



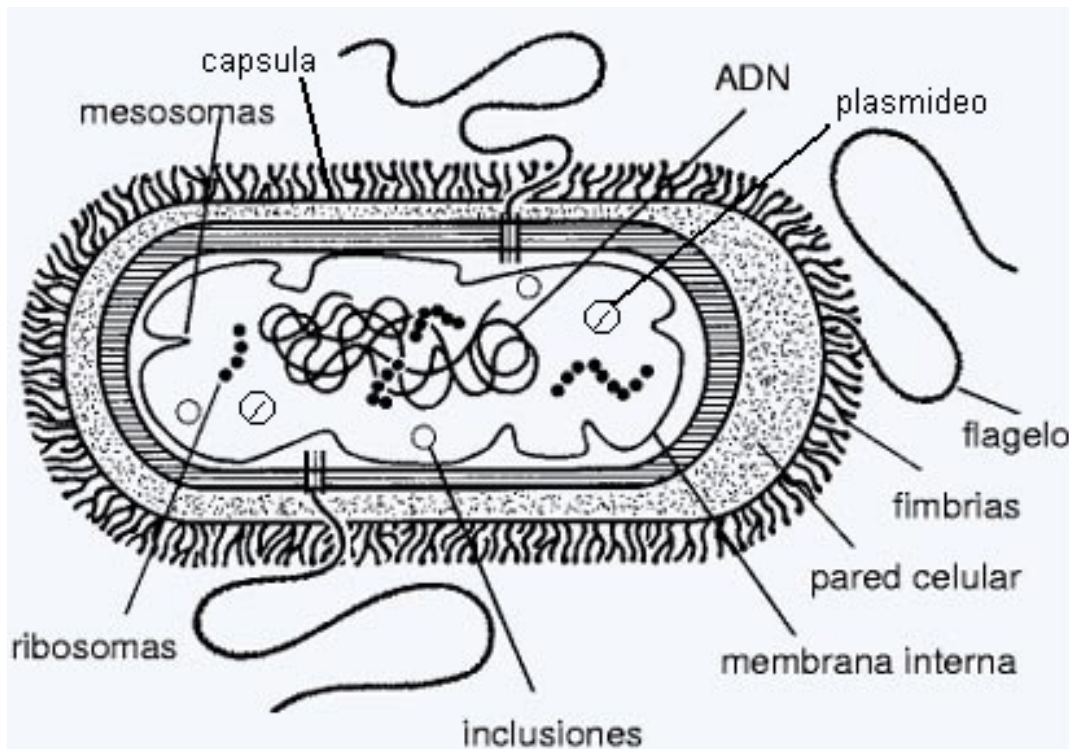
MICROBIOLOGIA



MICROBIOLOGIA - BACTERIOLOGIA

Bactérias são seres procariontes, que possuem como principais estruturas morfológicas:

- **Cápsula:** revestimento importante na prevenção da fagocitose bacteriana e no auxílio da aderência das bactérias aos tecidos. É reserva de água e nutrientes, aumenta a capacidade invasiva de bactérias patogênicas e lhes dá resistência.
- **Parede celular:** manutenção da forma bacteriana, proteção contra rupturas causadas pela elevada pressão osmótica, e local de determinantes antigênicos (diferenciam microorganismos).
- **Membrana citoplasmática:** separa o meio exterior e o meio interior da bactéria, realizando o transporte de elétrons e solutos.
- **Citoplasma:** local onde ocorrem muitos processos metabólicos.
- **Polirribossomos:** síntese de proteínas.
- **Inclusão / grânulo:** acúmulo de alimentos.
- **Plasmídeo:** contém informações genéticas (DNA) independente do nucléoide.
- **Mesosomas:** provável concentração de enzimas respiratórias.
- **Nucleóide:** contém informações genéticas (DNA ou ADN).
- **Fímbrias:** auxiliam na adesão das bactérias às células-alvo e facilitam a troca de DNA na hora da conjugação bacteriana.
- **Flagelos:** atuam na motilidade bacteriana, que é muito importante para a sua sobrevivência.

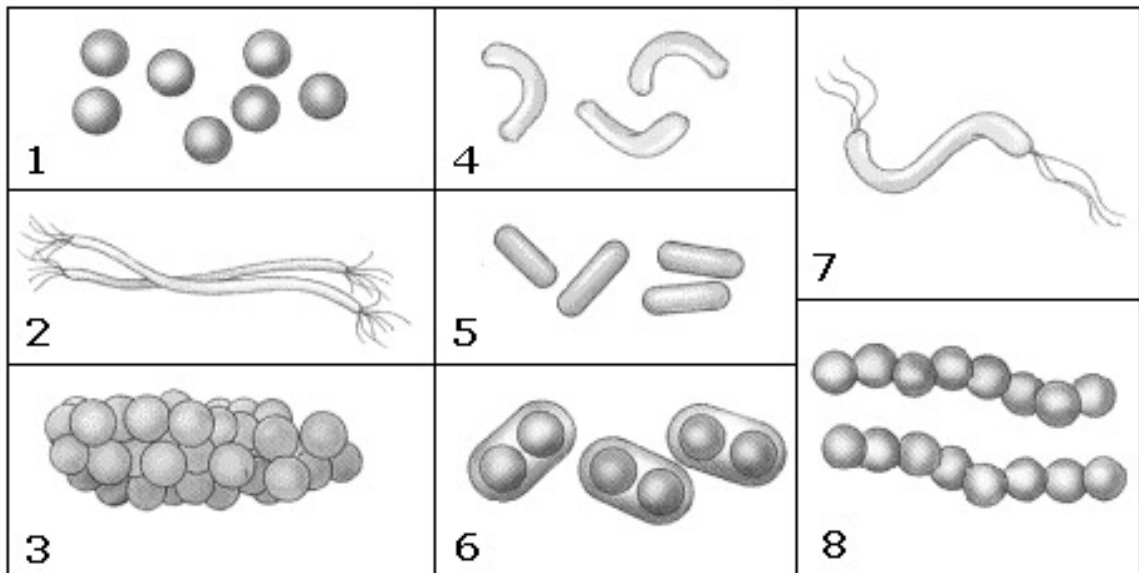




DIVISÃO MORFOLÓGICA BACTERIANA

A divisão morfológica bacteriana é baseada na constituição da parede celular. Isso nos permite agrupar as bactérias em três grupos:

- **Cocos:** células esféricas, que podem estar isoladas ou agrupadas. Caracterizam-se como diplococos, fileiras ou cadeias de cocos (estreptococos), tétrades, cubos ou cachos (estafilococos).
- **Bacilos:** células cilíndricas, que podem estar isoladas ou agrupadas. Caracterizam-se como diplobacilos, correntes, paliçadas ou cocobacilos.
- **Espiraladas:** células onduladas ou helicoidais que podem ter uma ou mais espirais. Quando têm o corpo rígido e são como vírgulas, são chamadas vibriões; quando têm a forma de saca-rolhas são chamadas de espirilos; e quando têm forma espiralada, mas de corpo flexível, são chamadas de espiroquetas.



- 1- _____
- 2- _____
- 3- _____
- 4- _____
- 5- _____
- 6- _____
- 7- _____
- 8- _____



NUTRIÇÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO

Para que haja o crescimento bacteriano, são necessários fatores como:

- 1- pH adequado:** a maioria das bactérias cresce em pH neutro (6.5 – 7.0), porém há bactérias que crescem em pH muito ácido ou muito básico.
- 2- Água:** água disponível presente nos alimentos ou nos veículos onde os microorganismos podem crescer (A_w = atividade de água) e no ambiente (UR = umidade relativa do ar).
- 3- Nutrientes:** fontes de energia (açúcares, lipídeos), fontes de nitrogênio (aminoácidos, peptídeos, proteínas), vitaminas (principalmente complexo B) e sais minerais (quantidades reduzidas de Na, K, Fe, Cu, P, S).
- 4- Temperatura:** é o fator mais importante, podendo dividir os microorganismos em grupos:

GRUPO	TEMP. MÍN.	TEMP. ÓTIMA	TEMP. MÁX.
Termófilos	40°C a 45°C	55°C a 75°C	60°C a 90°C
Mesófilos	5°C a 15°C	30°C a 37°C	35°C a 47°C
Psicrotróficos	-5°C a 5°C	25°C a 30°C	30°C a 35°C
Psicrófilos	-15°C a 5°C	12°C a 15°C	15°C a 20°C

- 5- Composição gasosa do ambiente:** existe a variação de tolerância de quantidade de O_2 entre as bactérias, que as dividem em:
 - **Aeróbios estritos:** necessitam de O_2 para sobreviver
 - **Aeróbios facultativos:** usam o O_2 quando há, e na sua ausência, crescem mesmo sem ele.
 - **Anaeróbios estritos:** não crescem na presença de O_2 .
 - **Anaeróbios aerotolerantes:** não respiram O_2 , mas crescem na sua presença.
 - **Microaerófilos:** necessitam de concentrações menores de O_2 do que as encontradas no ar.

