagnostico-e-como-se-prevenir>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

SOUZA, Marilena Maria de; NETTO, Eduardo M.; FARIAS, Maria do Carmo A. D. de. Ferramentas no diagnóstico da hanseníase: o convencional e as inovações. **RBM**, São Paulo, v. 70, p. 16-22, out. 2013. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=5547>. Acesso em: 14 dez. 2017.

TESTE VDRL. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/examesmedicos/teste-vdrl/>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**: Microbiologia médica. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760p.

Anotações

[illegible]

Anotações

[illegible]

Anotações

[illegible]

Anotações

[illegible]

ISBN 978-85-522-0531-9



9 788552 205319 >