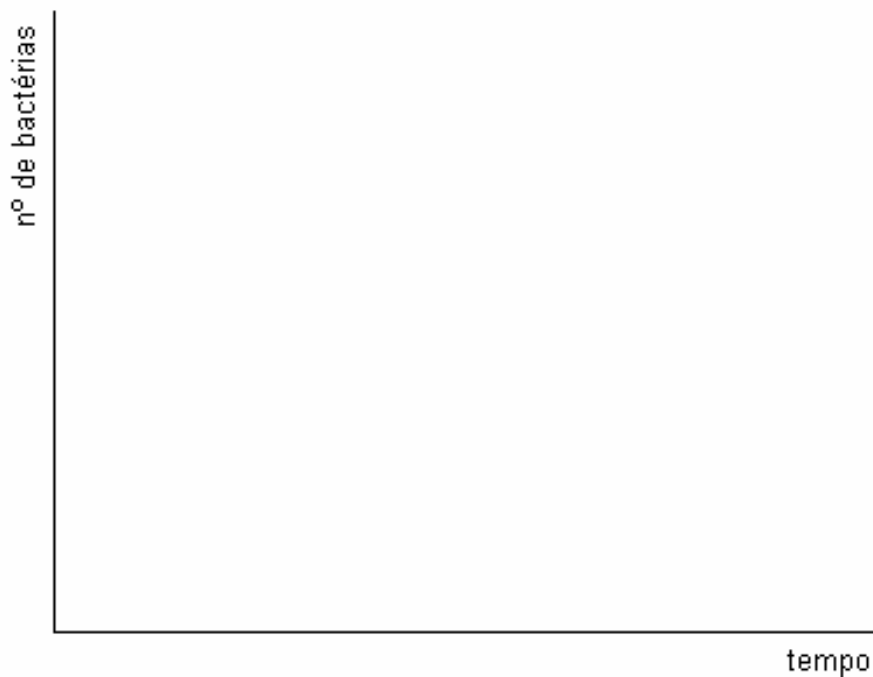


CRESCIMENTO BACTERIANO

As bactérias se multiplicam por fissão numa progressão geométrica, e o tempo que isso leva (surgimento de duas células idênticas à célula mãe) é chamado de tempo de geração. O crescimento bacteriano é demonstrado numa curva, onde são reconhecidas quatro fases:

- **Lag** (pouca divisão celular, com aumento de tamanho da célula)
- **Log** (crescimento logarítmico rápido e constante)
- **Estacionária** (número de mortes igual ao número de "nascimentos")
- **Declínio** (número de mortes superior ao número de "nascimentos")

CURVA DO CRESCIMENTO BACTERIANO





CONTROLE DO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Na Tab.1, encontram-se as definições de termos freqüentemente utilizados em laboratórios de microbiologia.

Na Tab.2, encontra-se um resumo dos métodos físicos de controle do crescimento microbiano.

Tab.1 – Terminologias Relacionadas ao Controle do Crescimento Bacteriano

Termo	Definições e Comentários
Esterilização	Processo de destruição e/ou remoção de todas as formas de vida de um objeto ou material. É um processo absoluto, não havendo graus de esterilização.
Desinfecção	Destruição (morte) de microrganismos capazes de transmitir infecção (patógenos). São usadas geralmente substâncias químicas que são aplicadas em objetos ou materiais. Reduzem ou inibem o crescimento, mas não esterilizam necessariamente.
Anti-sepsia	Desinfecção química da pele, mucosa e tecidos vivos. Anti-sepsia é um caso particular de desinfecção.
Germicida	Agente químico genérico que mata germes, micróbios: bactericida – mata bactérias; virucida – mata vírus; fungicida – mata fungos; esporocida – mata esporos etc.
Bacteriostase	Condição na qual o crescimento bacteriano está inibido, mas a bactéria não está morta. Se o agente bacteriostático for retirado, o crescimento pode recomeçar. Substâncias químicas, quimioterápicos, podem ser bacteriostáticos. Refrigeração pode funcionar como microbiostática para a maioria dos organismos.
Assepsia (sem infecção)	Ausência de microrganismo em uma área. Técnicas assépticas previnem a entrada de microrganismos.
Degermação	Remoção de microrganismos da pele através de remoção mecânica ou pelo uso de anti-sépticos. Antes das injeções, o algodão embebido em álcool é passado na pele, igualmente o álcool-iodado, preparando o campo cirúrgico.

Microbiologia – TRABULSI, L.R. 3ª ed. p76. 2002.

**Tab.2 – Sumário dos Métodos Físicos Empregados no Controle do Crescimento Microbiano**

Método	Mecanismo de ação	Comentários	Uso preferencial
1. Calor úmido			
a) Fervura	Desnaturação de proteínas	Mata bactérias, fungos e muitos vírus, em 15 min Não é eficaz para todos os endósporos	Processo de desinfecção de larga utilização caseira
b) Autoclavação	Desnaturação de proteínas	Método eficaz de esterilização Ficar atento ao trinômio: tempo x temp. x pressão	Meios de cultura, soluções, utensílios e instrumentais que toleram temperatura e pressão
c) Pasteurização	Desnaturação de proteínas	Mata bactérias patogênicas eventualmente transmissíveis pelo leite e reduz o número de todos os microrganismos presentes	Leite, creme de leite, cerveja, vinho
2. Calor seco			
a) Flambagem	Oxidação de todo material até tornar cinzas	Método eficaz de esterilização	Alça e fio de platina
b) Incineração	Oxidação de todo material até tornar cinzas	Método eficaz de esterilização	Papéis, carcaças de animais, restos de curativos, algodão e gases utilizados em hospitais
c) Fornos	Oxidação	Método eficaz de esterilização Ficar atento ao binômio tempo x temperatura	Vidrarias e outros materiais resistentes a altas temperaturas
3. Filtração	Remoção mecânica	Separação de bactérias, fungos em meios ou soluções líquidas e gases	Útil na eliminação total de bactérias e fungos em produtos líquidos termolábeis e na filtração do ar em câmaras e salas
4. Radiações			
a) Ionizantes	Destroem DNA	Método eficaz de esterilização mas custo elevado (raios gama)	Usado para esterilização de produtos cirúrgicos
b) Não-ionizantes	Alteram DNA	As radiações ultravioletas têm emprego restrito como esterilizante	Lâmpadas germicidas (UV)
5. Baixas temperaturas			
Geladeira (0°C), congelador (-20°C) e nitrogênio líquido (-179°C)	Interrupção do metabolismo	Efeito microbiostático	Preservação e microrganismos



MÉTODOS FÍSICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

BAIXAS TEMPERATURAS: Servem apenas como método de preservação de microrganismos, podendo ser realizado em geladeira (0°C), congelador (-20°C) ou nitrogênio líquido (-179°C).

CALOR: O método mais empregado para matar microrganismos é o calor, por ser eficaz, barato e rápido. Quanto maior o número de microrganismos, maior deverá ser o tempo de exposição ao calor. Os tipos de calor utilizados nos processos de controle microbiológico são:

- **Calor úmido:** compreende a fervura, a autoclavação e a pasteurização.
 - **Fervura (temperatura x tempo):** método de redução do número de microrganismos (100°C), que mata muitos vírus, fungos e seus esporos em até 15 minutos. Este não é um método de esterilização, mas é um método eficiente para tornar alimentos e água seguros para serem ingeridos.
 - **Autoclavação (pressão x temperatura x tempo):** método de esterilização, pois requer temperaturas acima da fervura da água (121°C). Este método é o preferencial, desde que o material ou substância a ser esterilizada não sofra alterações pelo calor ou umidade. Esse tipo de esterilização é realizado pelas autoclaves, aonde quanto maior a pressão interna, maior a temperatura atingida. Geralmente utiliza-se como padrão, o calor úmido de 121°C e a pressão de 15 lb/pol², que matará todos os organismos (incluindo os endosporos) em cerca de 15 minutos. A autoclavação é empregada para esterilizar meios de cultura, instrumentos cirúrgicos, seringas de vidro, soluções e numerosos materiais que suportam altas temperaturas e pressões.
 - **Pasteurização (temperatura x tempo):** método de prevenção da perda da qualidade, através da redução do número de microrganismos. Consiste em aquecer o produto a uma dada temperatura, num dado tempo, e a seguir, resfriar bruscamente.
- **Calor seco:** compreende a flambagem, a incineração e os fornos.
 - **Flambagem:** forma mais simples de esterilização por calor seco utilizada rotineiramente em laboratório para esterilizar fios e alças de platina.
 - **Incineração:** método de esterilização, usado para queimar sacos e copos de papel, plástico, carcaças de animais e materiais descartáveis que já foram utilizados.
 - **Fornos (temperatura x tempo):** método de esterilização empregado em laboratório para vidraria refratária.

RADIAÇÕES: As radiações têm seus efeitos dependentes do comprimento de onda, da intensidade, duração e distância da fonte. Há pelo menos dois tipos de radiações empregadas no controle microbiológico:

- **Ionizantes:** são utilizados isótopos radioativos que emitem radiação, como por exemplo, as radiações gama. Esse tipo de radiação possui comprimento de onda mais curto e carrega mais energia do que a radiação não-ionizante. O principal efeito da radiação ionizante é a morte ou inativação do microrganismo, através da destruição do DNA celular. Produtos hospitalares descartáveis como seringas plásticas, luvas, cateteres, fios e suturas são esterilizados por este método.
- **Não-ionizantes:** utilizam-se radiações com comprimento de onda mais longo, como a luz ultra-violeta (UV), que provoca alteração no DNA. As lâmpadas germicidas são empregadas para o controle dos microrganismos o ar e são encontradas em centros cirúrgicos, enfermarias, berçários, capelas de fluxo laminar etc. As desvantagens do uso da UV são: baixo poder de penetração (atua somente na superfície dos materiais) e os efeitos nocivos sobre a pele e os olhos.



MÉTODOS QUÍMICOS DE CONTROLE DO CRESCIMENTO MICROBIANO

- **ÁLCOOIS** (age sobre as proteínas): O álcool etílico hidratado possui maior eficiência do que o absoluto, portanto deve ser utilizado na forma de solução a 70%. Ele é o anti-séptico mais empregado, especialmente em situações que levam a ruptura da integridade da pele (injeções, punções etc). O álcool isopropílico puro apresenta ação germicida superior à do álcool etílico, além de ser menos corrosivo para os instrumentos.
- **FENÓIS** (age sobre as proteínas): Exs. **Creolina**, utilizada para desinfecção de pisos, vasos sanitários; **componentes de sabões**.
- **HALOGÊNIOS E DERIVADOS** (age sobre as proteínas): Ex. **Iodo** (solução alcóolica a 2% - tintura de iodo), que é bactericida, fungicida e esporocida. Hipoclorito de Sódio ou Cálcio (**líquido de Dakin**), que tem ação germicida e é utilizado na desinfecção da água.
- **AGENTES DE SUPERFÍCIE** (age sobre a membrana plasmática): alteram a permeabilidade da membrana, inibem a respiração e a obtenção de energia de formas bacterianas vegetativas, tendo também ação sobre fungos, vírus e esporos bacterianos. São os sabões aniônicos e catiônicos, sendo os catiônicos mais eficazes. Ex.: **Clorexidina**, utilizada na anti-sepsia da pele (mãos de cirurgiões, médicos e paramédicos em geral), preparação pré-cirúrgica de pacientes, anti-sépticos bucais etc.
- **METAIS PESADOS**: possuem efeito bactericida (baixo) e bacteriostático (predominante). Seu uso vem diminuindo com o passar do tempo, pelo risco de intoxicação. Ex. Sais de mercúrio, como merbromino (**Mercurocromo**) e timerosal (**Mertiolate**). **Nitrato de prata**, usado em soluções oftálmicas.
- **AGENTES OXIDANTES**: age através da liberação de oxigênio nascente, que é extremamente reativo e oxida sistemas indispensáveis para a sobrevivência dos microrganismos. Ex. Água oxigenada **H₂O₂** em solução a 3%. Ozônio **O₃**, o qual tem sido utilizado em larga escala no tratamento de água de consumo.
- **ESTERILIZANTES GASOSOS** (agem inativando certas enzimas): O **óxido de etileno**, embora tenha atividade esterilizante lenta, tem sido empregado com sucesso na esterilização de instrumentos cirúrgicos, fios de agulhas para suturas e plásticos. Deve ser empregado com cautela e misturado com outros gases (N e CO₂), pois, em combinação com o ar, forma mistura explosiva.



MEIOS DE CULTURA

Sistema utilizado para isolar microorganismos em laboratórios, que permite o crescimento e a multiplicação dos agentes. Um bom meio de cultura deve preencher todas as necessidades nutricionais dos agentes, ser estéril e possuir pH adequado. Os meios de cultura podem ser líquidos ou sólidos. Podem ser ainda:

- **Não seletivos:** permitem crescimento de um grande número de espécies
- **Seletivos:** meio geral no qual são adicionadas substâncias que inibem ou reduzem certos grupos, salientando outros.

Os meios de culturas possuem como principais componentes: H₂O destilada, fonte de carbono (energia - CO₂, lipídeos, açúcar, álcool e outras substâncias), fonte de nitrogênio, fatores de crescimento (vitaminas que variam de espécie para espécie), extratos (de carne, levedura, caseína de leite, hidrolisado de proteína de soja), minerais (P, Fe, Zn, Mn, Ca, Cu, Na – em baixas concentrações).

Eles se apresentam na forma desidratada, devendo ser diluídos em H₂O deionizada (sem íons) e esterilizados. A esterilização é um processo que elimina todos os contaminantes provenientes da água ou do próprio meio de cultura. Esse processo é feito em autoclave à 121°C por 15 minutos e o pH do meio deve ser ajustado conforme indicado pelo fabricante, ou de acordo com o microorganismo pesquisado.

SEMEADURA

É o processo de isolamento de uma substância que esteja sob suspeita de contaminação por algum microorganismo. Esse isolamento deve proporcionar as condições ideais de crescimento e desenvolvimento do microorganismo, caso este esteja presente.

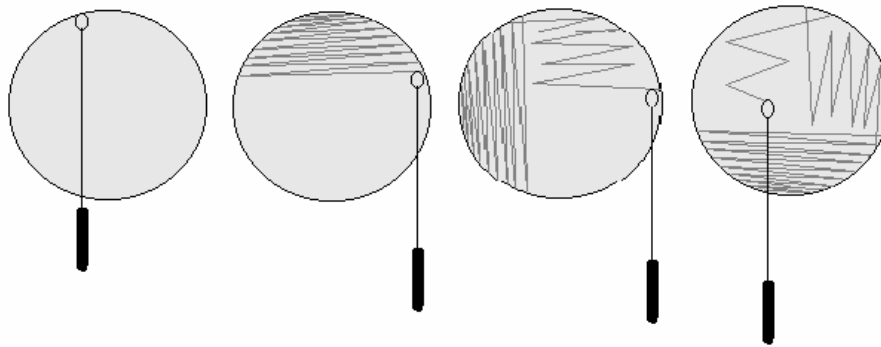
Portanto, semear um material (substância suspeita) significa espalhá-lo sobre o meio de cultura em Placa de Petri, e incubá-la em temperatura ideal (geralmente em estufa a 37°C por cerca de 24 - 48 h). Após o período de incubação, realiza-se a leitura da placa.

O não crescimento de colônias significa a ausência de microorganismos na substância pesquisada, enquanto que o crescimento significará a presença de um ou mais tipos de microorganismos.

Técnicas de Semeadura

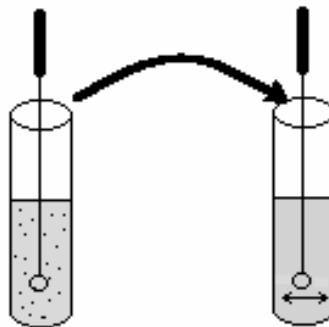
Técnica I: Meio Sólido (ágar em Placa de Petri): Semeadura por esgotamento.

- 1- Mergulhe a alça de platina esterilizada na amostra que lhe é apresentada.
- 2- Encoste a alça carregada de bactérias na superfície do ágar e inicie movimentos de zigue-zague retilíneos, uniformes e bem próximos.
- 3- Desencoste levemente a alça de platina da superfície, gire a placa ($\pm 90^\circ$), encoste novamente a alça de platina no final da primeira semeadura e inicie nova semeadura com movimentos em zigue-zague, retilíneos, uniformes e um pouco mais espaçados.
- 4- Desencoste levemente a alça de platina da superfície, gire a placa ($\pm 90^\circ$), encoste novamente a alça de platina no final da segunda semeadura e inicie nova semeadura com os mesmos movimentos, mas desta vez, bem espaçados.
- 5- Incube em estufa para crescimento sob tempo e temperatura sugeridos.



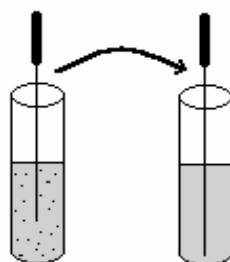
Técnica II: Meio Líquido (caldo nutritivo)

- 6- Mergulhe a alça de platina esterilizada na cultura de isolamento bacteriano que lhe é apresentada.
- 7- Mergulhe a alça carregada de bactérias no tubo com o meio de cultivo líquido (caldo) e agite a alça.
- 8- Incube em estufa para crescimento. Geralmente o tempo de crescimento varia de 4 - 6 h. Dependendo da bactéria, pode levar de 18 a 24 h. Visualize o caldo após incubação. Um caldo turvo demonstra crescimento bacteriano.



Técnica III: Meio semi-sólido

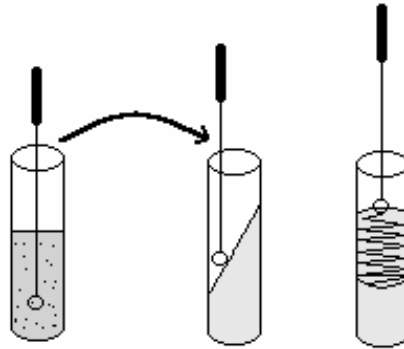
- 1- Mergulhe o fio de platina esterilizado na cultura bacteriana que lhe é fornecida.
- 2- Inocule o fio de platina carregado com bactérias no centro do meio de cultivo semi-sólido.
- 3- Incube em estufa para crescimento sob temperatura e tempo sugeridos.





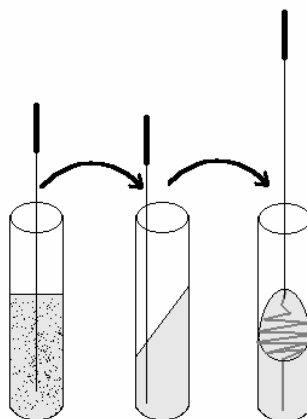
Técnica IV: Meio sólido (ágar inclinado) para fungos

- 1- Pegue a amostra micológica coletada com a alça de platina esterilizada que lhe é apresentada.
- 2- Encoste levemente a alça na parte mais baixa do plano inclinado e suba fazendo estrias na superfície do ágar.
- 3- Incube sob temperatura e tempo sugeridos.



Técnica V: Meio sólido (ágar inclinado) para bactérias.

- 1- Mergulhe o fio de platina esterilizado na cultura bacteriana que lhe é fornecida.
- 2- Inocule o fio de platina carregado com bactérias na parte mais baixa do ágar inclinado até quase encostar o fundo do tubo.
- 3- Durante a retirada do fio de platina, quando este atingir a superfície, suba fazendo estrias na superfície do ágar.
- 4- Incube em estufa para crescimento sob temperatura e tempo sugeridos.





REAÇÕES TINTORIAIS

Para que se enxergar as bactérias (que são transparentes), é necessária a utilização de corantes que evidenciam suas estruturas e auxiliam na separação por gênero e espécie.

Para evidenciar estruturas gerais, utiliza-se a coloração simples, a qual contrasta apenas o corpo da bactéria. Já para se distinguir estruturas específicas, utiliza-se coloração diferencial, composta por mais de um corante, o que possibilita sua separação em espécies ou cepas. Dentre as colorações existentes, duas se destacam por suas características, importância e grupos de microrganismos que atingem.

Método ou Coloração de Gram: Essa coloração é a que possui maior importância no campo da microbiologia, pois permite separar as bactérias em dois grandes grupos (pela diferença na composição da parede celular), as **Gram-positivas** e as **Gram-negativas**. Ela é realizada da seguinte forma:

- **1ª Etapa:** imerge-se o esfregaço em solução **crystal-violeta por 1'**. Esse corante principal tingirá os dois grupos de bactérias, ou seja, todas se corarão de violeta.
- **2ª Etapa:** imerge-se o esfregaço em solução de **lugol por 1'**. Esse mordente fará com que a coloração violeta das células permaneça, através da formação do complexo CV-1.
- **3ª Etapa:** descora-se o esfregaço com solução **álcool-acetona** e depois lava-se em **água corrente**. Esse descorante irá, no caso das gram-positivas, permitir a permanência do complexo CV-1 no interior da célula através da desidratação, diminuição da porosidade e da permeabilidade da parede celular. Já no caso das gram-negativas, ela vai remover o complexo CV-1 da célula através da extração dos lipídeos e do aumento da porosidade da parede celular.
- **4ª Etapa:** imerge-se o esfregaço em solução contra-corante (**fucsina**) **por 30"- 40"**, logo depois lavando-o em **água corrente**. Esse contra-corante irá, no caso das gram-positivas, não surtir efeito, portanto as gram-positivas permanecerão violetas. Já no caso das gram-negativas, que foram descoradas anteriormente, esse corante penetrará na célula, tornando-a vermelha (arroseada).

Ao final o processo, as bactérias **gram-positivas** coram-se de **violeta**, e as **gram-negativas** coram-se de **vermelho** (arroseado). A etapa mais importante dessa coloração é a 3ª etapa. Se não houvesse a etapa da descoloração, as gram-negativas não descolorariam e não se corariam de vermelho (arroseado) na 4ª etapa, assim não havendo a diferenciação dos dois grupos; sem contar que as gram-positivas não fixariam a coloração violeta, podendo assim, corar-se de forma diferente até o final do processo.

Método ou Coloração de Ziehl-Neelsen: A coloração de Ziehl-Neelsen permite a diferenciação dos bacilos álcool-ácido resistentes (**BAAR**) dos bacilos não álcool-ácido resistentes (**BNAAR**). É o método mais utilizado para a pesquisa de micobactérias em diferentes materiais clínicos. A presença de BAAR no escarro é fortemente sugestiva de tuberculose pulmonar (*Micobacterium tuberculosis*), e o encontro dessas bactérias nas secreções nasais ou no sangue colhido do lóbulo da orelha, praticamente confirma o diagnóstico clínico de lepra (*Micobacterium leprae*). Essa coloração é realizada da seguinte forma:

- **1ª Etapa:** imerge-se o esfregaço em **solução concentrada de fucsina**, aquecendo-se a lâmina até a emissão de vapores, durante cerca de **3'** (não deixando ocorrer ebulição). Esse corante principal tingirá todas as bactérias, que se tornarão vermelhas.
- **2ª Etapa:** escorre-se o corante e descora-se o esfregaço com solução diferenciadora de **álcool-ácido** (álcool + HCl). Lavar em **água corrente**. Esse diferenciador irá, no caso dos BAAR, permitir a permanência do corante fucsina. Já no caso dos BNAAR, ele vai remover o corante fucsina.
- **3ª Etapa:** imerge-se o esfregaço em solução diluída de **azul de metileno** (1:10) **por 1'**, logo depois lavando-o em **água corrente**. O azul de metileno não surtirá efeito sobre os BAAR, porém, corará os BNAAR, que foram descorados anteriormente.

Ao final o processo, os **BAAR** se coram de **vermelho**, e os **BNAAR** se coram de **azul**.



Staphylococcus sp

São cocos G+ arranjados em cachos, que fazem parte da microbiota da pele, porém podem causar patogenias e serem responsáveis infecções piogênicas e septicemias fatais. Alguns fatores favorecem estas infecções, como alterações hormonais (puberdade) e metabólicas (diabetes). Possuem as seguintes características: são catalase positivos; crescem em vários meios de cultura (ágar-sangue, ágar-chocolate, ágar Müeller-Hinton e ágar Manitol Hipertônico) e fermentam carboidratos.

Os Staphylococcus sp patogênicos possuem a capacidade de hemolisação, coagulação do plasma, produção de toxinas/enzimas extracelulares e resistência à antimicrobianos. Esse gênero abrange mais ou menos 30 espécies, dentre as quais as de interesse clínico são três:

S. aureus: Causam lesões como furúnculos, conjuntivite e impetigo bolhoso (acomete toda a pele com a formação de bolhas purulentas) que são doenças sérias em pacientes imunocomprometidos, queimados ou com doenças crônicas. Podem gerar pneumonias, osteomielites, endocardites e meningites. Somente o S. aureus produz coagulase. Eles produzem também toxinas, as quais são:

- **Exotoxina**: lisa as hemáceas e lesa ou agrega as plaquetas.
- **Leucocidina**: destrói leucócitos.
- **Esfoliativa**: causa descamação da pele, causando a "Síndrome da pele escaldada".
- **TSSI-1**: é causada com uma quantidade de 10^6 bactérias. Seu quadro inicia com febre, infecção multisistêmica, choque e óbito, e é uma doença de mulheres por causa do absorvente interno.
- **Enterotoxinas**: causam intoxicações alimentares. Elas são termoestáveis (resistem ao congelamento e a fervura por 30 minutos) e são encontradas em doces cremosos.

S. epidermidis: São os principais agentes causadores de infecções associadas a próteses cardíacas (endocardites) e cateteres, portanto são importantes agentes de infecções hospitalares (berçários, UTIs, centros cirúrgicos e enfermarias ou unidades de quimioterapia). Evita-se essas infecções com boa assepsia (raspagem de pelos e uso de álcool iodado), assepsia do cirurgião, e utensílios e ambiente estéreis.

S. saprophyticus: Segundo agente mais importante nas infecções urinárias. Elas são mais comuns em mulheres, podendo ser subclínicas ou crônicas.



Streptococcus sp

São cocos G+ arranjados em cordões ou em duplas (forma de gota), catalase negativos. Embora esses microrganismos façam parte da microbiota normal da pele, vias aéreas, aparelho genito-urinário e trato intestinal, muitos deles são responsáveis por uma variedade de manifestações clínicas. Os estreptococos necessitam de meios de cultura enriquecidos pela adição de sangue (Ágar-sangue) e possuem capacidade hemolítica. Sendo assim, são classificados como β -hemolíticos (hemólise total), α -hemolíticos (hemólise parcial) e γ -hemolíticos / não-hemolíticos (não causam hemólise). Os estreptococos de maior importância clínica são:

S. pyogenes: As infecções mais frequentes localizam-se na faringe e amídalas (faringoamidalites) e na pele. Disseminando-se a partir de focos primários (particularmente das faringoamidalites), a bactéria pode infectar diferentes órgãos e tecidos do organismo, podendo evoluir para bacteremias e meningites. São bactérias capsuladas, β -hemolíticas, sensíveis a bacitracina e resistentes a optoquina (ambos são agentes antimicrobianos). Elas produzem:

- **Estreptolisina S**: responsável pelo halo de hemólise.
- **Estreptolisina O**: hemolisina ativa somente na ausência de O₂. Pacientes convalescentes da infecção por esse microrganismo costumam apresentar anticorpos séricos contra a estreptolisina O (Anti-estreptolisina O, chamado de ASO ou ASLO). A pesquisa desses anticorpos tem grande importância no diagnóstico da febre reumática.
- **Estreptoquinase, Desorirribonuclease e Hialuronidase**: a estreptoquinase tem a capacidade de dissolver coágulos, a desorirribonuclease degrada o DNA e a hialuronidase dissolve a substância fundamental do tecido conjuntivo. Todas as três são imunogênicas, portanto, a pesquisa de anticorpos específicos deve ser utilizada para fins de diagnóstico.

S. agalactiae: As infecções mais frequentes são as meningites, septicemias e pneumonias em neonatos, os quais se contaminam na passagem pela vagina, durante o parto. Para o diagnóstico laboratorial, o material deverá ser colhido da vagina, cérvix e região retal, ou ao nascimento a partir do cordão umbilical, canal auditivo externo, garganta e reto. São bactérias β -hemolíticas, resistentes a bacitracina e a optoquina. A identificação presuntiva desse tipo de microrganismo pode ser feita através do teste de CAMP, o qual é baseado na detecção de uma enzima (fator CAMP) produzidas pelo *Streptococcus agalactiae*, que potencializa a ação lítica da β -hemolisina do *S. aureus* sobre hemáceas de carneiro (Ágar-sangue).

S. pneumoniae: diplococos com formato de chama de vela, α -hemolíticos, resistentes a bradiginina e sensíveis a optoquina. São associados a pneumonia, meningite, septicemia e otite média. Eles podem ser normalmente encontrados no trato respiratório superior de seres humanos, e só causam infecção se forem capazes de escapar da fagocitose. Esse microrganismo possui uma substância em sua parede celular, denominada Substância C. Essa substância C reage com uma proteína do soro humano, denominada Proteína C-reativa.



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA Staphylococcus sp

- 1- Bacterioscópico:** identificação da forma bacteriana, coloração de Gram (+ ou -) e arranjo especial.
- 2- Prova da Catalase:** diferencia Staphylococcus sp e Streptococcus sp. É realizada em lâmina, aonde se coloca 01 ou 02 gotas de H₂O₂ e uma colônia suspeita observando-se a formação ou não de bolhas.
- 3- Prova da Coagulase:** identifica a presença de S. aureus. Pode ser realizada em lâmina (econômico e rápido, porém pode ter interferentes e pode não diagnosticar algumas cepas dessa bactéria) ou em tubo (maior precisão, porém maior quantidade de plasma, e possibilidade de falso-negativos). Em tubo, mistura-se uma colônia suspeita em ½ mL de plasma de coelho, incuba-se a 37°C por 4 h. Se não houver a formação de coágulo, incubar por mais 12 horas, observando o material num intervalo de 2 em 2 h.
- 4- Teste de Resistência ou Sensibilidade a Novobiocina:** diferencia S. epidermides e S. saprophyticus. Semeia-se a bactéria em meio Müller-Hinton, adiciona-se um disquinho de novobiocina e incuba-se a 37°C por 24 h. Verifica-se a sensibilidade (halo maior de 16 mm - S. epidermides) ou a resistência (halo menor ou igual a 16 mm - S. saprophyticus) da bactéria analisada. Nunca deve-se usar o meio ágar-sangue para essa prova, pois algumas cepas de Staphylococcus sp causam hemólise, o que poderia parecer um halo.
- 5- Manitol:** o S. aureus fermenta o meio manitol (tornando-o amarelo), enquanto que as outras duas espécies não fermentam o mesmo.

Esquema simplificado para a diferenciação das espécies de Staphylococcus sp mais frequentemente envolvidas em infecções em seres humanos

Espécie	Catalase	Coagulase	Manitol	Novobiocina
<u>S. aureus</u>	+	+	+	Sensível
<u>S. epidermides</u>	+	-	-	Sensível
<u>S. saprophyticus</u>	+	-	-	Resistente



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL PARA Streptococcus sp

1- Bacterioscópico

2- Prova da Catalase

3- Teste de Hemólise: diferencia α -hemólise, β -hemólise e γ -hemólise. Realizada em Ágar-Sangue.

4- Teste de Resistência ou Sensibilidade a Bacitracina e a Optoquina: diferencia as três espécies de estreptococos. Semeia-se a bactéria em meio Müller-Hinton, adiciona-se um disquinho de bacitracina e um disquinho de optoquina e incuba-se a 37°C por 24 h. Verifica-se a sensibilidade (halo maior de 16 mm) ou a resistência (halo menor ou igual a 16 mm) da bactéria analisada. Nunca deve-se usar o meio ágar-sangue para essa prova, por causa da capacidade hemolítica das bactérias.

5- Teste de CAMP: teste confirmatório para S. agalactiae. Em Ágar-Sangue, semeia-se a bactéria suspeita em uma única estria. Paralelamente a esta estria, semeia-se outra estria de uma amostra conhecida de Staphylococcus aureus. Observa-se então, após incubação a 37°C, a potencialização ou não da hemólise do Streptococcus agalactiae.

Esquema simplificado para diferenciação das principais categorias ou espécies de estreptococos encontrados em espécimes clínicos de origem humana

<i>Espécie</i>	<i>Catalase</i>	<i>Hemólise</i>	<i>Bacitracina</i>	<i>Optoquina</i>	<i>CAMP</i>
<u>S. pyogenes</u>	-	β	Sensível	Resistente	-
<u>S. agalactiae</u>	-	β	Resistente	Resistente	+
<u>S. pneumoniae</u>	-	α	Resistente	Sensível	-



Neisseria sp

São diplococos G-, com formato de feijão.

Neisseria gonorrhoeae (Gonorréia)

No homem, a uretrite é a principal forma clínica da infecção gonocócica. A partir da uretra, a infecção pode se estender para a próstata, epidídimo e vesícula seminal. Na mulher, a forma clínica de infecção mais comum é a cervicite. Essa infecção pode ascender para as tubas uterinas (salpingite), podendo atingir o peritônio. A infecção mais comum em crianças é a conjutivite neonatal adquirida durante o nascimento. Ocasionalmente o gonococo invade a corrente circulatória, dando origem a artrites, endocardites, meningites e lesões cutâneas. A disseminação da infecção é mais freqüente na mulher do que no homem.

O diagnóstico é feito pelo exame bacterioscópico de esfregaços corados por Gram e pelo isolamento e identificação do gonococo. No homem, o exame bacterioscópico é extremamente importante porque revela a presença do gonococo em secreção uretral, na grande maioria das vezes. O quadro microscópico costuma ser bastante característico, consistindo em grande número de leucócitos, vários deles contendo diplococos G- em seu interior. Na mulher, o exame bacterioscópico tem valor bastante limitado para o diagnóstico de infecção gonocócica. A cultura deve ser feita por semeadura da secreção, seja uretral, cervical, retal ou faríngea, no meio de Thayer-Martin, que é seletivo para gonococos.

Neisseria meningitidis (Meningite)

Essa bactéria inicia suas infecções colonizando a nasofaringe. Na maioria das vezes a infecção é assintomática, mas ocasionalmente apresenta manifestações clínicas discretas. Da nasofaringe, o meningococo pode ganhar a circulação, determinando meningococcemia e meningite. A infecção assintomática da nasofaringe determina o aparecimento de anticorpos protetores contra o meningococo. Isso significa que a maioria dos casos de meningite meningocócica ocorre por falta de resistência do hospedeiro.

O exame bacterioscópico de esfregaços, preparados com o sedimento do líquido, corados por Gram, é de grande utilidade para o diagnóstico. A presença de diplococos G-, intra e extracelulares, praticamente garante o diagnóstico de meningite meningocócica.



ENTEROBACTÉRIAS

Grupo de bacilos G- encurvados ou retos, anaeróbios facultativos, que podem ou não apresentar motilidade (flagelos) e que possuem muitas propriedades em comum. Embora possam ser encontradas amplamente na natureza, a maioria habita os intestinos do homem e dos animais.

Elas são associadas à quadros diarréicos e desintéricos, podendo também estar associadas à quadros de meningite, pneumonias, intoxicação alimentar e infecções urinárias.

O representante clássico deste grupo é a *Escherichia coli*, um dos mais importantes membros da flora intestinal dos mamíferos e um importante patógeno, causador de infecção no trato intestinal e urinário. As outras enterobactérias também podem ser chamadas de coliformes, devido a importância da *E. coli* na medicina.

Principais gêneros de Enterobactérias

Escherichia coli: Habita o trato intestinal do homem e animais, sendo disseminada através de veículos contaminados com material fecal (água, alimentos). Está associada a infecções urinárias, bacteremias, meningite do recém nascido e quadros desintéricos. Existem cinco cepas associadas aos quadros disintéricos:

- **EPEC** (*Escherichia coli* entero-patogênica clássica): causadora de diarréia em crianças com menos de um ano de idade, através da destruição das microvilosidades, o que gera a diarréia por má absorção.
- **ETEC** (*Escherichia coli* entero-toxigênica): produz dois tipos de toxinas, chamadas enterotoxina LT (termolábil) e enterotoxina ST (termoestável – suporta 100°C durante 30 min). Essa bactéria somente adere às células intestinais, não destruindo as microvilosidades. A diarréia é proveniente da ação das enterotoxinas.
- **EIEC** (*Escherichia coli* entero-invasora): invade as células das microvilosidades, destruindo-as e causando diarréia.
- **EHEC** (*Escherichia coli* entero-hemorrágica): causadora de diarréias leves, sanguinolentas ou colite disintérica. Ela destrói as microvilosidades e é produtora de uma citotoxina chamada verotoxina (toxina de Shiga ou "Shiga-like"), gerando assim um quadro disintérico parecido com o quadro causado pela shigelose.
- **EAEC** (*Escherichia coli* entero-agregativa): Possui a característica de se agregarem sobre as microvilosidades. Está associada com quadros de diarréia protraída, ou seja, aquelas que apresentam duração de 7 a 14 dias.

***Salmonella* sp**: Habita o trato intestinal do homem e de animais (frango, peru, pato, roedores, gato, cachorro e tartaruga), sendo disseminada por alimentos, principalmente de origem animal, carnes preparadas, aves, ovos, derivados do leite, produtos de panificação, saladas diversas. Está associada à febre tifóide, febre paratifóide, meningite em crianças e infecções intestinais.

- *Salmonella typhi*: causadora da febre tifóide, caracterizada por febre, dor de cabeça, diarréia e dor abdominal.
- *Salmonella paratyphi*: causadora da febre paratifóide, clinicamente semelhante à febre tifóide.
- *Salmonella typhimurium*: causadora de meningite infantil, sendo um agente comum em São Paulo.
- Demais espécies: Causadoras de enterocolites de evolução não complicada que desaparecem em uma semana.

***Shigella* sp**: Causadora da shigelose ou disenteria bacilar. A principal espécie é a *Shigella dysenteriae*, que produz a toxina "Shiga", que possui atividade de citotoxina, neurotoxina e enterotoxina. Atinge geralmente crianças, e é transmitida pela ingestão de água contaminada ou de alimentos preparados com água contaminada.



***Proteus* sp, *Morganella* sp e *Providencia* sp:** Encontradas regularmente nos intestinos do homem, sendo encontradas causando infecções urinárias. Antigamente, esses três gêneros faziam parte apenas do gênero *Proteus* sp.

Edwardsiella tarda: É uma bactéria raramente isolada do homem. Pode causar infecções intestinais com a presença de sangue, muco e leucócitos nas fezes, e infecções extra-intestinais.

***Citrobacter* sp:** São encontradas frequentemente nos intestinos do homem. Causam pielonefrites, meningites do recém-nascido, endocardite e bacteremias. Estas infecções tendem a predominar em indivíduos imunocomprometidos, e por esta razão, ocorrem basicamente em hospitais.

***Klebsiella* sp:** Este gênero está associado à pneumonia lobar, infecções do aparelho urinário, endocardites e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas. É um importante agente de infecções hospitalares.

***Enterobacter* sp:** Geralmente encontrada como agente secundário de outras infecções.

Hafnia alvei: Não é um agente raro, e sua patogenicidade é semelhante a da *Enterobacter* sp.

***Serratia* sp:** Importante agente de infecções hospitalares, devido a sua múltipla resistências a antibióticos.

***Yersinia* sp:** Causadora de enterocolite (*Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis*) e da Peste Bubônica / Negra (*Yersinia pestis*).

- **Enterocolite:** seus sintomas variam de leves a severos, e são caracterizados por diarreia, febre e dor abdominal. As bactérias são transmitidas por via fecal-oral, por ingestão de água e alimentos contaminados, como leite e carne suína contaminados.
- **Peste Bubônica / Peste Negra:** o reservatório da *Y. pestis* são roedores selvagens ou domésticos, e a via de transmissão se dá pela picada de pulgas infectadas, que injetam a bactéria através da pele. Uma vez dentro do organismo, a bactéria se instala nos linfonodos, gerando resposta inflamatória que resulta no inchaço (bubo) característico da febre bubônica. Eventualmente, essa bactéria pode atingir os pulmões, gerando a forma pulmonar da doença, a qual apresenta alta fatalidade, podendo levar ao óbito em poucos dias. Quando as bactérias atingem os pulmões, podem ser transmitidas através de perdigotos a outros indivíduos. Os doentes com peste frequentemente desenvolvem lesões necróticas nos vasos sanguíneos periféricos, as quais dão aspecto enegrecido à pele; daí o nome de Peste Negra.

***Pseudomonas* sp:** Bacilos flagelados, aeróbicos, não formadores de esporos, oportunistas que podem causar várias doenças. Estão presentes no solo, água, ar e esgoto, crescendo em meios simples. A *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um dos principais agentes de infecção hospitalar, estando associada com infecções dos trato urinário e respiratório, e infecções em pacientes com queimaduras graves e lesões de pele. Uma importante característica dessa espécie é a produção de um pigmento azul-esverdeado denominado piocianina, e por isso, também é conhecida como bacilo piocianico.



DIAGNÓSTICO DAS ENTEROBACTÉRIAS

O diagnóstico das infecções por enterobactérias é normalmente realizado através do isolamento e da identificação da bactéria responsável pela infecção. Pode-se recorrer também, no caso de algumas espécies, a diagnóstico sorológico ou molecular.

As amostras são provenientes de vários locais do corpo, de acordo com o local de infecção. Podem ser fezes, urina, liquor ou qualquer outro material. Primeiramente se realiza a semeadura em meio de isolamento, para depois de serem realizadas as provas bioquímicas e sorológicas.

Os meios de cultura líquidos (também chamados de "caldos") são utilizados para a promoção da multiplicação das bactérias, sendo os mais utilizados o tetracionato e o selenito (para a coprocultura). São utilizados apenas para aumentar o número de bactérias existentes na amostra, permitindo assim um resultado mais exato e eficaz.

As enterobactérias não são muito exigentes quanto ao meio de cultura. Geralmente os meios mais utilizados são aqueles que são impeditivos para outras bactérias, principalmente as G+. Os meios sólidos não seletivos são o Ágar MacConkey e o Ágar-Eosina-Azul-de-Metileno (Ágar Teague). Os meios seletivos para algumas das bactérias enteropatogênicas, como a *Shigella* sp, a *Salmonella* sp e a *Yersinia enterocolitica*, impedem o crescimento da maioria das enterobactérias encontradas normalmente nos intestinos, facilitando assim o isolamento das enteropatogênicas quando se realiza a coprocultura (cultura de fezes). Esses meios "seletivos" sólidos seriam o Ágar SS, o Ágar-Verde Brilhante (VB) e o Ágar Wilson-Blair.

Todos os meios sólidos utilizados para o cultivo das enterobactérias contêm um ou mais açúcares que, quando metabolizados, formam produtos que acidificam o meio, o que é detectado pela presença de um indicador de pH. Por exemplo, as bactérias que fermentam lactose formam colônias vermelhas na presença do indicador vermelho neutro. Por outro lado, se a enterobactéria produz H₂S e o meio contém ferro, as colônias serão de cor escura, devido a formação de sulfeto de ferro. Segue uma tabela contendo os principais meios de cultura utilizados no isolamento das enterobactérias.

Meios de cultura mais comumente utilizados para o isolamento de enterobactérias		
Meio	Impediente para:	Indicado no isolamento de:
MacConkey	Bactérias Gram-positivas	Enterobactérias em geral
Teague	Bactérias Gram-positivas	Enterobactérias em geral
SS	Bactérias Gram-positivas e germes da microbiota intestinal normal	<i>Shigella</i> sp, <i>Salmonella</i> sp, <i>Y. enterocolitica</i>
Ágar-VB	Bactérias Gram-positivas e germes da microbiota intestinal normal	<i>Salmonella</i> sp (exceto <i>S. typhi</i>)
Wilson-Blair	Bactérias Gram-positivas e germes da microbiota intestinal normal	<i>S. typhi</i>

Após o isolamento das enterobactérias em Placa de Petri, realiza-se a sua identificação através de provas bioquímicas, seguidas ou não de provas sorológicas.

A série bioquímica é composta de doze provas analíticas, das quais algumas podem ser feitas em conjunto num único tubo de ensaio, e outras devem ser feitas separadamente. Essas provas verificam basicamente a presença de determinadas enzimas, emissão de gás e motilidade. A partir da comparação dos resultados de todas as provas, verifica-se o gênero bacteriano analisado.

A série bioquímica clássica é composta por 8 tubos de ensaio, cada um contendo um determinado meio de cultura com características analíticas diferentes.



Provas Bioquímicas para Diagnóstico Presuntivo de Enterobactérias

- **TSI** (Triple-Sugar-Iron): O meio TSI se encontra inclinado dentro de um tubo de ensaio. Esse tubo permite visualizar:
 - **Produção de gás:** (+) formação de bolhas e/ou arrebentamento do meio
 - **Presença de H₂S:** (+) enegrecimento do meio
 - **Fermentação de glicose, sacarose e/ou lactose:** quando não ocorre fermentação, o meio permanece com ápice e base vermelhos; Quando Glicose (+) e Sacarose/Lactose (-), o meio possui ápice vermelho e base amarela; Quando ocorre fermentação total (Glicose, Sacarose e Lactose), o meio possui ápice e base amarelas.
- **MIO** (Motilidade, Indol e Ornitina): O meio MIO é um meio semi-sólido não inclinado que permite avaliar:
 - **Motilidade:** (+) presença de turbidez, ou crescimento além da semeadura.
 - **Indol:** após incubação, adiciona-se de 1 a 2 gotas de reativo de Kovacs à superfície do meio. A prova é positiva quando ocorre a formação de um anel de cor vermelha na superfície do meio.
 - **Ornitina:** (+) coloração amarela do meio.
- **VM** (Vermelho de Metila): É um caldo que possui glicose e indicador de pH. Após incubação, verifica-se a coloração do meio. Vermelho= pH 4,4 (+); Amarelo= pH 6,0 (-).
- **VP** (Voges-Proskauer): É um caldo que avalia a fermentação butilenoglicólica. Após incubação, adiciona-se o reativo de Voges-Proskauer e verifica-se a coloração instantaneamente. Vermelho (+).
- **Citrato:** É um meio de cultura que avalia a metabolização do citrato. Azul (+) e Verde (-)
- **Urease:** É um meio de cultura que avalia a metabolização da uréia. Pink (+)
- **Lisina descarboxilase** (LDC): É um meio de cultura que avalia a metabolização da lisina. Roxa (+) e Amarela (-)
- **Fenilalanina desaminase** (FAD): É um meio de cultura que avalia a metabolização da fenilalanina. Verde (+)

Existem dois meios para a identificação de enterobactérias amplamente utilizados em laboratório de análises clínicas, por serem mais práticos. Eles são o EPM-MILI (Probac[®]) e Rugai (Newprov[®]).



EPM-MILI (Probac®)

Meio EPM: este meio é uma modificação do meio de Rugai e Araújo, e contém os testes de produção de gás por fermentação da glicose, produção de H₂S, metabolização da uréia e do triptofano (LTD).

Meio MILI: são determinadas a motilidade, produção de indol e metabolização da lisina.

Os sete testes do EPM-MILI associados à fermentação da lactose, observada nas placas de isolamento (Ágar SS ou MacConkey), permitem a identificação presuntiva das seguintes enterobactérias: *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp e *Yersinia enterocolitica*.

Semeadura: tocar com o fio de platina uma colônia bem isolada e inocular nos 2 meios. Para inocular o meio EPM, introduzir até o fundo do tubo e ao retirá-la, semear a superfície do meio. A inoculação do meio MILI deve se feita por picada central, introduzindo o fio de platina até o fundo do tubo. Incubar os tubos com as tampas semi-rosqueadas a 37°C e fazer leitura após 18 a 24 horas.

Leitura e Interpretação:

Meio EPM:

- Produção de gás: aparecimento de bolhas ou deslocamento do meio de cultura para cima.
- Produção de H₂S: enegrecimento do meio em qualquer grau.
- Metabolização da uréia: aparecimento de cor azul ou verde-azulada (reação fraca) que estende para a base do meio, envolvendo-o totalmente ou não.
- LTD: aparecimento de cor verde-escuro na superfície do meio; quando a reação é negativa, a superfície do meio adquire coloração azul ou amarela (rara).

Meio MILI:

- Motilidade: a bactéria móvel cresce além da picada, turvando parcial ou totalmente o meio; a bactéria imóvel cresce somente na linha de semeadura.
- Metabolização da lisina: se a lisina é metabolizada, o meio adquire coloração arroxeadá; quando o aminoácido não é metabolizado, o meio se torna amarelo nos seus 2/3 inferiores.
- Produção de indol: após a leitura dos testes de motilidade e lisina, adicionar 3 a 4 gotas do reativo de Kovacs à superfície do meio e agita levemente; quando a bactéria produz indol, o reativo adquire cor rosa ou vermelha; quando não produz, o reativo mantém sua cor original.

Características das enterobactérias nos meios EPM-MILI									
		Meio EPM					Meio MILI		
	Lactose (placa de isolamento)	Aspecto geral	Gás	H ₂ S	Urease	LTD	Motilidade	Indol	Lisina
<i>Shigella (dysenteriae, flexneri e boydii)</i>	-	Base amarela e superfície azul. Ausência de bolhas de gás e de enegrecimento.	- a	-	-	-	-	+/-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	Base amarela e superfície azul. Ausência de bolhas de gás e de enegrecimento.	-	-	-	-	-	-	-
EIEC	+/-	Base amarela, superfície azul, com ou sem bolhas de gás. Ausência de enegrecimento.	+/-	-	-	-	-	+	-
EPEC, ETEC e outras	+	Base amarela, superfície azul. Presença de bolhas de gás. Ausência de enegrecimento.	+/-	-	-	-	+/-	+	+
<i>Salmonella</i> sp	- b	Base amarela, superfície azul. Presença de bolhas de gás e de enegrecimento.	+	+	-	-	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	Meio azul na base e na superfície. Ausência de bolhas de gás e de enegrecimento.	-	-	+	-	-	+/-	-

a) Alguns sorotipos de *Shigella flexneri* e *Shigella boydii* produzem gás.

b) A *S. typhimurium* lactose (+) é raramente isolada atualmente.



Meio de Rugai (Newprov®)

Inoculação: Com o auxílio de um fio de platina, coletar a amostra da colônia a ser pesquisada e inocular através de picada até o fundo do tubo, realizando estrias na superfície do meio de Rugai. Incubar em estufa a 36°C por 24 horas.

Leitura e Interpretação dos Resultados das Provas

1. Parte Superior (Meio de Rugai): cor original azul-esverdeada.

Ápice – podem ser realizadas as seguintes leituras:

- **LTD** - Reação positiva:
Cor verde garrafa (o microrganismo é LTD negativo)
Cor marrom (o microrganismo é LTD positivo)
- **Fermentação da sacarose** – Reação positiva: cor amarela
- **Produção de gás** – Reação positiva: formação de bolhas e/ou arrebentamento do meio
- **Uréia** – Reação positiva: cor azul intensa
- **Produção de H₂S** – Reação positiva: cor negra

2. Parte Inferior (Meio de Lisina): cor original púrpura.

Podem ser realizadas as seguintes leituras:

- **Lisina:**
Reação positiva: qualquer cor diferente do amarelo
Reação negativa: cor amarela
- **Motilidade:**
Reação positiva: turvação do meio, qualquer crescimento além da picada
Reação negativa: crescimento apenas na picada

3. Tampa: pode ser realizada a seguinte leitura:

- **Indol** – Reação positiva: cor vermelha após adição de uma gota de reativo de Kovacs no papel de filtro existente na parte interna da tampa. **OBS.: Esta leitura deve ser realizada após incubação.**

Aspecto bioquímico presuntivo (principais cepas)									
Microrganismo	Indol	LTD	Sacarose	Glicose	Gás	Uréia	H ₂ S	Lisina	Mot
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<i>Shigella</i> sp	+/-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Proteus</i> sp	-/+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp	-	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>Citrobacter</i> sp	-/+	-	V	+	+	-	+/-	-	+
<i>Klebsiella</i> sp	-	-	+	+	+	+	-	+	-
<i>Serratia</i> sp	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>Providencia</i> sp	+	+	V	+	V	-	-	-	+

+ = prova positiva
- = prova negativa

+/- = para a maioria das cepas a prova é positiva
-/+ = para a maioria das cepas a prova é negativa
V = prova variável podendo ser positiva ou negativa

Esta tabela é válida somente para o meio de Rugai e este aspecto apresentado refere-se a amostras de perfil bioquímico típico.

Outros fatores como procedência do material, resistência a antimicrobianos, sorologia e provas bioquímicas adicionais devem ser necessárias para a identificação final do microrganismo em questão.

Neste meio, devido à grande diversidade de substratos, pode ocorrer interferência entre as reações observadas. O microbiologista deve estar atento a este fato.



ANTIBIOGRAMA (ATB)

Antibiogramas são bioensaios conduzidos “*in vitro*” que visam testar a sensibilidade de bactérias frente aos antimicrobianos. A proposta primária deste teste é guiar o clínico na escolha do agente apropriado para a terapia. Além disso, estes testes são utilizados para avaliar “*in vitro*” a atividade de novos agentes.

ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos compreendem:

- **Agentes quimioterápicos:** substâncias químicas sintetizadas em laboratório
- **Agentes antibióticos:** moléculas produzidas por seres vivos como bactérias e fungos. (Ex: Penicilinas, produzidas pelo *Penicillium sp* e Cefalosporinas produzidas pelo *Cephalosporium sp*)
- **Agentes antibióticos semi-sintéticos:** moléculas parcialmente sintetizadas por microrganismos, concluídas em laboratório

Os quimioterápicos e antibióticos podem ter ação antibacteriana, antifúngica e antiviral. Esta ação pode levar à inibição do crescimento, à inativação ou à morte do agente infeccioso.

MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANTIBACTERIANOS

Os antibióticos e os quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, possuindo efeito bactericida ou bacteriostático, sendo ambos efeitos extremamente eficientes. As interações dos antibacterianos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede celular, membrana citoplasmática, ribossomos, DNA e metabolismo intermediário.

- **Antibacterianos que atuam na parede celular** - agem bloqueando a etapa final da síntese da parede celular, o que quase sempre resulta na morte da bactéria. Além disso, eles aumentam indiretamente a síntese das autolisinas.
- **Antibacterianos que atuam na membrana citoplasmática** - estes antibióticos se intercalam com as moléculas da membrana e a desorganizam. Isso permite a saída de componentes celulares e a morte da bactéria.
- **Antibacterianos que atuam nos ribossomos** - agem impedindo a síntese proteica da célula bacteriana, ou provocando a síntese de proteínas não-funcionais.
- **Antibacterianos que atuam no DNA** - agem quebrando a molécula de DNA, bloqueando sua transcrição, ou inibindo a enzima DNA girase (promove o enrolamento da molécula de DNA, para que ocupe menos espaço na célula).
- **Antibacterianos que atuam no metabolismo intermediário** - atuam bloqueando processos metabólicos da célula bacteriana.



PRINCIPAIS GRUPOS DE ANTIMICROBIANOS

BETALACTÂMICOS - Nesta categoria são incluídas as Penicilinas, as Cefalosporinas, os Monobactâmicos e as Carbapenemas. Todos estes possuem em comum o anel betalactâmico (composto por 3 átomos de carbono e 1 de nitrogênio). As Betalactamases são enzimas que degradam os antibióticos da classe dos betalactâmicos. Essas enzimas são produzidas por vários grupos de bactérias, conferindo-lhes resistência aos antibióticos desse grupo.

- **Penicilinas** - Foi o primeiro antibiótico descoberto (Fleming, 1929), e continua sendo até hoje um dos melhores antibacterianos disponíveis, se considerarmos sua alta atividade em bactérias sensíveis e sua baixa toxicidade para o ser humano. Exemplos de Penicilinas: Ampicilina e Amoxicilina (largo espectro), Meticilina e Oxacilina (pequeno espectro, resistentes as betalactamases), Carbenicilina e Piperacilina (Penicilinas Antipseudomonas - ativas sobre *P. aeruginosa*, *Proteus* sp indol-positivos, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp).
- **Cefalosporinas** - São divididas em 3 grupos: Cefalosporinas de primeira geração (ativas contra bactérias G+ e G-, com algumas exceções); Cefalosporinas de segunda geração (mais resistentes as betalactamases das bactérias G- e boa atividade sobre enterobactérias) e Cefalosporinas de terceira geração (ainda mais resistentes à inativação pelas betalactamases das bactérias G-; são muito utilizadas em infecções intra-hospitalares).
- **Carbapenemas** - A Imiprenema tem praticamente atividade contra todos os cocos G+ e G- e contra bacilos G+ e G-, aeróbios e anaeróbios.
- **Monobactâmicos** - O mais utilizado é o Aztreonam. Ele possui grande atividade sobre G- e nenhuma atividade sobre G+ e anaeróbios.

AMINOGLICOSÍDEOS - Possuem atividade contra bactérias G- aeróbias e contra estafilococos. Principais agentes: Estreptomina, Canamicina, Neomicina e Gentamicina.

GLICOPEPTÍDEOS - São ativas sobre bactérias G+, tendo maior indicação no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a oxalicina. A resistência adquirida a esses medicamentos é um fato raro, e por isso são muito utilizadas em infecções hospitalares. Principais agentes: Vancomicina e Teicoplanina.

TETRACICLINAS - Antibacterianos de largo espectro, embora a resistência adquirida seja um fato muito freqüente hoje em dia.

CLORANFENICOL - Possui amplo espectro de ação, embora seja alto o índice de G+ e G-resistentes ao Cloranfenicol. É altamente ativo frente bactérias anaeróbias estritas. É a droga de primeira escolha no tratamento da febre tifóide, e na meningite causada pelo *Haemophilus influenzae*.

MACROLÍDEOS - Age sobre G+, cocos G-, espiroquetas e alguns bacilos G-. Principal agente: Eritromicina.

LINCOSAMINAS - Ativas sobre estafilococos e estreptococos. Principais agentes: Lincomicina e Clindamicina.

QUINOLONAS - Ativas sobre enterobactérias, principalmente as que causam infecções no trato urinário. Principais agentes: Ácido Nalidíxico e Oxolínico, bem como os Flúor Derivados, Norfloxacin e Ciprofloxacino.

SULFONAMIDAS - Drogas de largo espectro que são pouco utilizadas devido à existência de agentes antimicrobianos mais eficazes. É utilizada em associações.

POLIPEPTÍDEOS - Principais agentes: Bacitracina e Polimixina

METRONIDAZOL - Quimioterápico que vem sendo utilizado no tratamento de infecções por germes anaeróbios. É efetivo contra *Gardnerella vaginalis*, *Campylobacter fetus* e *Helicobacter pylori*.



RESISTÊNCIA BACTERIANA A DROGAS

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. A resistência de uma bactéria pode ser:

- **Natural:** Todas as amostras de uma espécie são resistentes.
- **Adquirida:** Somente parte das amostras de uma espécie são resistentes. A resistência adquirida é um fenômeno espontâneo da bactéria, sendo os antimicrobianos apenas agentes seletores de amostras resistentes. Geralmente a resistência adquirida dá-se por alterações genéticas ou alterações dos mecanismos químicos das bactérias.

A capacidade de adquirir resistência, bem como o grau de resistência adquirida, é propriedade bastante variável entre as bactérias. Algumas raramente adquirem resistência e outras adquirem com grande frequência, podendo a resistência ser moderada ou intensa. Quando é moderada, a bactéria pode ser eliminada do organismo por um simples aumento da dose de antimicrobiano; quando é intensa, o antimicrobiano não pode ser utilizado. A capacidade das principais bactérias patogênicas de adquirirem resistência é apresentada na tabela abaixo:

Bactéria	Grau de capacidade
<i>Staphyococcus</i> sp	+++
<i>Streptococcus pyogenes</i>	± ^a
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	± ^a
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	++
<i>Neisseria meningitidis</i>	±
Enterobacteriaceae	++++ ^b
<i>Pseudomonas</i> sp	+++
<i>Haemophilus influenzae</i>	++
Anaeróbios	± ^c
Micobactérias	++
Espiroquetídeos	±

a. Adquirem resistência com alguma facilidade para certos Antibióticos, mas não para as penicilinas.

b. A *S. typhi* raramente se torna resistente.

c. O *Bacteroides fragilis* adquire resistência com facilidade.
± a +++, graus de capacidade.



DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS BACTÉRIAS AOS ANTIMICROBIANOS

Uma bactéria é considerada sensível a um antimicrobiano quando seu crescimento é inibido *in vitro* por uma concentração 3, ou mais vezes, inferior àquela que o antimicrobiano atinge no sangue. Se a concentração inibitória *in vitro* é igual ou superior àquela que o antimicrobiano atinge no sangue, a bactéria é considerada resistente. A bactéria moderadamente resistente é aquela cujo crescimento é inibido por concentrações intermediárias.

A concentração inibitória dos antimicrobianos pode ser determinada através de métodos diretos (métodos de diluição) ou indiretos (difusão em placa).

O método de difusão em placa tem por base dois fatos bem estabelecidos:

- 1- Quando se coloca um disco de papel impregnado com um antimicrobiano na superfície de um meio de cultura sólido, já semeado com uma bactéria, o crescimento bacteriano poderá ser inibido formando-se um halo de inibição em torno do disco, cujo diâmetro varia de acordo com a velocidade de difusão do antimicrobiano e a sensibilidade da bactéria. Se a bactéria for muito resistente, não haverá halo de inibição.
- 2- O diâmetro do halo de inibição é inversamente proporcional à concentração inibitória mínima do antimicrobiano, isto é, quanto maior o diâmetro do halo, menos a concentração inibitória.

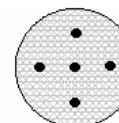
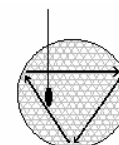
Em conclusão, tomando-se por base o tamanho do halo de inibição, é possível inferir se a bactéria é sensível, moderadamente resistente ou resistente a este antimicrobiano, comparando-se os halos obtidos com tabelas padronizadas internacionalmente.

Técnica do Método de Difusão em Placa:

- 1- Saturar um *swab* de algodão com a suspensão bacteriana.
Remova o excesso de umidade girando o *swab* contra a parede do tubo.
- 2- Semeie a suspensão sobre a superfície estéril de uma placa contendo ágar Müller-Hinton, utilizando sucessivamente três direções para obter um inóculo uniformemente espalhado sobre toda a superfície do ágar.
- 3- Distribua os discos de antibiótico, sendo cada um de um antimicrobiano diferente, sobre a superfície do ágar inoculado. Deixe uma distância de aproximadamente 1 cm entre a borda da placa e o disco.
- 4- Pressione levemente os discos para que não se desprendam durante a incubação.
- 5- Incube as placas por 24 horas a 37°C.

Através da análise dos resultados poderemos classificar os microrganismos testados em: "resistente", "intermediário", "moderadamente sensível", e "sensível", dependendo da formação ou não de halo inibitório e também de seu diâmetro.

No caso de formação de um halo inibitório, este deve ter seu diâmetro medido, e a medida encontrada deve ser comparada com tabelas padronizadas. De modo geral, estas tabelas determinam medidas de diâmetro, e dessa forma a medida encontrada em cada caso pode então ser enquadrada em uma das quatro categorias supracitadas.





MICOLOGIA

Os fungos são seres eucarióticos pertencentes ao Reino Fungi, que podem possuir um só núcleo (leveduras) ou vários núcleos (filamentosos ou bolores). Eles podem ser saprófitas (nutrem-se de matéria orgânica morta) ou parasitários (nutrem-se de matéria orgânica viva). Um fungo é formado estruturalmente por:

- **Parede celular:** estrutura rígida que protege a célula de choques osmóticos e mantém sua forma.
- **Membrana citoplasmática:** atua como uma barreira entre os meio exterior e interior da célula fúngica, e realiza o transporte de solutos além de outras funções.
- **Núcleo:** contém genoma fúngico composto por DNA, RNA e proteínas.
- **Ribossomos:** síntese protéica.
- **Mitocôndria:** produção de energia.
- **Retículo endoplasmático:** produção de proteínas e lipídeos.
- **Aparelho de Golgi:** armazenam substâncias desprezadas pela célula, glicogênio e lipídeos.
- **Lomassomos:** corpúculos de função ainda desconhecida.

Para que um fungo se desenvolva, eles necessitam de algumas substâncias como: O₂, H₂O, carboidratos simples (glicose, sacarose, maltose, amido, celulose), substâncias nitrogenadas e vitaminas. Os meios de cultura fúngica mais utilizados são o ágar Sabouraud e o ágar batata. Em meios de cultura, dependendo das condições nutricionais e de temperatura, os fungos podem se desenvolvem e obter morfologias diferentes, como acontece no dimorfismo fúngico (capacidade fúngica de se desenvolver sob a forma de levedura e/ou bolor).

Podem ser encontradas duas formas de manifestação fúngica:

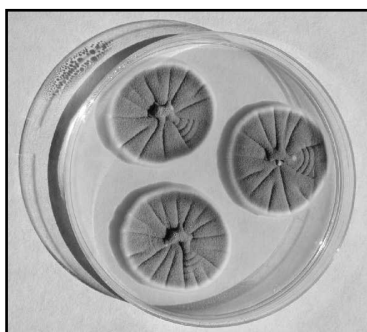
- **Leveduriforme:** colônias pastosas ou cremosas, formadas por microorganismos unicelulares que cumprem funções vegetativas e reprodutivas.
- **Filamentosas / bolores:** colônias algodanosas, aveludadas e pulverulentas, formadas por microorganismos multicelulares em forma de hifas (conjunto de hifas = micélio).



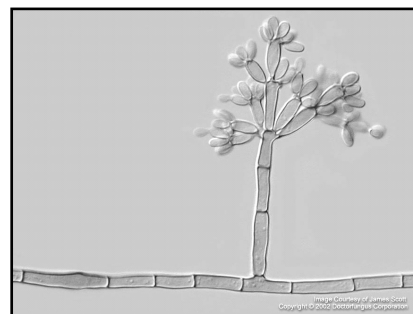
Colônias leveduriformes



Leveduras



Colônias filamentosas



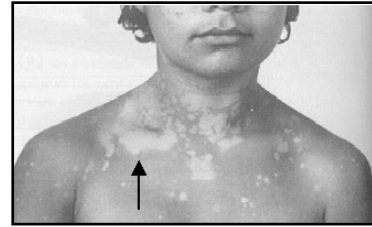
Hifa septada e conídios



MICOSES

MICOSES SUPERFICIAIS e CUTÂNEAS

Ptiríase Versicolor ("micose de praia") – dermatose cosmopolita, que produz aparecimento de manchas esbranquiçadas pela pele, principalmente no tronco e abdômen. É causada pela Malassezia furfur.



Tíneas (Tinhas) – causadas pelos gêneros Microsporum sp, Trichophyton sp e Epidermophyton sp. Dependendo do local onde o dermatófito se instala, esse tipo de micose recebe um nome (Tinea cruris – região inguinal; Tinea corporis – corpo; Tinea barbae – barba; Tinea manus – mãos; Tinea pedis – pés; Tinea unguium – unha; Tinea capitis – couro cabeludo).



Candidíase – pode acometer boca, garganta, couro cabeludo, vagina, dedos, unhas, brônquios, pulmões, trato gastrointestinal ou fungemia. Seu principal agente é a espécie Cândida albicans.

MICOSES SUBCUTÂNEAS

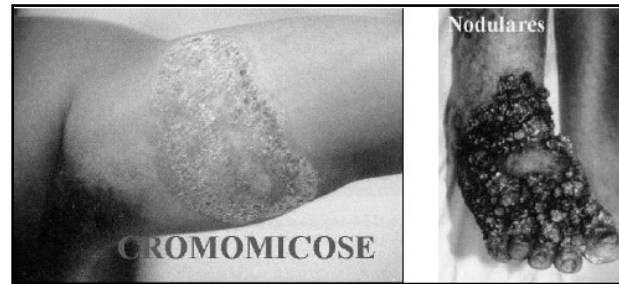
Os agentes de micoses subcutâneas vivem em estado saprofítico no solo, nos vegetais e nos animais de vida livre, sendo parasitas acidentais do homem e dos animais, que se infectam por ocasião de um traumatismo na pele, com material contaminado. Em geral, a micose se localiza na pele e tecido subcutâneo, próximo ao ponto de inoculação, sendo rara sua disseminação.

Esporotricose – Causada pelo Sporothrix schenckii, gera formação de pequenos tumores ao longo dos vasos linfáticos, com supuração e ulceração.

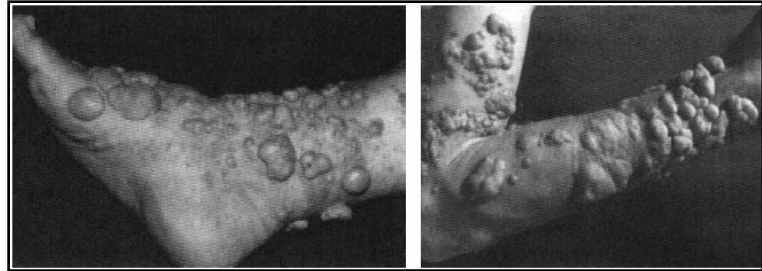




Cromomicose – Causada por vários fungos, dentre os quais, o mais comum é o Fonsecaea pedrosoi. Gera formação de nódulos, lesões papulosas, eritemato-descamativas, verrucosas, com ou sem ulceração.



Doença de Jorge-Lobo – Causada pelo Lacazia loboi, que ainda não foi cultivado. Gera lesões quelóides, multilobuladas, ulceradas, endurecidas, localizadas ou disseminadas.



MICOSES PROFUNDAS

Criptococose – infecção subaguda ou crônica de comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central, causada pelo Cryptococcus neoformans

Paracoccidioidomicose – doença de localização sistêmica, grave, que se manifesta por diversas formas clínicas, causada pelo Paracoccidioides brasiliensis.

Histoplasmose - É uma doença fúngica granulomatosa, causada pelo Histoplasma capsulatum.



DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO

EXAME DIRETO - Recomendado para a maioria das amostras.

- As amostras de consistência líquida e clara deverão são examinadas ao MO, com solução salina.
- Os materiais densos ou opacos (escamas de pele, raspados de unhas e pêlos), deverão ser emulsionados em uma gota de KOH a 10% sobre lâmina de vidro. Aquecer a mistura suavemente ao bico Bunsen. Cobrir com lamínula e examinar após 15 minutos.

As hifas e leveduras resistem à digestão do KOH. A observação deve ser feita contra fundo homogêneo. O KOH dissolve a queratina e intensifica o contraste das estruturas fúngicas com outros materiais presentes na preparação.

MICROCULTIVO DE BOLORES – Recomendado para a identificação e diferenciação fúngica, através da visualização de hifas.

Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro. Com todo cuidado de assepsia, coloque um pequeno quadrado (1 cm) de ágar Sabouraud, sobre a lâmina. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento de uma colônia escolhida (placa de fungo do ambiente) e semeie os lados do ágar. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à temperatura ambiente. Quando houver desenvolvimento satisfatório, retire a lamínula e o fragmento do meio de cultura. Coloque numa lâmina, uma gota de corante lactofenol azul algodão e a lamínula em cima. Examinar ao microscópico e identificar as hifas.

AULA PRÁTICA – MICOLOGIA:

Pegar uma placa de Petri (já preenchida com o meio de cultura) e levá-la para casa. Deixar essa placa aberta durante 24 horas em um local da casa (que seja escolhido pelo estudante), fechando-a e lacrando-a com a fita adesiva logo que o tempo se esgotar.

Após aproximadamente uma semana, deve-se retornar ao laboratório com a placa, e realizar os seguintes procedimentos:

- **Procedimento 1** – Exame macroscópico das colônias, com descrição.
- **Procedimento 2** – Exame direto.
- **Procedimento 3** – Microcultivo.